

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Greta  
BALČIŪNIENĖ

# Motinos kraujo ir vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų reikšmė chorioamnionito diagnostikai

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai

Medicina (M 001)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

**Mokslinė vadovė**

Prof. habil. dr. **Gražina Stanislava Drąsutienė** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Mokslinė konsultantė**

Prof. dr. **Diana Ramašauskaitė** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Gynimo taryba:**

**Pirmininkė** – prof. habil. dr. **Janina Tutkuvienė** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Nariai:**

prof. dr. **Dainius Characiejus** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

doc. dr. **Arūnas Liubšys** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. habil. dr. **Povilas Sladkevičius** (Lundo universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

doc. dr. **Jolita Zakarevičienė** (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. balandžio mėn. 8 d. 12 val. Medicinos fakulteto Didžiojoje auditorijoje. Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti [institucijų turinčių doktorantūros teisę pavadinimai pagal abėcėlę] bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.274>

<https://orcid.org/0000-0002-6677-2383>

VILNIUS UNIVERSITY

Greta  
BALČIŪNIENĖ

# A Value Of Inflammatory Markers in Maternal Blood And Amniotic Fluid in the Diagnosis Of Chorioamnionitis

**DOCTORAL DISSERTATION**

Medicine and Health Science

Medicine (M 001)

VILNIUS 2022

This dissertation was written between 2017 and 2021 at Vilnius university. The research was supported by Research Council of Lithuania and Vilnius University Faculty of Medicine.

**Academic supervisor:**

Prof. Habil. Dr. **Gražina Stanislava Drašutienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Academic consultant:**

Prof. Dr. **Diana Ramašauskaitė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Chairman** – Prof. Habil. Dr. **Janina Tutkuvienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

**Members:**

Prof. Dr. **Dainius Characiejus** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Assoc. Prof. Dr. **Arūnas Liubšys** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Habil. Dr. **Povilas Sladkevičius** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Prof. Dr. **Jolita Zakarevičienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12 on the 8th of April, 2022 in Main auditorium of the Faculty of Medicine of Vilnius University.

Address: M. K. Čiurlionio str. 21, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of (name of the institutions granted the right to conduct doctoral studies in alphabetical order), as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

# TURINYS

1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	7
2. ĮVADAS .....	8
2.1. Darbo aktualumas .....	8
2.2. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė.....	8
2.3. Darbo tikslas .....	9
2.4. Darbo uždaviniai .....	9
2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai .....	10
3. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
3.1. Priešlaikinio gimdymo ir chorioamnionito epidemiologija .....	10
3.2. Chorioamnionito etiologija.....	12
3.3. Chorioamnionito diagnostika .....	13
3.3.1. Klinikinė chorioamnionito .....	13
3.3.2. Histologinė chorioamnionito diagnostika.....	15
3.3.3. Mikrobiologinė chorioamnionito diagnostika .....	17
3.3.4. Biocheminė chorioamnionito diagnostika .....	18
3.3.4.1. Motinos kraujo uždegiminiai pokyčiai. ....	18
3.3.4.1.1. Leukocitai.....	18
3.3.4.1.2. Neutrofilų ir limfocitų santykis .....	19
3.3.4.1.3. C reaktyvusis baltymas .....	21
3.3.4.2. Vaisiaus vandenų uždegiminiai žymenys .....	22
3.3.4.2.1. Interleukinas 6.....	24
3.3.4.2.2. Vėžio nekrozės faktorius $\alpha$ .....	27
3.3.4.2.3. Matrikso metilproteinazė 8 .....	28
3.3.4.2.4. Transmembraniniai atpažinimo ( <i>Toll-like</i> ) receptoriai .....	30
3.3.4.2.5. $\alpha$ defensinai .....	31
3.3.4.2.6. Urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius.....	32
3.4. Nėštumo priežiūros taktika, esant priešlaikiniam neišnešioti vaisiaus dangalų plyšimui.....	34
3.4.1. Laukimo taktika.....	34
3.4.2. Gimdymo sužadinimas .....	35
3.5. Chorioamnionito komplikacijos .....	35

4. DARBO METODIKA .....	37
4.1. I dalis. Motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą.....	40
4.2. II dalis. Vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą.....	42
4.3. III dalis. Motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmių palyginimas prognozuojant histologinį chorioamnionitą .	49
4.4. Tyrimo imties apskaičiavimas .....	50
4.5. Statistinė duomenų analizė .....	50
5. TYRIMO REZULTATAI.....	51
5.1. I dalis. Motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą.....	51
5.2. II dalis. Vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą. ....	58
5.3. III dalis. Motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmių palyginimas prognozuojant histologinį chorioamnionitą .	67
6. REZULTATŲ APTARIMAS .....	74
6.1. Tyrimo privalumai .....	80
6.2. Tyrimo trūkumai.....	80
7. IŠVADOS. ....	81
8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS .....	82
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	83
10. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS.....	96
10.1. Straipsniai disertacijos tema .....	96
10.2. Straipsniai ne disertacijos tema .....	96
10.3. Pranešimai disertacijos tema .....	97
10.4. Pranešimai ne disertacijos tema.....	98
10.5. Kiti leidiniai .....	98
11. PRIEDAI.....	99
12. FINANSINĖ PARAMA .....	102
SUMMARY.....	103
PADEKA .....	153

## 1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AUC	—	plotas po kreive (angl. <i>area under the curve</i> )
CRB	—	C reaktivusis baltymas
ELISA	—	imunofermentinis tyrimas
IL	—	interleukinas (angl. <i>interleukin</i> )
IQR	—	tarpkvartilinis plotis (angl. <i>interquartile range</i> )
Md	—	mediana
MMP	—	matrikso metaloproteinazė (angl. <i>matrix metalloproteinases</i> )
NLS	—	neutrofilų ir limfocitų santykis
NPV	—	neigiama prognostinė vertė
OR	—	šansų santykis (angl. <i>odds ratio</i> )
PI	—	pasikliautinis intervalas
PMN	—	polimorfonukleariniai leukocitai
PNVDP	—	priešlaikinis neišnešiotą vaisiaus dangalų plyšimas
ROC	—	sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. <i>receiver operating characteristic</i> )
SN	—	standartinis nuokrypis
sTLR	—	tirpus transmembraninis atpažinimo receptorių (angl. <i>soluble Toll-like receptor</i> )
suPAR	—	tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorių (angl. <i>soluble urokinase plasminogen activator receptor</i> )
TNF	—	vėžio nekrozės faktorius (angl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TPV	—	teigiama prognostinė vertė
VUL SK	—	Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

## 2. ĮVADAS

### 2.1. Darbo aktualumas

Priešlaikinis gimdymas – tai gimdymas, esant  $22^{+0}$ – $36^{+6}$  nėštumo savaitėms. Viena dažniausių savaiminio priešlaikinio gimdymo priežasčių – chorioamnionitas, kuris nustatomas net 40–70 proc. visų priešlaikinių gimdymų atvejų [1, 2]. Chorioamnionitas yra ūminis vaisiaus dangalų ir placentos uždegimas. Ši infekcija pavojinga moteriai, nes didėja gimdos atonijos ir kraujavimo po gimdymo, endometrito, peritonito bei sepsio rizika [3, 4]. Naujagimiui ši infekcija yra pavojinga dėl padidėjusios vaisiaus uždegiminio atsako sindromo, pneumonijos, meningito, sepsio ir mirties rizikos [5]. Atokios chorioamnionito komplikacijos kūdikiui gali būti atsiliekanči protinė raida, nekrotizuojantis enterokolitas ir cerebrinis paralyžius [6]. Dėl galimų chorioamnionito komplikacijų vaisiui ir motinai, diagnozavus šią infekciją, rekomenduojama nėštumo nebetęsti [7].

Šiuo metu chorioamnionitas gali būti diagnozuojamas remiantis klinikiniais, histologiniais, mikrobiologiniais arba biocheminiais kriterijais. Klinikiniai chorioamnionito diagnostikos kriterijai pasižymi mažu jautrumu, mikrobiologiniai tyrimai atliekami kelias dienas, o histologinis ištyrimas įmanomas tik po gimdymo. Dėl šių trūkumų iki šiol nėra visuotinai priimto vieno metodo chorioamnionito diagnostikai. Kasmet atliekama vis daugiau tyrimų, siekiant patvirtinti tyrimo metodą, kuris tiktų ankstyvai chorioamnionito diagnostikai, būtų greitai ir lengvai atliekamas bei pasižymėtų aukštu specifiskumu ir jautrumu.

### 2.2. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Siekiant greičiau ir tiksliau nustatyti chorioamnionitą nėštumo metu, šiuo metu daugiau dėmesio skiriama klinikinių chorioamnionito diagnostikos kriterijų tobulinimui ir biocheminei vaisiaus vandenų analizei.

Iki šiol klinikinėje chorioamnionito diagnostikoje plačiai naudojamas leukocitų skaičiaus ir C reaktyviojo baltymo (CRB) vertinimas motinos kraujyje, tačiau leukocitozė vertinama kaip mažai jautrus žymuo prognozuojant chorioamnionitą [8]. Mokslinėje literatūroje randama duomenų apie neutrofilų ir limfocitų santykio (NLS) pranašumą įvairių infekcijų diagnostikoje, bet tyrimų, analizuojančių šio santykio reikšmę diagnozuojant chorioamnionitą, randama tik pavienių. Todėl šiame tyrime įvertinome NLS



reikšmę chorioamnionito diagnostikoje ir palyginome jo diagnostines vertes su leukocitų skaičiaus ir CRB diagnostinėmis vertėmis.

Uždegiminiai žymenys vaisiaus vandenyse nustatomi imunofermentiniu metodu. Vaisiaus vandenys šiam tyrimui gali būti paimami invaziniu būdu, atliekant amniocentezę, arba neinvaziniu būdu, vaisiaus vandenį paimant per makštį. Amniocentezė yra invazinė procedūra, galinti sukelti tokias komplikacijas kaip vaisiaus, virkštelės, placentos pažeidimas, placentos atšoka, vaisiaus žūtis [9, 10]. Įrodyta, kad komplikacijų rizika amniocentezės metu yra maža (iki 1 proc.) [11], tačiau ši procedūra yra sudėtingesnė ir komplikacijų rizika yra didesnė prieš laiką nutekėjus vaisiaus vandenims dėl mažo likutinio vaisiaus vandenų kiekio.

Mūsų tyrimo metu siekta chorioamnionitą diagnozuoti biocheminiu būdu – nustatant uždegiminių žymenų pokyčius vaisiaus vandenyse. Vaisiaus vandenys ištyrimui buvo imami neinvaziniu būdu – surenkant per makštį. Ši procedūra yra lengvai atliekama ir nereikalauja specialių įgūdžių. Taip pat vaisiaus vandenų surinkimas per makštį yra neinvazinė procedūra, todėl nesukelia papildomos rizikos.

Didelė diagnostinė vertė chorioamnionito diagnostikoje buvo įrodyta tiriant IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8, sTLR-2, sTLR-4,  $\alpha$  defensinų koncentracijas amniocentezės būdu paimtuose vaisiaus vandenyse. Mažiau duomenų randama apie šių uždegiminių žymenų reikšmes neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse. suPAR koncentracijos nustatymas kraujyje turi didelę diagnostinę vertę įvairių infekcijų diagnostikoje, tačiau duomenų apie šio žymens nustatymą vaisiaus vandenyse ir jo reikšmę chorioamnionito diagnostikai iki šiol nėra publikuota. Savo tyrime įvertinome visų išvardytų uždegiminių žymenų koncentracijas neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse ir taip pat jų reikšmę chorioamnionito diagnostikai, esant priešlaikiniam neišnešoto vaisiaus dangalų plyšimui (PNVDP) iki 34 savaičių.

### 2.3. Darbo tikslas

Disertacijos tikslas – įvertinti motinos kraujo ir neinvaziniu būdu paimtų vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmę antenatalinei chorioamnionito diagnostikai.

### 2.4. Darbo uždaviniai

1. Įvertinti motinos kraujo uždegiminių žymenų (leukocitų, neutrofilų, limfocitų, neutrofilų ir limfocitų santykio, C reaktyviojo baltymo) tikslumą

antenatalinėje chorioamnionito diagnostikoje, esant priešlaikiniam neišnešioti vaisiaus dangalų plyšimui.

2. Įvertinti neinvaziniu būdu paimtų vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų (*IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-8*, *s-TLR-2*, *s-TLR-4*,  *$\alpha$  defensinų*, *suPAR*) tikslumą antenatalinėje chorioamnionito diagnostikoje.

3. Nustatyti motinos kraujo ir vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų optimalias reikšmes chorioamnionito diagnostikai.

4. Palyginti motinos kraujo ir neinvaziniu būdu paimtų vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų tikslumą chorioamnionito diagnostikoje.

## 2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Šiuo metu klinikinio chorioamnionito diagnostikai naudojamas bendras leukocitų kiekis nėra pakankamos prognostinės vertės žymuo chorioamnionito diagnostikoje.

2. C reaktyviojo baltymo koncentracija bei neutrofilų ir limfocitų santykis turi geresnes chorioamnionito prognostines vertes nei leukocitų kiekis motinos kraujyje.

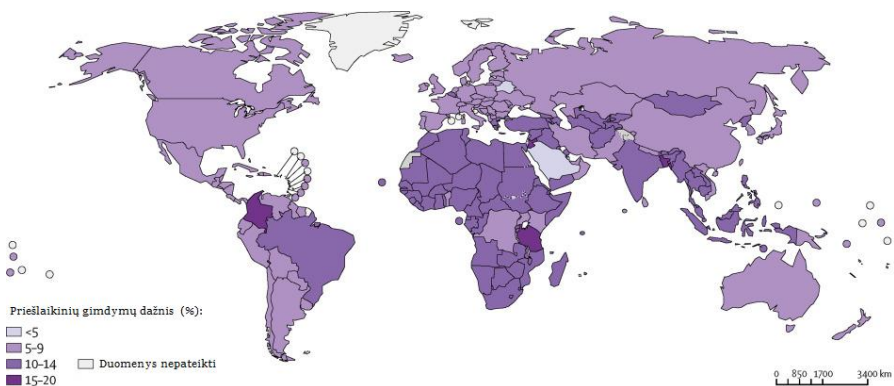
3. Uždegiminių žymenų (*IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-8*, *s-TLR-2*, *s-TLR-4*,  *$\alpha$  defensinų*, *suPAR*) koncentracija neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse patikimai skiriasi tarp moterų, kurioms diagnozuotas ir nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas, todėl gali pagerinti chorioamnionito diagnostiką.

4. Neinvaziniu būdu paimtų vaisiaus vandenių biocheminis ištyrimas, derinamas su uždegiminių žymenų pokyčiais motinos kraujyje, gali pagerinti antenatalinę chorioamnionito diagnostiką.

## 3. LITERATŪROS APŽVALGA

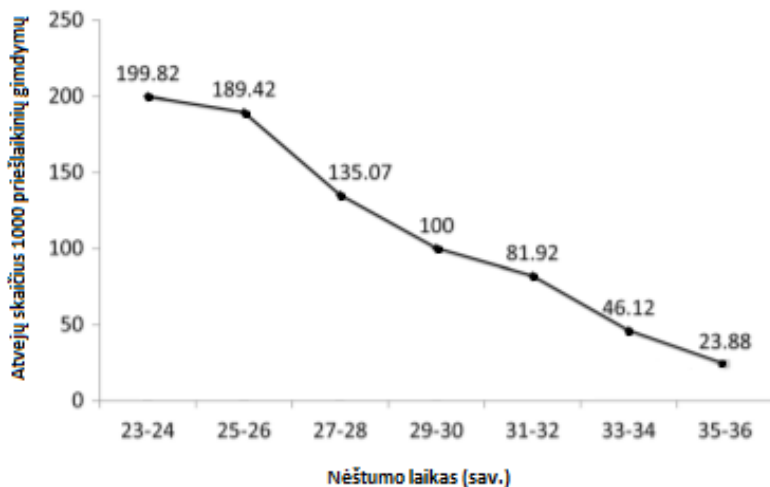
### 3.1. Priešlaikinio gimdymo ir chorioamnionito epidemiologija

Priešlaikinis gimdymas komplikuoja apie 5–9 proc. visų gimdymų išsivysčiusiose šalyse ir net iki 20 proc. žemesnį ekonomikos išsivystymo lygį turinčiose šalyse (1 pav.) [12]. Lietuvoje 2020 m. gimė 1 276 neišnešioti naujagimiai, kurie sudarė 5,5 proc. visų gimusiųjų [13]. Apie 25–30 proc. priešlaikinių gimdymų prasideda dėl prieš laiką nutekėjusių vaisiaus vandenių, 40–45 proc. – prasideda spontaniškai ir 30–35 proc. – įvyksta dėl medicininių vaisiaus ar motinos indikacijų užbaigti nėštumą [14].



**1 pav.** Priešlaikinio gimdymo paplitimo dažnis pasaulyje (2014 m., nėštumo trukmė nuo 22<sup>+0</sup> iki 36<sup>+6</sup> sav. LANCET 2019, pritaikyta pagal prieigą internete: <[https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(18\)30451-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(18)30451-0/fulltext)>)

Viena dažniausių priešlaikinio gimdymo priežasčių – chorioamnionitas, kuris nustatomas net 40–70 proc. visų spontaninių priešlaikinių gimdymų atvejų [1, 2]. Chorioamnionitas – tai vaisiaus dangalų ir placentos infekcija. Mokslinėje literatūroje vartojamas ir kitas terminas, kaip sinonimas chorioamnionitui – intrauterinė infekcija. Stebima atvirkštinė koreliacija tarp chorioamnionito dažnio ir nėštumo laiko. Didžiausias chorioamnionito atvejų dažnis nustatomas, esant spontaniniam priešlaikiniam gimdymui 23–24 nėštumo savaitę, ir laipsniškai mažėja, didėjant nėštumo laikui (2 pav.) [15].



**2 pav.** Chorioamnionito dažnio ir nėštumo trukmės ryšys (pritaikyta pagal A. D. Mackeen, 2017 [15])

### 3.2. Chorioamnionito etiologija

Chorioamnionitas dažniausiai prasideda bakterijoms ascendentiniu keliu patekus į gimdą, placenta ir vaisiaus vandenį [16]. Rečiau bakterijos į gimdą patenka hematogeniniu būdu ar dėl jatrogeninių priežasčių, taikant invazinius vaisiaus tyrimo ar gydymo metodus [17]. Dažniausi chorioamnionito rizikos veiksniai yra  $\geq 18$  valandų trunkantis bevandenis periodas, mekonijumi užteršti vaisiaus vandenys, gimdyvės makšties kolonizacija B grupės hemoliziniu streptokoku, bakterinė vaginozė, dažni makštiniai tyrimai gimdymo metu, lytiškai plintančios ligos, ekstragenitalinės infekcijos, alkoholio ir tabako vartojimas nėštumo metu [5, 7, 18, 19].

Didžioji dalis infekcijos sukėlėjų, kurie buvo nustatomi vaisiaus vandenyse esant priešlaikiniam gimdymui, buvo apatinių lytinių takų mikroorganizmai: anaerobai (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomona vaginalis*, *Prevotella*, *Leptotrichia*), fakultatyviniai anaerobai (mikoplazmos, ureaplazmos), aerobai (*Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Gardnerella vaginalis*, B grupės hemolizinis streptokokas) ir grybai (1 lentelė) [20–25].

**1 lentelė.** Dažniausi vaisiaus vandenyse nustatomi infekcijos sukėlėjai, esant priešlaikiniam gimdymui

Gramneigiamos bakterijos	Gramteigiamos bakterijos
<b>Aerobai</b>	
<i>Sneathia</i>	<i>Streptococcus</i> rūšys
<i>Acinetobacter</i> rūšys	<i>Bacillus</i> rūšys
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i> rūšys
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Enterococcus</i> rūšys
<i>Neisseria cinerea</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<b>Anaerobai</b>	
<i>Fusobacterium</i> rūšys	<i>Lactobalillus</i> rūšys
<i>Bacteroides</i> rūšys	<i>Peptostreptococcus</i> rūšys
<i>Leptotrichia amnionii</i>	<i>Eubacterium</i> rūšys
<i>Porphyromonas</i> rūšys	<i>Cutibacterium acnes</i>
<i>Veillonella</i> rūšys	
<i>Prevotella</i> rūšys	

<b>Kiti mikroorganizmai</b>
<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Candida rūšys</i>
<i>Abiotrophia defectiva</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>

Pritaikyta pagal E.R. Newton 2005 [20], R. Romero 2019 [21], S. Akira 2001 [22], L. Oliveira-Nascimento 2012 [23], T. Kawai 2010 [24], S. Carpenter 2007 [25].

### 3.3. Chorioamnionito diagnostika

Chorioamnionitas gali būti diagnozuojamas remiantis klinikiniais, histologiniais, mikrobiologiniais arba biocheminiais kriterijais. Visi šie tyrimo metodai turi trūkumų, todėl iki šiol nėra visuotinai priimto vieno metodo chorioamnionito diagnostikai.

#### 3.3.1. Klinikinė chorioamnionito diagnostika

Klinikinei chorioamnionito diagnostikai dažnai naudojami Gibso kriterijai [5, 16], kurie patvirtinami, jei nėščioji karščiuoja ( $\geq 37,8$  °C) ir yra bent du papildomi kriterijai: motinos tachikardija ( $> 100$  k./min.), vaisiaus tachikardija ( $> 160$  k./min.), nemalonus vaisiaus vandenų kvapas, gimdos skausmingumas ar motinos leukocitozė ( $> 15\ 000/\text{mm}^3$ ) [26]. Esant chorioamnionitui, leukocitozė būdinga 70–90 proc. atveju, tačiau, nesant kitų šiai infekcijai būdingų simptomų, chorioamnionito tikimybė yra nedidelė [16]. Motinos ir vaisiaus tachikardija būdinga 40–80 proc., o gimdos skausmingumas ir nemalonus kvapo pūlingos išskyros būdinga mažiau nei ketvirtadaliui nėščiųjų, sergančių chorioamnionitu [5, 16]. Beveik visoms nėščiosioms (95–100 proc.), kurioms diagnozuojamas chorioamnionitas, būdingas karščiavimas [5], tačiau nėščiosios gali karščiuoti ir dėl kitų infekcinių ar neinfekcinių priežasčių: ne ginekologinės kilmės uždegimai, jungiamojo audinio ligos, epidurinis nuskausminimas ar oksidacinis stresas gimdymo metu [16]. Tik įvertinus, kad nėra kitos karščiavimą sukėlusios sisteminės ligos, Gibso kriterijų specifiškumas siekia kiek daugiau nei 98 proc., o jautrumas tik 15 proc. [27] (2 lentelė). Siekiant įvertinti, kaip pakistų Gibso kriterijų diagnostinė vertė, jei chorioamnionitas būtų diagnozuojamas radus bet kuriuos tris klinikinius parametrus ir nebūtinai įtraukus privalomąjį kriterijų karščiavimą, nustatyta, kad tokio diagnostinio metodo jautrumas padidėtų iki 34 proc., tačiau specifiškumas sumažėtų iki 78,7 proc. [18].

S.G. Lencki su kolegomis 1994 metais chorioamnionito diagnostikai pasiūlė patobulintus klinikinio chorioamnionito diagnostikos kriterijus. Pagal

šiuos kriterijus infekcija diagnozuojama, jei nėščioji karščiuoja ( $\geq 37,8$  °C) ir yra bent vienas papildomas kriterijus: motinos tachikardija ( $> 100$  k./min.), nemalonaus kvapo išskyros iš makšties, gimdos skausmingumas ar motinos leukocitozė ( $> 15\ 000/\text{mm}^3$ ) [28]. Eunice Kennedy Shriver nacionalinio vaiko sveikatos ir žmogaus raidos instituto mokslininkai 2016 m. pasiūlė Trigubo I (angl. *Triple I*) kriterijus chorioamnionito diagnostikai. Trigubo I kriterijai paraidžiui anglų kalboje reiškia intrauterinis uždegimas ir infekcija (*intrauterine inflammation, infection*). Pagal šiuos kriterijus infekcija diagnozuojama, jei pasireiškia nėščiosios karščiavimas ( $\geq 39,0$  °C arba  $\geq 38,0$  °C) kartu su dar bent vienu papildomu kriterijumi: vaisiaus tachikardija ( $> 160$  k./min.), motinos leukocitoze ( $> 15\ 000/\text{mm}^3$ ), pūlingomis išskyromis iš gimdos kaklelio arba biocheminio, mikrobiologinio vaisiaus vandenų tyrimo bei histologinio placentos tyrimo metu nustatyta intrauterine infekcija [29]. Tačiau vienas naujausių tyrimų, atliktų 2020 m., parodė, kad Lencki ir Trigubo I kriterijų jautrumas ir specifiskumas yra labai panašūs į Gibso kriterijų jautrumą ir specifiskumą [27] (2 lentelė).

**2 lentelė.** Chorioamnionito klinikinių diagnostinių kriterijų jautrumas ir specifiskumas

<b>Kriterijus</b>	<b>Rezultatas, nurodantis chorioamnionitą</b>	<b>Jautrumas (proc.)</b>	<b>Specifiškumas (proc.)</b>
<b>Gibso kriterijai [27]</b>	Karščiavimas ir bent du papildomi kriterijai	15,4	98,8
<b>Lencki kriterijai [27]</b>	Karščiavimas ir bent vienas papildomas kriterijus	15,4	98,8
<b>Trigubas I [27]</b>	Karščiavimas ir bent vienas papildomas kriterijus (tarp jų ir biocheminis, mikrobiologinis vaisiaus vandenų ar histologinis placentos tyrimas)	15,4	100
<b>Papildomi kriterijai:</b>			
Motinos tachikardija [30]	$> 100$ k./min.	88,0	5,0
Vaisiaus tachikardija [30]	$> 160$ k./min.	80,0	30,0
Gimdos jautrumas [30]	Skausmingumas palpacijos metu	12,0	95,0
Leukocitų skaičius [30]	$> 15\ 000 /\text{mm}^3$	76,0	30,0
Išskyros iš makšties [30]	Nemalonaus kvapo	8,0	95,0

Pritaikyta pagal Y. Maki 2020 [27] ir R. Romero 2015 [30].

### 3.3.2. Histologinė chorioamnionito diagnostika

Histologinis chorioamnionitas diagnozuojamas atlikus morfologinį placentos ir vaisiaus dangalų ištyrimą po gimdymo. Uždegiminiai pakitimai placentoje ir vaisiaus dangaluose vertinami remiantis Amsterdamo placentos darbo grupės ir Pediatrijos patologijos draugijos Perinatalinės sekcijos diagnostikos kriterijais (3 ir 4 lentelės) [31, 32]. Nors histologinis placentos ir vaisiaus dangalų ištyrimas yra vienas tiksliausių chorioamnionito diagnostikos metodų [33], šis tyrimas yra atliekamas tik po gimdymo ir antenatalinei chorioamnionito diagnostikai netinka.

**3 lentelė.** Amsterdamo placentos darbo grupės choriono ir amniono pažeidimų diagnostikos kriterijai

<b>Motinos uždegiminis atsakas</b>	
<b>Stadijos</b>	
I	Ūminis subchorionitas ar chorionitas
II	Ūminis chorioamnionitas: polimorfonuklearinių leukocitų (PMN) infiltracija į chorioną ir amnioną
III	Nekrotizuojantis chorioamnionitas: PMN karioreksija, amniocitų nekrozė ir (arba) amniono bazinės membranos hipereozinofilija
<b>Laipsniai</b>	
I	Nėra sunkiam chorioamnionitui būdingų požymių
II	Sunkus chorioamnionitas: susiliejęs PMN arba stebimi subchorioniniai mikroabscesai
<b>Vaisiaus uždegiminis atsakas</b>	
<b>Stadijos</b>	
I	Choriono vaskulitas arba virkštelės kraujagyslių flebitas
II	Virkštelės venos ir vienos arba abiejų arterijų pažeidimas
III	Nekrotizuojantis funisitas
<b>Laipsniai</b>	
I	Nėra sunkiam uždegimui būdingų požymių
II	Sunkus uždegimas: virkštelės kraujagyslių raumeninio sluoksnio infiltracija PMN su raumeninių skaidulų išretėjimu (degeneracija)

Pritaikyta pagal T.Y. Khong 2016 [31].

**4 lentelė.** Pediatrijos patologijos draugijos Perinatalinės sekcijos histologinio placentos ištyrimo rekomendacijos

<b>Kategorija</b>	<b>Rekomenduojama terminologija</b>	<b>Apibrėžimas</b>
<b>Motinos uždegiminis atsakas</b>		
<i>Stadija</i>		
I – ankstyvas	Ūminis subchorionitas ar chorionitas	Pavienių PMN infiltracija į subchorionines skaidulas ir / ar trofoblasto membraną
II – vidutinis	Ūminis chorioamnionitas	Difuziškai išsidėstę PMN choriono ir amniono audiniuose
III – vėlyvas (uždelstas)	Nekrotizuojantis chorioamnionitas	PMN karioreksija, amniocitų nekrozė ir (arba) amniono bazinės membranos išplonėjimas ir hipereozinofilija
<i>Laipsnis</i>		
I – lengvas-vidutinis	Nereikalinga specifinė terminologija	Nėra sunkiam uždegimui būdingų požymių
II – sunkus	Sunkus ūminis chorioamnionitas ar su subchorioniniu abscesu	Susiliejęs PMN tarp choriono ir decidualinės membranos; ≥ 3 izoliuoti židiniai arba ištisinė PMN juosta
Kitas	Lėtinis chorioamnionitas	Mononuklearinės ląstelės, infiltruotos PMS
<b>Vaisiaus uždegiminis atsakas</b>		
<i>Stadija</i>		
I – ankstyvas	Chorioninis vaskulitas ar virkštelės kraujagyslių flebitas	PMN infiltracija į choriono kraujagyslių ir / ar virkštelės venos raumeninį sluoksnį
II – vidutinis	Virkštelės vaskulitas (1 ar 2 arterijų ± venos pažeidimas) ar virkštelės panvaskulitas (visų virkštelės kraujagyslių pažeidimas)	PMN infiltracija į 1 ar 2 virkštelės arterijų ± venos raumeninį sluoksnį
III – vėlyvas (uždelstas)	Nekrotizuojantis funisitas ar virkštelės perivaskulitas	PMN infiltracija į drebutinį virkštelės audinį, esantį aplink ≥ 1 kraujagyslę



<b>Kategorija</b>	<b>Rekomenduojama terminologija</b>	<b>Apibrėžimas</b>
<i>Laipsnis</i>		
I – lengvas-vidutinis	Nereikalinga specifinė terminologija	Nėra sunkiam uždegimui būdingų požymių
II – sunkus	Sunkus vaisiaus uždegiminis atsakas ar ryškus chorioninis (virkštelės) vaskulitas	Susiliejęntys PMN choriono ir / ar virkštelės kraujagyslių raumeniniame sluoksnyje su miocitų degeneracija
Kitas	Vaisiaus kraujagyslių trombozės	Naujai įvykusi vaisiaus kraujagyslių trombozė su raumeninio sluoksnio PMN infiltracija
<i>Kiti specifiniai požymiai</i>	Periferinis funisitas	Židininė PMN agregacija virkštelės audinių paviršiuje
	Ūminis vilitas	PMN infiltracija į placentos gaurelių stromą (ar tarp trofoblasto ir stromos)
	Ūminis intervilozitas su tarpgaureliniais abscesais	PMS difuziniai židiniai tarp gaurelių
	Decidualinės plazmos ląstelės	Uždegiminės ląstelės decidualinės membranos bazinėje ir kapsulinėje dalyje

Santrumpos: PMN – polimorfonuklearai.  
Pritaikyta pagal Redline RW 2003 [32].

### 3.3.3. Mikrobiologinė chorioamnionito diagnostika

Antenataliniu laikotarpiu patikimiausias ir auksiniu chorioamnionito diagnostikos standartu laikomas vaisiaus vandenų mikrobiologinis tyrimas [16]. Šiam tyrimui vaisiaus vandenys paimami amniocentezės būdu, kultivavimo terpėje užsėjama tiriamoji medžiaga, kuri vėliau auginama aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis. Tik apie 46 proc. moterų, kurioms diagnozuojamas chorioamnionitas pagal klinikinius kriterijus, stebimas patologių bakterijų augimas vaisiaus vandenyse [30]. Taip pat pastebėta, kad iki 11 proc. moterų, kurioms stebimas bakterijų augimas vaisiaus vandenyse, histologinio chorioamnionito požymių po gimdymo nėra nustatoma [34]. Dažniausiai vaisiaus vandenų pasėlyje aptinkama

*Ureaplasma urealyticum* ir *Gardnerella vaginalis* bakterijų [30]. Nors šis tyrimas yra laikomas auksiniu chorioamnionito diagnostikos standartu, tyrimas nėra dažnai naudojamas, nes pasėlio rezultatų reikia laukti kelias paras.

Kitas būdas nustatyti mikroorganizmus vaisiaus vandenyse yra molekulinės diagnostikos tyrimas (PGR), kurio metu nustatoma infekcijos sukėlėjo specifinė genetinė informacija. Romero su bendraautoriais savo tyrime nustatė, kad PGR tyrimas buvo teigiamas apie 59 proc. moterų, kurioms buvo diagnozuotas klinikinis chorioamnionitas [30]. Pagrindinis šio tyrimo trūkumas yra tai, kad PGR tyrimas atliekamas įtariamiesiems ir dažniausiai pasitaikantiems mikroorganizmams, todėl, pasirinkus neteisingą infekcijos sukėlėją, gaunamas klaidingai neigiamas rezultatas.

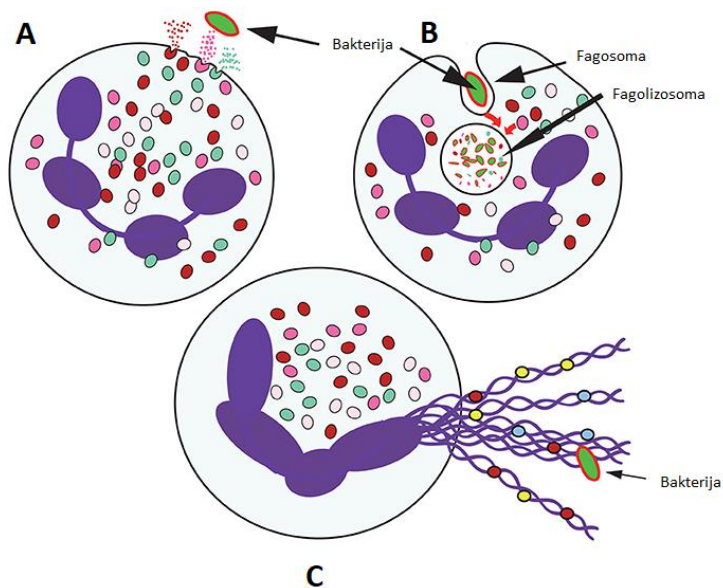
### 3.3.4. Biocheminė chorioamnionito diagnostika

Siekiant greičiau ir tiksliau nustatyti chorioamnionitą nėštumo metu, šiuo metu daugiau dėmesio skiriama biocheminės diagnostikos kriterijams. Biocheminės diagnostikos metu gali būti vertinami uždegiminiai pokyčiai motinos kraujyje ar vaisiaus vandenyse. Vaisiaus vandenys gali būti tiriami juos paimant neinvaziniu būdu per makštį arba atliekant amniocentezę.

#### 3.3.4.1. Motinos kraujo uždegiminiai pokyčiai

##### 3.3.4.1.1. Leukocitai

Leukocitai yra imuninės sistemos dalis, kurią sudaro dviejų rūšių imuninės ląstelės: granulocitai ir agranulocitai. Granulocitai – tai grūdėtieji leukocitai, kuriems priskiriami neutrofilai, bazofilai ir eozinofilai. Agranulocitai – tai leukocitai, kurių citoplazmoje nėra granulių, jiems priskiriami limfocitai ir monocitai [35]. Bakterinių infekcijų metu svarbiausią vaidmenį atlieka neutrofilai, kurie bakterijas naikina jas fagocituodami, atlikdami degranuliaciją, panaudodami reaktyvias deguonies formas ir ekstraląstelines gaudykles [36]. Neutrofilų citoplazmoje matomos granulės, o branduolį sudaro 3–5 segmentai, sujungti chromatino siūlais (3 pav.) [35].



**3 pav.** Neutrofilų sandara ir antibakterinis mechanizmas (pritaikyta pagal C. Rosales, 2018 [35])

Nesant uždegiminio proceso, neutrofilai cirkuliuoja kraujyje neaktyvia forma. Prasidėjus bakteriniam uždegimui, neutrofilai yra aktyvuojami, subręsta ir migruoja į uždegimo židinį, kovodami su infekcijos sukėlėju išgyvena 24–48 valandas. Žuvę neutrofilai kartu su fagocituotu patogenu makrofagų yra pašalinami iš infekcijos židinio.

Leukocitozė vertinama kaip prastas chorioamnionito diagnostikos kriterijus, nes, padidėjus leukocitų skaičiui daugiau nei 30 proc., tyrimo jautrumas svyruoja nuo 23 iki 63 proc. ir stebimas didelis klaidingai neigiamų rezultatų dažnis [8]. Leukocitų skaičiaus vertinimą taip pat apriboja kortikosteroidinių preparatų skyrimas vaisiaus plaučiams brandinti, nes kortikosteroidai sukelia leukocitozę, kuri tęsiasi 24–48 val. [37–39].

#### 3.3.4.1.2. Neutrofilų ir limfocitų santykis

NLS yra santykis, gaunamas absoliutų neutrofilų skaičių padalinus iš absoliutaus limfocitų skaičiaus arba neutrofilų procentinę išraišką padalinus iš limfocitų procentinės išraiškos. Esant bakterinei infekcijai, neutrofilų skaičius didėja, o limfocitų – mažėja [40–42]. Kadangi NLS sujungia abu šiuos rodiklius, yra jautresnis rodiklis bakterinių infekcijų diagnostikoje nei pavienių leukocitų rūšių vertinimas (4 pav.).

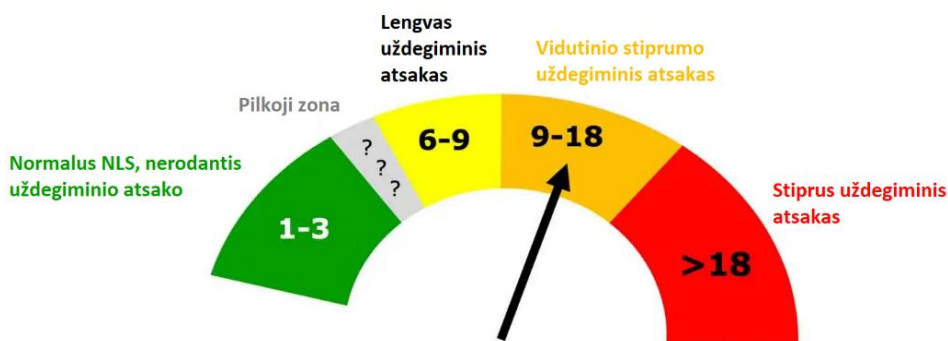
$$\uparrow\uparrow \text{NLS} = \frac{\uparrow \text{absoliutus neutrofilų skaičius}}{\downarrow \text{absoliutus limfocitų skaičius}} = \frac{\uparrow \text{neutrofilų procentinė išraiška}}{\downarrow \text{limfocitų procentinė išraiška}}$$

#### 4 pav. Neutrofilų ir limfocitų santykio apskaičiavimas

Prasidėjus uždegiminiam procesui, NLS augimą nulemia išskiriamas didesnis kiekis endogeninių kortikosteroidų ir katecholaminų bei padidėjusi chemokinių aktyvacija. Chemokinai skatina neutrofilų atpalaidavimą iš kaulų čiulpų į kraujotaką bei prailgina neutrofilų gyvavimo trukmę [40, 41]. Kortikosteroidai ir endogeninis katecholaminas (epinefrinas) skatina leukocitozę ir limfopeniją [42].

Įvairių uždegiminių ligų diagnostikoje plačiai naudojami bendrieji NLS vertinimo principai (5 pav.) [43]:

- NLS nuo 1 iki 3 vertinamas kaip normos rodiklis;
- nuo 6 iki 9 – lengvas uždegiminis atsakas;
- nuo 9 iki 18 – vidutinio stiprumo uždegiminis atsakas;
- daugiau nei 18 – stiprus uždegiminis atsakas.



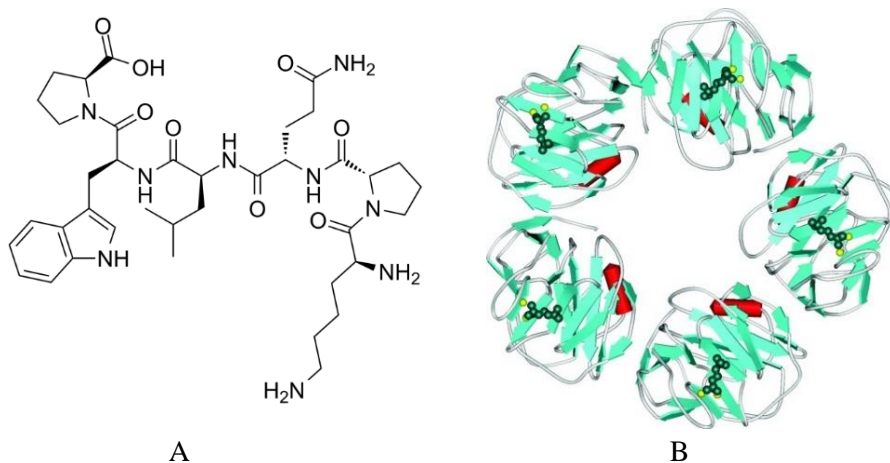
#### 5 pav. Neutrofilų ir limfocitų santykio vertinimo principai (pritaikyta pagal prieigą internete <<https://emcrit.org/pulmcrit/nlr/>>)

Siekiant tikslesnio NLS panaudojimo klinikinėje praktikoje, rekomenduojama NLS vertinti atsižvelgiant į esamą klinikinę situaciją. Atliekama vis daugiau klinikinių tyrimų norint nustatyti optimalią NLS ribinę vertę atskiroms infekcijoms. Literatūroje esama tyrimų apie NLS ribinę vertę apendicito, pankreatito, sepsio, bakteremijos, pneumonijos, COVID-19 infekcijos diagnostikoje [44–47], tačiau duomenų apie NLS panaudojimą chorioamnionito diagnostikai randama nedaug.

M.A. Kim su bendraautoriais 2014 m. išspausdino savo tyrimo rezultatus, įrodančius, kad NLS reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą yra geresnė nei motinos kraujo CRB ir leukocitų skaičiaus vertinimas. Nustatyta, kad optimali NLS ribinė vertė, skirta prognozuoti histologiniam chorioamnionitui, yra 6,48. Į šį tyrimą buvo įtrauktos visos nėščios moterys, kurioms diagnozuotas priešlaikinis gimdymas nuo 24 iki 37 nėštumo savaitės [48].

### 3.3.4.1.3. C reaktyvusis baltymas

C reaktyvusis baltymas yra kepenyse sintetinamas ūmios fazės proteinas. Tai ciklinis pentamerinis oligoproteinas, sudarytas iš penkių identiškų neglikolizuotų polipeptidinių subvienetų, susijungusių nekovalentinėmis jungtimis. Kiekvieną subvienetą sudaro 206 aminorūgštys, kurios suformuoja stabilią disko formos pentamerinę struktūrą (6 pav.) [49, 50].



**6 pav.** A – C reaktyviojo baltymo biocheminė struktūra (pritaikyta pagal prieigą internete <<https://www.medchemexpress.com/c-reactive-protein-crp-201-206.html>>. B – C reaktyviojo baltymo molekulinė struktūra (pritaikyta pagal S. Black 2004 [45])

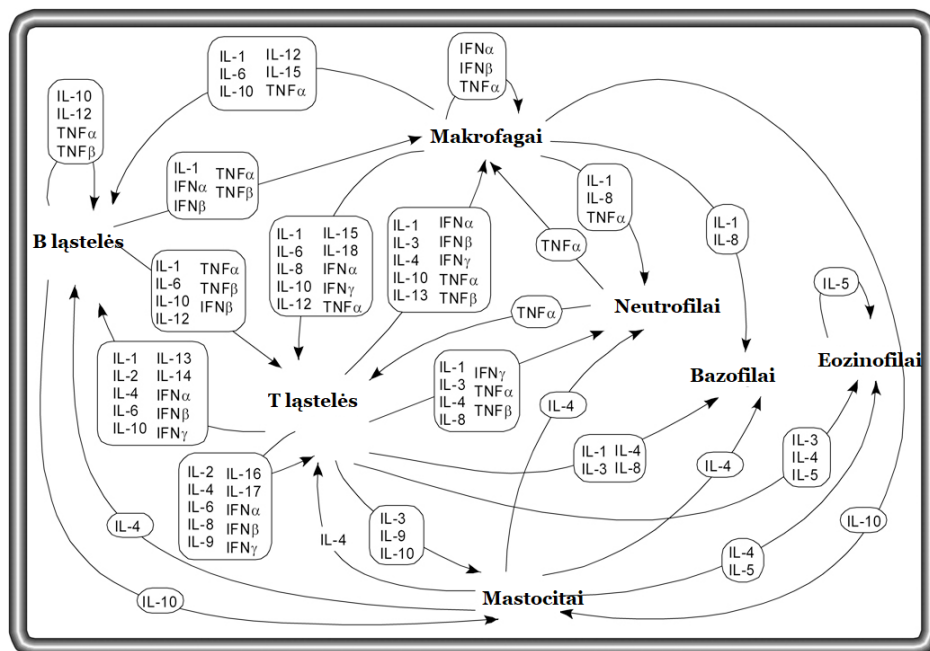
CRB sintezę skatina uždegiminis procesas (bakterinė, virusinė, parazitinė infekcija), traumos, operacijos, audinių nekrozė bei kiti audinių pažeidimai. Bakterinės infekcijos metu dažniausiai yra pažeidžiamos ląstelių membranos ir atsideda fosfocholino molekulė, prie kurios jungiasi CRB. Ši sąveika aktyvuoja tolesnę CRB sintezę, todėl bakterinės infekcijos metu šio proteino

koncentracija kraujyje ženkliai išauga [49]. Daugelio virusinių infekcijų metu uždegiminis procesas yra viduląstelinis, nepažeidžiantis ląstelių membranos, todėl virusinių infekcijų metu šis mechanizmas nėra aktyvuojamas ir aukšto CRB koncentracijos pakilimo nestebima [51]. Prasidėjus bakterinei infekcijai, CRB sintezė prasideda apytiksliai po 6–8 valandų, CRB koncentracija dvigubėja kas 8 valandos ir piką pasiekia po 36–50 valandų nuo infekcijos pradžios [52].

Siekiant nustatyti diagnostinių testų tikslumą prognozuojant histologinį chorioamnionitą, 2018 m. buvo atlikta sisteminė apžvalga ir metaanalizė, kuri įtraukė 29 tyrimus, publikuotus 1985–2016 metais, kuriuose daugiau nei keturi tūkstančių tiriamųjų. Metaanalizės metu nustatytas CRB jautrumas prognozuojant histologinį chorioamnionitą siekė 68,7 proc. (95 proc. PI: 58–77), o specifiškumas – 77,1 proc. (95 proc. PI: 67–84) [8].

#### 3.3.4.2. Vaisiaus vandenų uždegiminiai žymenys

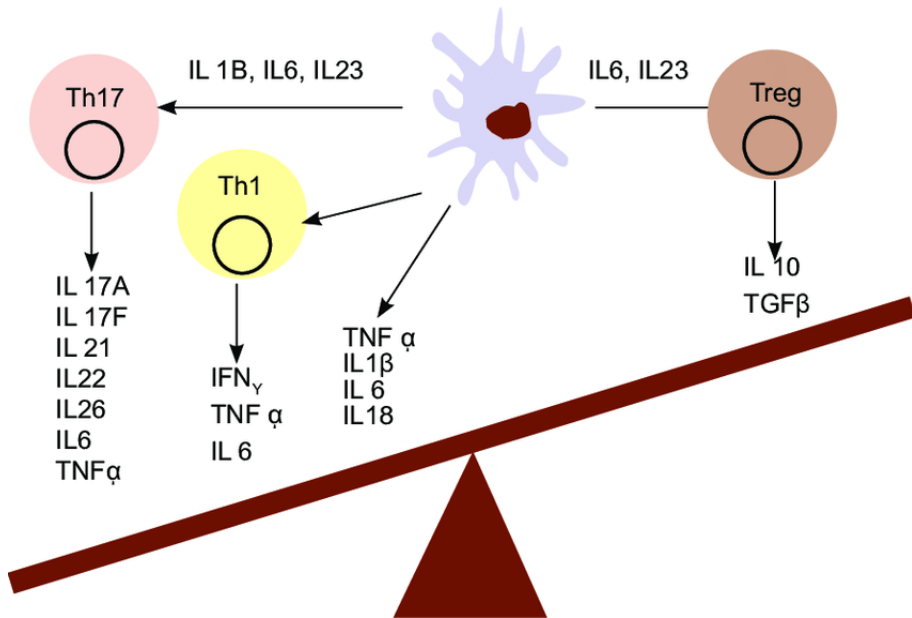
Citokinai yra bendrinis mažos molekulinės struktūros baltymų, kurie turi specifinį poveikį ląstelių tarpusavio sąveikai, pavadinimas. Citokinai skirstomi į mažesnes grupes pagal atliekamą funkciją arba juos gaminančių ląstelių pavadinimus: limfokinai (gaminami limfocitų), monokinai (gaminami monocitų), chemokinai (citokinai, turintys chemotaktinę veiklą) ir interleukinai (gaminami vienu leukocitų ir veikiantys kitus leukocitus) [53]. Skirtingų tipų ląstelės gali išskirti vienodus citokinus arba tas pats citokinas gali būti išskiriamas kelių skirtingų tipų ląstelių. Citokinai niekada neveikia pavieniui, o dažniausiai sukelia procesų kaskadą, stimuliuodami vieni kitų gamybą (7 pav.) [54].



**7 pav.** Citokinų tinklas (parengta pagal J. M. Zhang 2007 [53]).

Santrumpos: IL – interleukinas, TNF – vėžio nekrozės faktorius, IFN – interferonas.

Citokinų funkcijos apima imuninio atsako ar uždegimo reguliavimą ir kraujo ląstelių gamybos stimuliavimą. Citokinai pagal įtaką imuniniam atsakui dar skirstomi į prouždegiminius ir antiuždegiminius. Prouždegiminiai citokinai (IL-1, IL-4, IL-6, IL-12,  $\alpha$ -interferonas, TNF- $\alpha$  ir kiti) stimuliuoja imuninį atsaką ir užveda uždegiminę kaskadą [51]. Antiuždegiminiai citokinai (IL-10, IL-11, IL-13, vėžio augimo faktorius- $\beta$  ir kiti) slopina imuninį atsaką, apsaugodami organizmą nuo sisteminio uždegiminio atsako (8 pav.) [55, 56].



**8 pav.** Prouždegiminių ir antiuždegiminių citokinų balansas (parengta pagal V. V. Bamola 2013 [56]).

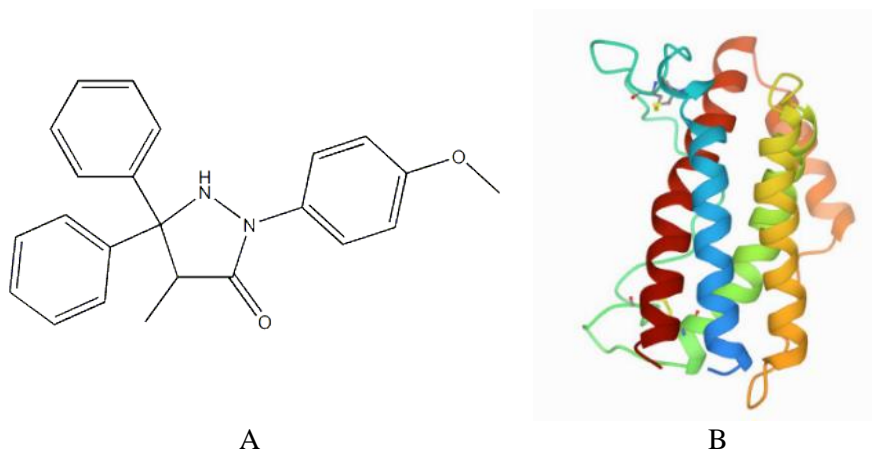
Santrumpos: IL – interleukinas, TGF – vėžio augimo faktorius, TNF – vėžio nekrozės faktorius, IFN – interferonas, Treg – T reguliacinės ląstelės.

Mokslinėje literatūroje daugiausia duomenų randama apie vaisiaus vandenų IL-6, MMP-8 ir TNF- $\alpha$  reikšmę chorioamnionito diagnostikoje. Vaisiaus vandenų sTLR-2, sTLR-4 ir  $\alpha$  defensinų reikšmė chorioamnionito diagnostikai skirtinguose tyrimuose vertinama prieštaringai. O duomenų apie suPAR tyrimus vaisiaus vandenyse iki šiol nebuvo paskelbta, tačiau buvo nustatyta didelė kraujo suPAR diagnostinė vertė įvairių infekcijų, įskaitant ir chorioamnionitą, diagnostikoje.



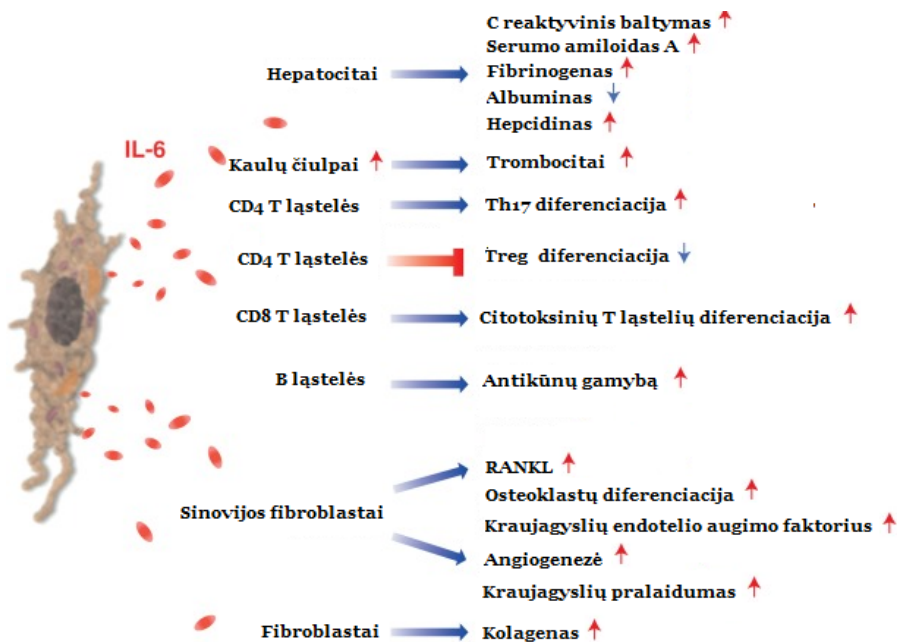
### 3.3.4.2.1. Interleukinas 6

Interleukinai – tai pagrindiniai ūmios uždegiminės fazės citokinai, kuriuos gamina monocitai ir makrofagai kaip atsaką į uždegiminį procesą. Literatūroje randama daugiausia duomenų apie IL-6 reikšmę priešlaikinio gimdymo ir intrauterinės infekcijos patogenezėje [57, 58]. IL-6 – glikoproteinas, sudarytas iš 212 aminorūgščių, suformuojančių 4 spiralės formos subvienetus, tarpusavyje sujungtus kilpinėmis jungtimis ir mini spiralėmis (9 pav.) [59].



**9 pav.** A – Interleukino 6 biocheminė struktūra (parengta pagal prieigą internete <[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7274561.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7274561.htm)>). B – Interleukino 6 molekulinė struktūra (parengta pagal B. Jacobsson 2003 [58])

Uždegimo metu IL-6 išskiria įvairios ląstelės: T-limfocitai, B-limfocitai, monocitai, fibroblastai, keratinocitai, endotelio ląstelės, adipocitai ir vėžinės ląstelės. Uždegimo židinyje atpalaiduotas IL-6 hematogeniniu keliu keliauja į kepenis ir skatina ūminės fazės baltymų (CRP, serumo amiloido A, fibrinogeno, haptoglobino,  $\alpha$ 1-antitripsino, hepcidino) sintezę [60]. Kai IL-6 pasiekia kaulų čiulpus, skatina megakariocitų brendimą ir trombocitų susidarymą [61]. Be to, IL-6 skatina kitų imuninių ląstelių diferenciaciją: B ląstelių diferenciaciją į antikūnus gaminančias plazmines ląsteles, naiviųjų CD4<sup>+</sup> T ląstelių – į Th17, CD8<sup>+</sup> T ląstelių – į citotoksines T ląsteles, bet slopina Treg diferenciaciją (10 pav.) [62–64].



**10 pav.** IL-6 imunomoduliacinė funkcija (parengta pagal T. Tanaka 2014 [65]).

Santrumpos: Treg – reguliacinės T ląstelės, RANKL – branduolio faktoriaus  $\kappa$ B ligando receptoriaus aktyvatorius (angl. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*).

Siekta nustatyti ribinę optimalią IL-6 koncentraciją vaisiaus vandenyse chorioamnionito diagnostikoje, tačiau atliktuose tyrimuose stebimos skirtingos reikšmės. Mičigano mokslininkai 1993 m. vieni pirmųjų ištyrė IL-6 koncentraciją amniocentezės būdu paimtuose vaisiaus vandenyse, esant priešlaikiniam neišnešioti dangalų plyšimui, ir nustatė, kad IL-6 koncentracija  $\geq 7,9$  ng/ml reikšmingai siejama su intraamnionine infekcija [66]. Vėlesniuose tyrimuose, taip pat tiriant amniocentezės būdu paimtus vaisiaus vandenius, nustatyta mažesnė optimali ribinė IL-6 koncentracija, kuri svyruoja nuo 745 pg/ml iki 2,6 ng/ml [67, 68]. Vaisiaus vandenų IL-6 tyrimo diagnostinė vertė siekia net 90 proc., o jautrumas – 76,2 proc. [67]. Daug dėmesio buvo skirta greitųjų testų kūrimui, panaudojant nustatytas ribines vertes. Atliekant greituosius testus nedidelis kiekis amniocentezės būdu paimtų vaisiaus vandenų užlašinamas ant juostinio ar kasetinio testo. Jei paimtuose vaisiaus vandenyse IL-6 koncentracija viršija nustatytą ribinę reikšmę, stebimas teigiamas testo rezultatas. Greitojo testo, kuriame IL-6 ribinė vertė 745 pg/ml, jautrumas siekia 85,7 proc., o specifiškumas 64,1 proc.

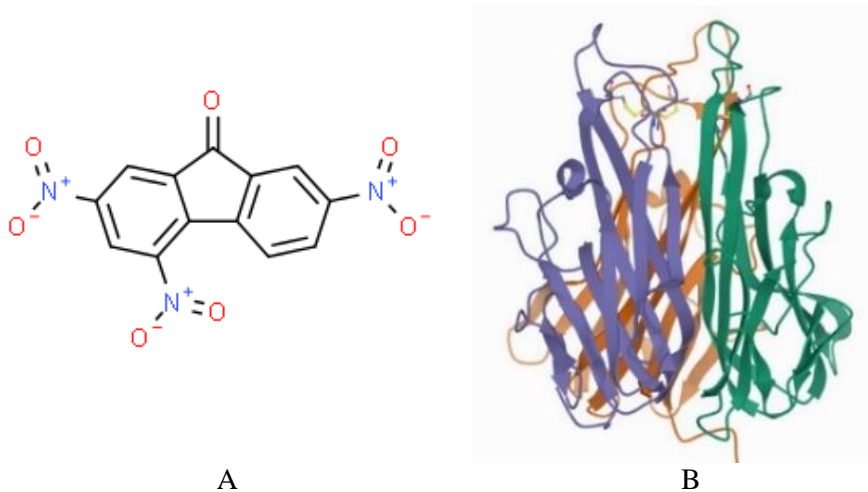
Kai IL-6 ribinė vertė 1 000 pg/ml, jautrumas išlieka 85,7 proc., bet specifiskumas kiek aukštesnis – 68,9 proc. [69].

#### 3.3.4.2.2. Vėžio nekrozės faktorius $\alpha$

TNF – transmembraninis proteinas, sudarytas iš 233 aminorūgščių grandinių, suformuojančių 3 identišką polipeptidines grandines, susijungusias į trimerinę struktūrą (11 pav.) [70]. TNF- $\alpha$  randama visose ląstelėse, išskyrus eritrocitus. Bakterijoms kolonizavus infekcijos židinį, TNF- $\alpha$  yra vienas anksčiausiai infekcijos židinyje nustatomų citokinų. Uždegimo metu daugiausiai TNF- $\alpha$  išskiriamas iš makrofagų, kiek mažiau iš monocitų, NK ląstelių, limfocitų ir kraujagyslių endotelio ląstelių [71].

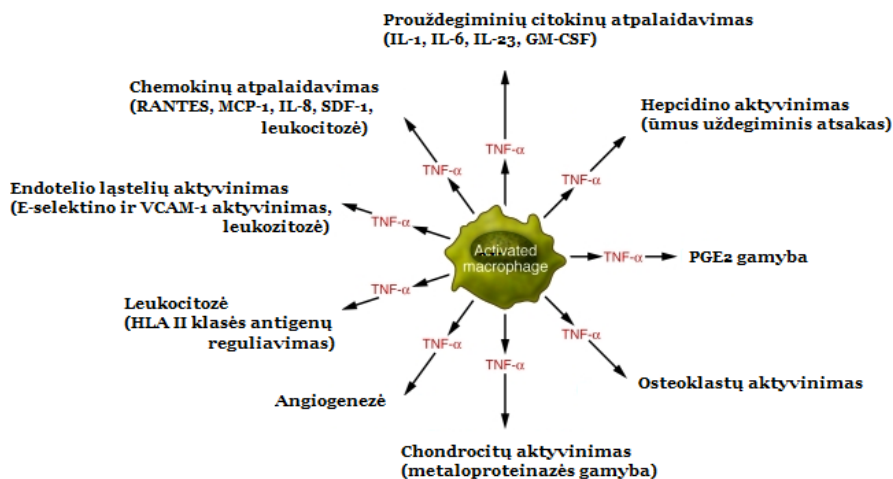
TNF- $\alpha$  būdingas platus biologinis poveikis: reguliuoja IL-1 receptorių raišką ląstelėse bei stimuliuoja kitų svarbių citokinų (IL-6 ir IL-8) gamybą, skatina T ir B limfocitų gamybą, neutrofilų judėjimą į infekcijos židinį, sukelia ląstelių apoptozę (12 pav.) [72, 73].

N. Thomakos su kolegomis 2001 m. nustatė, kad amniocentezės būdu paimtuose vaisiaus vandenyse TNF- $\alpha$  vertė  $> 6,3$  pg/ml susijusi su teigiamu vaisiaus vandenų pasėlio tyrimu. Šios nustatytos optimalios ribinės TNF- $\alpha$  vertės jautrumas siekia 73,8 proc., o specifiskumas – 70,1 proc. [74].



**11 pav. A** – Vėžio nekrozės faktoriaus  $\alpha$  biocheminė struktūra (parengta pagal prieigą internete

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8207.html>). **B** – Vėžio nekrozės faktoriaus  $\alpha$  molekulinė struktūra (parengta pagal M. J. Eck 2003 [70])



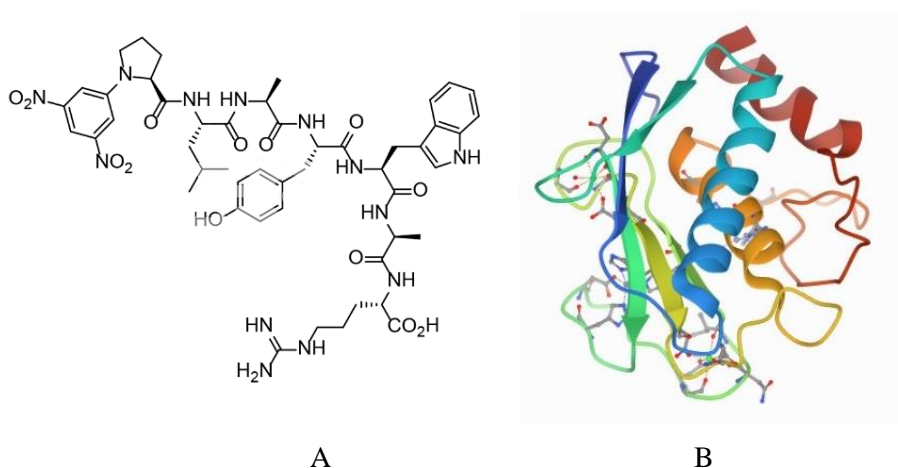
**12 pav.** Vėžio nekrozės faktoriaus  $\alpha$  imunomoduliacinė funkcija (pritaikyta pagal F. M. Brennan FM 2008 [73]).

Santrumpos: IL – interleukinas, GM-CSF – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), PGE – prostaglandinai, HLA – žmogaus leukocitų antigenai (angl. *human leukocyte antigen*), VCAM – kraujagyslių adhezijos molekulė (angl. *vascular cell adhesion molecule*), RANTES – chemokinas, atsakingas už uždegimo reguliaciją, T ląstelių raišką ir išskyrimą (angl. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), MCP – monocitų chemoatraktinis baltymas (angl. *monocyte chemoattractant protein*), SDF – stromos ląstelių išskirtas baltymas (angl. *stromal cell-derived factor*).

### 3.3.4.2.3. Matriksio metaloproteinazė 8

MMP – tai proteazių, turinčių savo sudėtyje cinko ir kalcio jonų, grupė. Šiuo metu žinomos 23 MMP šeimos narės, kurios pagal struktūrines ypatybes ir ardomą substratą skirstomos į šešis pošeimius: kolagenazes, stromelizinus, matrilizinus, želatinazes, membraninio tipo ir kitas MMP [75, 76]. Visų MMP struktūra panaši, susidedanti iš 5 pagrindinių komponentų: signalinio peptido (svarbaus MMP išskyrimui iš ląstelės); propeptido (svarbaus palaikant neaktyvią MMP formą); katalizinio metaloproteinazės domeno (būtino fermentiniam aktyvumui); ašinio peptido (sujungiančio katalitinį domeną su hemopeksino domenu) ir hemopeksino domeno (nulemiančio MMP gebą skaidyti atitinkamą substratą) [77, 78]. MMP sudarytos iš 390 aminorūgščių,

kurios sudaro neglikolizintas polipeptidines grandines, tarpusavyje sujungtas nekovalentinėmis jungtimis (13 pav.) [79].



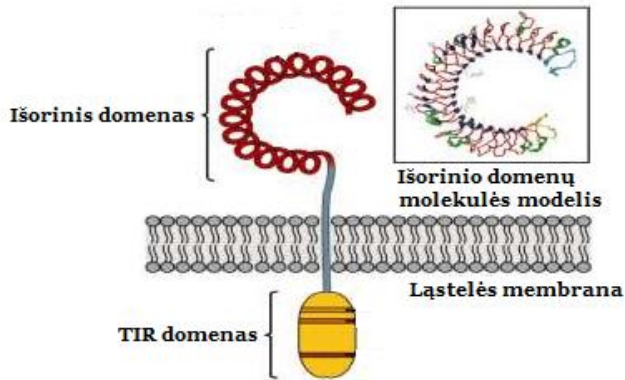
**13 pav.** A – Matrikso metaloproteinazės 8 biocheminė struktūra (pritaikyta pagal prieigą internete <<https://cpcscientific.com/products/catalog-peptides/MMPS-014/>>). B – Matrikso metaloproteinazės 8 molekulinė struktūra (pritaikyta pagal I. Bertini 2006 [79])

MMP-8 priklauso kolagenazių šeimai, kaupiama neutrofiluose ir iš jų atpalaiduojama, neutrofilams patekus į infekcijos židinį [80]. MMP-8 pagrindinė funkcija yra I, II ir III tipo kolageno skaidymas, tačiau taip pat skatina imuninių ląstelių migraciją į infekcijos židinį bei indukuoja IL-6 ir IL-8 gamybą [81].

Padidėjusi MMP-8 koncentracija siejama su padidėjusia vaisiaus vandens infekcijos, gresiančio priešlaikinio gimdymo ir nepageidaujamų naujagimių išeičių rizika [82, 83]. J.S. Parkas su bendraautoriais dar 2001 m. atliko tyrimą, kuriame nustatyta ribinė optimali MMP-8 vertė amniocentezės būdu paimtuose vandenyse siekė 23 ng/ml [84], o T. Myntti su kolegomis 2016 m. nustatė kiek didesnę optimalią vertę – 41,5 mg/ml [85]. MMP-8 ribinės vertės taip pat buvo naudotos greitiesiems testams kurti. Greitojo testo, kuriame nustatyta ribinė MMP-8 vertė 20 ng/ml, jautrumas siekė 97 proc., o specifiskumas – 63 proc. [86].

#### 3.3.4.2.4. Transmembraniniai atpažinimo (*Toll-like*) receptoriai

*Toll-like* receptoriai – tai transmembraniniai glikoproteinai, vieni pirmųjų atpažįstantys infekcijos sukėlėją ir stimuliuojantys įgimtą imunitetą. TLR sudaryti iš 3 domenu: išorinio (ekstraląstelinio), transmembraninio ir vidinio (intraląstelinio). Ekstraląsteliniai domenai yra atsakingi už patogenų atpažinimą ir surišimą, transmembraninis domenas tarpininkauja perduodant signalą į vidinį domeną iš išorinio domeno. Vidinį domeną sudaro interleukino receptoriai, todėl šis domenas dar vadinamas TIR domenu (*Toll* interleukino-1 receptoriai). Šis domenas sudarytas iš 150 aminorūgščių (14 pav.) [87]. TLR atpažįsta specifinius mikrobu paviršiaus komponentus, tokius kaip nemetilinta dvigubos grandinės dezoksiribonukleorūgštis, vienos grandinės ribonukleino rūgštis, lipoproteinus, lipopolisacharidus ir flagelinus [88].



**14 pav.** *Toll-like* receptorių struktūra (parengta pagal U. Tiwar 2015 [89]).  
Santrumpos: TIR – *Toll* interleukino-1 receptoriai.

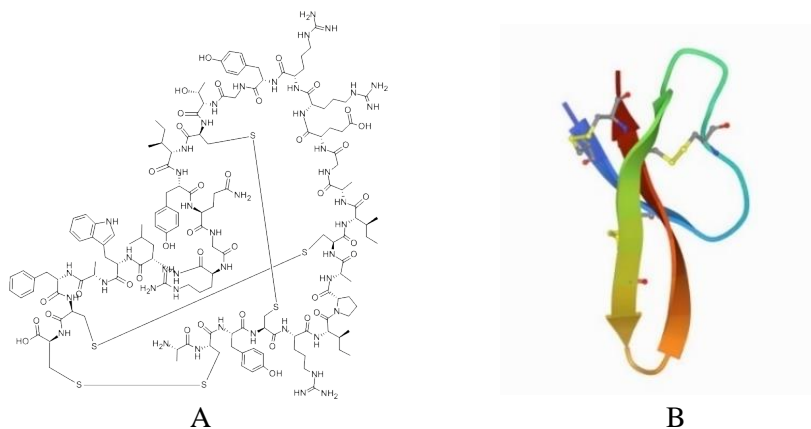
Iki šiol nustatyta 10 skirtingų žmogaus organizmui būdingų TLR funkcinių tipų (TLR1–10) [90]. TLR-2 ir TLR-4 randama vaisiaus dangaluose [21, 91]. TLR-2 yra vienas iš universaliausių TLR, nes turi savybę sudaryti heterodimerus su sTLR-1 ir sTLR-6, todėl gali atpažinti daugiau specifinių mikroorganizmų komponentų nei kiti TLR tipai. TLR-2 atpažįsta gramteigiamų bakterijų lipoproteinus ir peptidoglikanus, lipoteicho rūgštis ir grybelinį zimozaną. TLR-2 gali atpažinti dažnai makštyje randamas mikoplazmas ir ureaplazmas, grybelio sukėlėjus ir gramteigiamas bakterijas, tokias kaip B grupės streptokokas [21, 22]. TLR-4 pagrindinė funkcija – atpažinti gramneigiamų bakterijų lipopolisacharidus. Todėl TLR-4 gali

atpažinti kitus mikroorganizmus, dažnai nustatomus intrauterinės infekcijos metu, kurių neatpažįsta TLR-2: *Escherichia coli*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Sneathia* ir kitas gramneigiamas bakterijų rūšis [21–25].

C. Andryso su kolegomis atliktame tyrime nustatyta, kad tirpus TLR-2 amnocentezės būdu paimtuose vandenyse yra geras prognostinis histologinio chorioamnionito žymuo [92]. A.T. Dulay su kolegomis savo tyrime nustatė, kad tirpaus TLR-2 lygis nepriklauso nuo intraamnioninės infekcijos buvimo, tačiau kinta priklausomai nuo nėštumo laiko: aukšta tirpaus TLR-2 koncentracija vaisiaus vandenyse stebima iki 30 nėštumo savaičių ir laipsniškai mažėja nuo 30 savaitės iki gimdymo termino [93].

#### 3.3.4.2.5. A defensinai

Defensinai yra katijoniniai, mikrobicidiniai peptidai, sudaryti iš 18–45 aminorūgščių, veikiantys prieš daugelį gramneigiamų ir granteigiamų bakterijų, grybelių ir virusų, kuriuose yra trys poros intramolekulinių disulfidinių jungčių (15 pav.) [94, 95]. Atsižvelgiant į jų dydį ir disulfidinių jungčių modelį, defensinai skirstomi į alfa, beta ir teta kategorijas. Teta kategorijos defensinų žmogaus organizme nenustatoma. Didžioji dalis  $\alpha$  defensinų randama neutrofiluose, todėl jie dar vadinami žmogaus neutrofiliniais peptidais (angl. *Human neutrophil peptides*, HNP). Mažiau  $\alpha$  defensinų randama makrofaguose ir plonosios žarnos *Paneth* ląstelėse [96].



**15 pav.** A –  $\alpha$  defensinų biocheminė struktūra (parengta pagal prieigą internete

<[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7291980.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7291980.htm)>). B –  $\alpha$  defensinų molekulinė struktūra (parengta pagal A. Szyk 2006 [95])

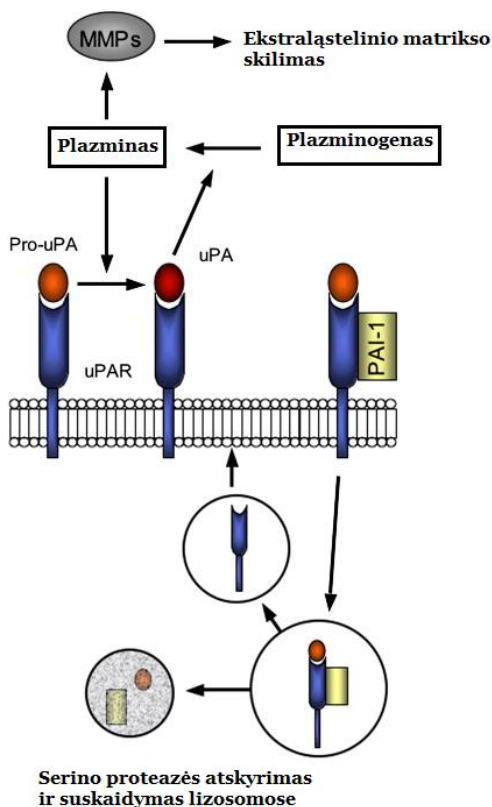
$\alpha$  defensinai stiprina priešūždegiminę reakciją stimuliuodami TNF- $\alpha$ , IL-1, histamino ir prostaglandino D2 gamybą, reguliuodami komplemento aktyvaciją ir slopindami IL-10 gamybą monocituose. Taip pat  $\alpha$  defensinai konkuruoja su adrenokortikotropiniu hormonu dėl prisijungimo prie receptorių, todėl mažina imunitetą slopinančių gliukokortikoidų gamybą [97].

$\alpha$  defensinų randama vaisiaus vandenyse ir jų dangaluose. Nustatyta, kad  $\alpha$  defensinų koncentracija amniocentezės būdu paimtuose vaisiaus vandenyse statistiškai reikšmingai didesnė toje moterų grupėje, kurioje nustatyta intrauterinė infekcija, nei grupėje, kurioje šios infekcijos nėra. Padidėjusi  $\alpha$  defensinų koncentracija vaisiaus vandenyse taip pat susijusi ir su neigiamomis naujagimių baigtimis [98–100]. M. Lucovnikas su bendraautoriais 2010 m. ištyrė  $\alpha$  defensinų koncentraciją makšties išskyrose ir nustatė, kad  $\alpha$  defensinų koncentracija  $> 2\ 065$  ng/ml reikšmingai prognozuoja vaisiaus uždegiminio atsako sindromą (testo jautrumas siekė 100 proc., specifiškumas – 53 proc.), o koncentracija  $> 9\ 379$  ng/ml parodo padidėjusią naujagimio mirties riziką ar nervų sistemos pažeidimą, tačiau testo jautrumas siekė tik 29 proc., specifiškumas – 100 proc. [101].

#### 3.3.4.2.6. Urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus

Urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus (uPAR) yra su glikofosfatidilinozoliu sujungtas ląstelių membranos receptoriaus, sudarytas iš trijų homologinių domenų. uPAR yra ekspresuojamas įvairių tipų ląstelėse, įskaitant neutrofilus, limfocitus, monocitus, makrofagus, endotelio ir naviko ląsteles [102]. Prie uPAR jungiasi urokinazės tipo plazminogeno aktyvatorius (uPA) – serino proteazė. Šios serino proteazės skatina plazminogeno skilimą, kurio metu atpalaiduojamas plazminas, aktyvuojantis ekstraląstelines matrikso metaloproteinazes ir atgaliniu ryšiu stimuliuojantis uPA/uPAR kaskadą. Inhibuotas uPAR patenka į ląstelių lizosomas, kuriose atskirta serino proteazė suskaidoma, o atpalaiduotas neaktyvus receptoriaus grąžinamas į ląstelės membraną (16 pav.) [103]. uPAR dalyvauja atliekant įvairias imunologines funkcijas: ląstelių adheziją, migraciją, chemotaksį, proteolizę, imuninės sistemos aktyvavimą, audinių rekonstravimą, invaziją ir signalo perdavimą [104].





**16 pav.** Urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus struktūra, aktyvavimas ir inhibavimas (pritaikyta pagal S. E. Rademakersa 2008 [103]). Santrumpos: MMP – matrikso metaloproteinazė, uPA – urokinazės tipo plazminogeno aktyvatorius, uPAR – urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorių, PAI – plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius.

Literatūroje randama daugiau nei 1 000 tyrimų, įrodančių uPAR reikšmę įvairios kilmės uždegimų diagnostikoje. uPAR turi dideles ne tik diagnostines, bet ir prognostines infekcijos išiečių reikšmes. Esama tik pavienių tyrimų apie serumo uPAR reikšmę chorioamnionito diagnostikoje, tačiau iki šiol nėra paskelbta tyrimų, analizuojančių uPAR koncentraciją vaisiaus vandenyse. Y. Cekmez su bendraautorais 2013 m. savo tyrime nustatė, kad serumo uPAR tyrimo jautrumas ir specifiskumas diagnozuojant histologinį chorioamnionitą yra toks pat kaip IL-6, tačiau didesnis nei CRP ir leukocitų skaičiaus [105].

### 3.4. Nėštumo priežiūros taktika, esant prieššlaikiniam neišnešiotam vaisiaus dangalų plyšimui

Diagnozavus prieššlaikinį neišnešiotą vaisiaus dangalų plyšimą, tolesnė nėštumo priežiūros taktika priklauso nuo [106, 107]:

- nėštumo trukmės;
- yra ar nėra chorioamnionito požymių;
- lėtinės infekcijos buvimo (ŽIV, HCV, HBV, lytinių organų HSV);
- yra ar nėra gimdymo veiklos;
- vaisiaus pimeigos;
- vaisiaus būklės;
- vaisiaus padėties.

Diagnozavus prieššlaikinį neišnešiotą vaisiaus dangalų plyšimą, atsižvelgiant į išvardytus veiksnius, pasirenkama laukimo arba nėštumo užbaigimo taktika.

#### 3.4.1. Laukimo taktika

Esant nėštumo laikui < 34 savaitės, nesant klinikinio chorioamnionito požymių bei esant gerai vaisiaus būklei, rekomenduojama laukimo taktika [106]. Pasirinkus laukimo taktiką, didėja chorioamnionito, endometrito, sepsio, placentos atsokos, kraujavimo bei vaisiaus žūties rizika. Dėl šių galimų komplikacijų rekomenduojamas nėščiosios ir vaisiaus būklės stebėjimas [107]:

- temperatūros matavimas ir pulso skaičiavimas 3 kartus per dieną;
- gimdos skausmingumo ir aktyvumo stebėjimas kasdien;
- išskyrų iš makšties pobūdžio vertinimas kasdien;
- bendrasis kraujo ir CRB tyrimai 1 kartą per savaitę, o įtarus, kad yra intrauterinė infekcija – dažniau;
- vaisiaus judesių skaičiavimas 2 kartus per dieną;
- vaisiaus širdies ritmo auskultavimas 1 kartą per dieną;
- nestresinis testas mažiausiai 2 kartus per savaitę;
- virkštelės kraujotakos tyrimas dopleriu ir vaisiaus vandenų kiekio vertinimas prireikus.

Pasirinkus laukimo taktiką, siekiant išvengti chorioamnionito išsivystymo, skiriama antibiotikų profilaktika [108–111]:

- 2 g ampicilino į veną kas 6 val. (tęsiama 48 val.);
- po 48 val. ampiciliną rekomenduojama keisti į geriamą amoksiciliną po 500 mg kas 8 val. arba 875 mg kas 12 val. (tęsiama 5 dienas);

- kartu nuo pirmos dienos skiriamas geriamas eritromicinas 250 mg kas 6 val. (tęsiama 7 dienas) arba azitromicinas 1 g vieną kartą.

### 3.4.2. Gimdymo sužadinimas

Gimdymo sužadinimo taktiką rekomenduojama rinktis, esant šioms situacijoms [106, 112, 113]:

- įtarus ar patvirtinus, kad yra chorioamnionitas (chorioamnionitas šiuo metu Lietuvoje diagnozuojamas remiantis klinikiniais diagnostikos kriterijais);
- prasidėjus kraujavimui;
- nestabili ar blogėjanti vaisiaus būklė;
- HELLP sindromas arba sunki preeklampsija;
- mekonijumi užteršti vaisiaus vandenys (sprendžiama individualiai);
- didžiosios vaisiaus raidos ydos;
- monochorioniniai arba monoamnioniniai dvyniai;
- nestabili motinos būklė.

Pasirinkus gimdymo sužadinimo taktiką, rekomenduojama skirti antibiotikų naujagimių ankstyvosios B grupės hemolizinio streptokoko sukeltos infekcijos profilaktikai [114].

### 3.5. Chorioamnionito komplikacijos

Chorioamnionitas yra susijęs su padidėjusia gimdos atonijos rizika, kas lemia didesnę kraujavimo po gimdymo riziką [115–117]. Dėl didesnio cezario pjūvių dažnio moterys, kurioms diagnozuotas chorioamnionitas, turi didesnę su operacija susijusių komplikacijų riziką: žaizdos infekcijų, endometrito, dubens tromboflebito, pilvo abscesų [115–118]. Taip pat literatūroje randama duomenų, kad chorioamnionitas motinos sepsio riziką po gimdymo didina net iki 12 kartų [119], tačiau sepsio ir kitų gyvybei pavojingų komplikacijų (krešėjimo sutrikimų, suaugusiųjų respiracinio distreso sindromo) rizika ženkliai sumažėja, jei skiriamas antibakterinis gydymas nėštumo metu ir po gimdymo [120, 121].

Chorioamnionitas komplikacijų riziką vaisiui ar naujagimiui padidina 2–3,5 karto, nepriklausomai nuo infekcijos trukmės [122]. Galimos chorioamnionito komplikacijos vaisiui ar naujagimiui yra perinatalinė mirtis, asfiksija, ankstyvas naujagimio sepsis, sepsinis šokas, pneumonija, meningitas, intraventrikulinis kraujavimas, smegenų baltosios medžiagos pažeidimas ir ilgalaikė negalia, įskaitant cerebrinį paralyžių, bei komplikacijos, susijusios su neišnešiotumu [123–128]. Literatūros

duomenimis, iki 40 proc. visų diagnozuotų naujagimių sepsių yra chorioamnionito komplikacijos [16]. Chorioamnionito atveju neišnešioti naujagimiai turi didesnę komplikacijų riziką nei išnešioti naujagimiai: perinatalinės mirties rizika neišnešiotam naujagimiui siekia 25 proc., išnešiotam – 6 proc., naujagimių sepsio rizika neišnešiotam naujagimiui siekia 28 proc., išnešiotam – 6 proc., pneumonijos rizika neišnešiotam naujagimiui siekia 20 proc., išnešiotam – 3 proc., 3 ar 4 laipsnio intraventrikulinio kraujavimo rizika neišnešiotam naujagimiui siekia 24 proc., išnešiotam – 8 proc. ir kvėpavimo sutrikimų rizika neišnešiotam naujagimiui siekia 62 proc., o išnešiotam – 35 proc. [125].

Chorioamnionitas taip pat glaudžiai siejamas su kūdikių neurologinio vystymosi sutrikimais, kuriuos gali sukelti asfiksija ir toksinis bakterijų produktų poveikis. Esama tyrimų, įrodančių chorioamnionito ryšį su vėluojančiu neurologiniu kūdikio vystymusi ar cerebriniu paralyžiumi [129–132]. Uždegiminiai pokyčiai chorioamnionito metu gali sukelti vaisiaus smegenų išemiją, intraventrikulinį kraujavimą ir periventrikulinę leukomaliaciją, kas siejama su ilgalaikėmis neurologinėmis ir psichinėmis ligomis [133–138].

Dėl galimos rizikos vaisiui ir motinai, nėštumo metu diagnozavus chorioamnionitą, rekomenduojama nėštumo nebetęsti, tačiau padidėja naujagimio komplikacijų rizika dėl neišnešiotumo (ūminis respiracinis distreso sindromas, kardiovaskulinės sistemos nebrandumas, retinopatija, periventrikulinė leukomaliacija, nekrotizuojantis enterokolitas ir kt.) [139]. Todėl, esant priešlaikiniam neišnešiotam vaisiaus dangalų plyšimui, labai svarbu kuo tikslesnė chorioamnionito diagnostika, kad būtų išvengta infekcijos komplikacijų ir būtų parinktas optimalus gimdymo laikas.

#### 4. DARBO METODIKA

Tyrimas buvo atliekamas 2017-2021 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Akušerijos ir ginekologijos centre. Vaisiaus vandenų imunologinių žymenų analizė buvo atliekama Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centre.

Tyrimui atlikti gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto 2017 m. liepos 4 d. leidimas Nr. 158200-17-931-434 (1 priedas) ir šio leidimo 2019 m. rugsėjo 19 d. papildymas Nr. 2019-LP-40 (2 priedas) bei Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos 2018 m. kovo 9 d. leidimas tvarkyti duomenis Nr. 2R-1765 (2.6-1.) (3 priedas). Mokslinį tyrimą rėmė Lietuvos mokslo taryba kaip mokslinių grupių projektą (Nr. S-MIP-19-57) ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

Į tyrimą buvo įtraukiamos nėščios moterys, kurios buvo hospitalizuotos į VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centrą dėl priešlaikinio neišnešio vaisiaus dangalų plyšimo, esant < 34 savaičių nėštumui. Visos tyrimo dalyvės buvo informuotos apie tyrimo tikslus, eigą, galimus nepatogumus, tyrimo rezultatų naudojimą užtikrinant konfidencialumą ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Informuoto asmens sutikimo formą dėl naujagimio dalyvavimo tyrime pasirašė abu tėvai. Moterys bet kuriuo metu galėjo nutraukti savo ar naujagimio dalyvavimą tyrime.

##### Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

- moters amžius  $\geq 18$  m.,
- vienvaisis nėštumas,
- nėštumo trukmė  $22^{+0}$ – $34^{+6}$  sav.,
- diagnozuotas PNVDP,
- informuoto asmens sutikimo formos pasirašymas.

##### Neįtraukimo kriterijai:

- daugiavaisis nėštumas,
- placentos pirmeiga,
- kraujavimas iš makšties,
- diagnozuotos vaisiaus vystymosi ydos,
- nestabili vaisiaus būklė,
- atsisakymas dalyvauti tyrime.

Įtraukus tiriamąsias į tyrimą buvo surenkami asmens sveikatos bei nėštumo anamnezės duomenys: moters amžius, ankstesnių nėštumų ir

gimdymų skaičius, lėtinės ligos, paskutinių mėnesinių data ir reguliarumas, nėštumo metu atlikti tyrimai bei diagnozuotos ligos. Po gimdymo renkamų duomenų bazė buvo papildyta gimdymo anamnezės duomenimis: gimdymo būdas, naujagimio gimimo svoris, Apgar įvertinimas bei virkštelės arterinio kraujo pH tyrimo rezultatai.

Nėštumo trukmė buvo nustatoma remiantis paskutinių mėnesinių pirma diena, jei mėnesinių ciklas reguliarus. Jei mėnesinių ciklas nereguliarus arba atlikus ultragarsinį tyrimą 11<sup>+0</sup>–13<sup>+6</sup> savaitę skirtumas > 5 dienos, nėštumo trukmė buvo nustatoma pagal ultragarsinio tyrimo duomenis.

Priešlaikinis neišnešiotas vaisius dangalų plyšimas buvo diagnozuojamas, jei apžiūros per makštį metu buvo stebimas vaisiaus vandenų tekėjimas. Esant neaiškiai diagnozei, buvo atliekamas testas, nustatantis makšties išskyrose placentos  $\alpha$  mikroglobuliną-1 (Amnisure<sup>®</sup>, Džermantaunas, JAV): esant teigiamam testui, patvirtinamas PNVDP.

Pagal Akušerijos metodikas, patvirtintas Lietuvos akušerių ir ginekologų draugijos ir skelbiamas Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministerijos tinklalapyje, bei VUL SK patvirtintas tyrimo ir gydymo procedūras bei protokolus [140, 141], visoms nėščiosioms, kurioms diagnozuotas PNVDP iki 34 savaičių, buvo skiriama antibiotikų profilaktika ir vaisiaus plaučių brandinimas. Antibiotikų profilaktikai buvo skiriama 2 g ampicilino į veną kas 6 val. 2 paras; po 2 parų buvo skirtas geriamas amoksicilinas po 500 mg kas 8 val. 5 dienas. Kartu buvo skiriamas geriamas eritromicinas po 250 mg kas 6 val. iš viso 7 dienas arba azitromicino 1 g atvykimo dieną ir 0,5 g penktą stebėjimo dieną. Vaisiaus plaučių brandinimui buvo skiriama deksametazono po 12 mg kas 12 val. į raumenis 2 kartus.

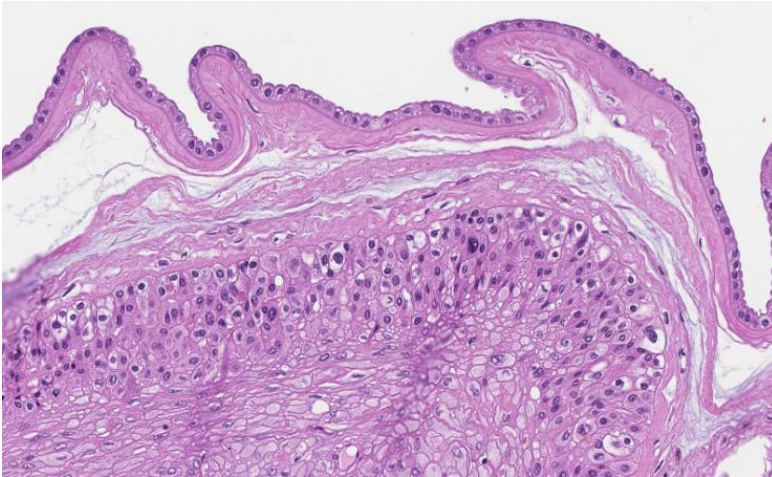
Klinikinis chorioamnionitas buvo diagnozuojamas, esant karščiavimui  $\geq 38$  °C ir bent 2 iš toliau išvardytų požymių:

- moters tachikardija (> 100 k./min.);
- vaisiaus tachikardija (> 160 k./min.);
- nemalonaus kvapo pūlingos išskyros arba vaisiaus vandenys;
- gimdos jautrumas (skausmingumas);
- leukocitozė (> 15 x 10<sup>9</sup>/l);
- CRB > 40mg/l.

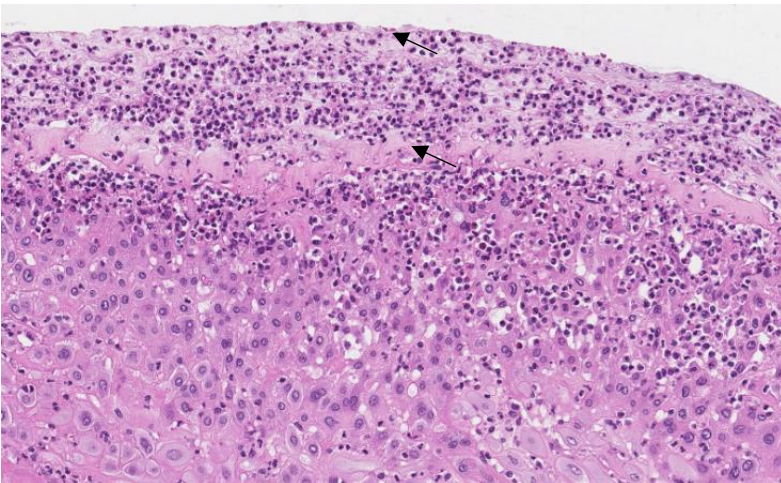
Pagal galiojančias VUL SK ištyrimo ir gydymo metodikas [142], esant priešlaikiniam gimdymui, visų gimdyvių placentos po gimdymo buvo siunčiamos ištirti histologiškai. Histologiniai placentos tyrimai buvo atliekami vieno tyrėjo Valstybiniame patologijos centre. Uždegiminiai pakitimai placentoje ir vaisiaus dangaluose buvo vertinami remiantis aprašytais Amsterdamo placentos darbo grupės ir Pediatrijos patologijos draugijos

Perinatalinės sekcijos diagnostikos kriterijais (3 ir 4 lentelės) [31, 32]. Nustačius PMN infiltraciją į chorioną ir amnioną, buvo diagnozuojamas histologinis chorioamnionitas (17 pav.). Remiantis histologinio tyrimo rezultatais visos dalyvės buvo skirstomos į 2 grupes: moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas (I grupė), ir kontrolinė grupė, t. y. moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas (II grupė).

A

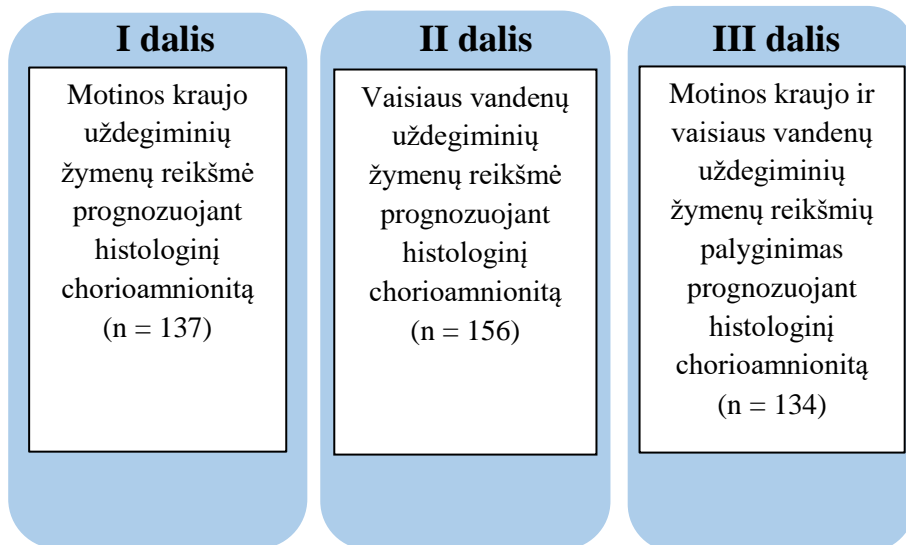


B



**17 pav.** A – Normalios placentos ir vaisiaus dangalų histologinė struktūra. B – Placentos ir vaisiaus dangalų struktūra, esant histologiniam chorioamnionitui (Valstybinio patologijos centro, VUL SK filialo nuotraukos). Rodyklėmis pažymėta polimorfonuklearinė uždegiminė infiltracija placentos ir vaisiaus dangaluose.

Tyrimas suskirstytas į tris dalis (18 pav.).



**18 pav.** Biomedicininio tyrimo dalys.

Santrumpos: n – imties dydis.

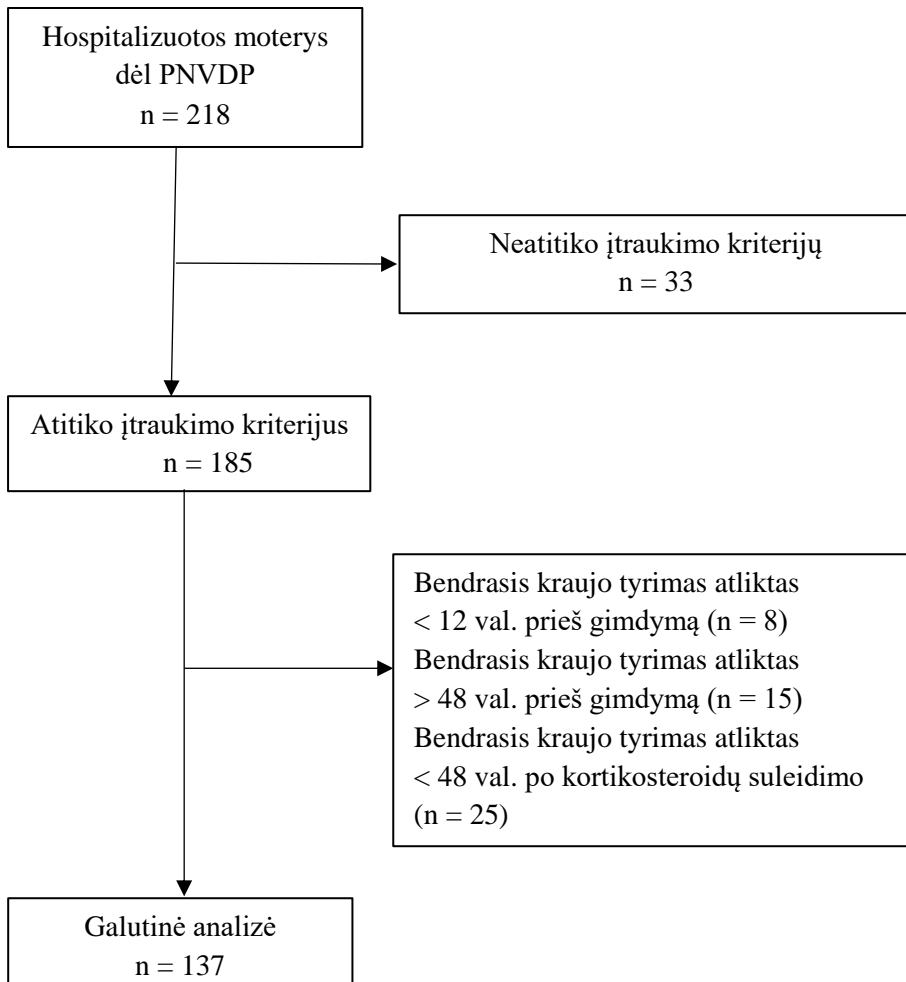
#### 4.1. I dalis. Motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą

Pirmoje dalyje siekta įvertinti motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmę prognozuojant histologinį chorioamnionitą. Vertinant motinos kraujo rezultatų reikšmę histologinio chorioamnionito prognozei, atrinkti tik tie atvejai, kai kraujo tyrimai buvo atlikti 12–48 val. iki gimdymo. Ilgesnis nei 12 val. laikotarpis iki gimdymo buvo pasirinktas siekiant sumažinti paklaidos tikimybę dėl kylančio uždegiminio atsako į patį gimdymo procesą. Trumpesnis nei 48 val. laikotarpis iki gimdymo buvo pasirinktas siekiant sumažinti paklaidos tikimybę dėl ilgo bevandenio laikotarpio tarp kraujo tyrimų paėmimo ir gimdymo: ilgėjant bevandeniam laikotarpiui didėja chorioamnionito rizika, todėl daugiau nei 48 val. iki gimdymo paimto kraujo tyrimo rezultatai gali neatspindėti uždegiminio proceso.

Vertinant motinos kraujo rezultatus, taip pat atsižvelgta į kortikosteroidų skyrimą. Kaip minėta, visoms nėščiosioms, esant PNVDP iki 34 sav., buvo skiriamas vaisiaus plaučių brandinimas deksametazonu. Kortikosteroidų vartojimas sukelia leukocitozę su formulės nuokrypiu į kairę ir reliatyvia limfopenija, kuri tęsiasi 24–48 val. Dėl šios priežasties pasirinkta vertinti tik



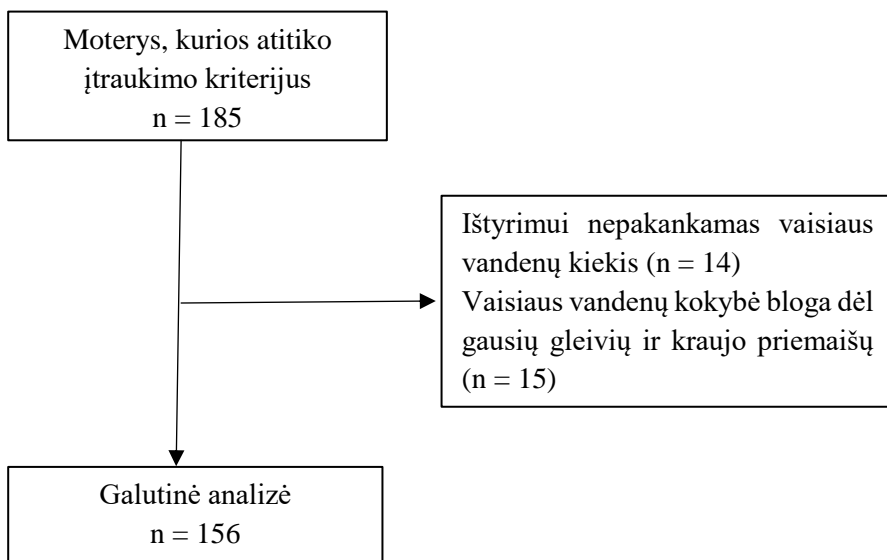
tuos kraujo tyrimus, kurie buvo atlikti vėliau nei 48 val. po kortikosteroidų skyrimo. Todėl, vertinant motinos kraujo rezultatų reikšmę histologinio chorioamnionito prognozei, į galutinę analizę įtrauktos 137 moterys ir jų naujagimiai (19 pav.).



**19 pav.** Tiriamųjų atrankos schema motinos kraujo tyrimo rodiklių analizei. Santrumpos: PNVDP – priešlaikinis neišnešiotą vaisiaus dangalų plyšimas, n – imties dydis.

#### 4.2. II dalis. Vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą

Antroje tyrimo dalyje siekta įvertinti vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmę prognozuojant histologinį chorioamnionitą. Vaisiaus vandenys buvo surenkami steriliais makšties skėtikliais neinvaziniu būdu apžiūros per makštį metu. Vaisiaus vandenų mėginiai buvo renkami kas antrą dieną, nucentrifuguojami 3 000 aps./min. greičiu 5 minutes, išskirstomi į frakcijas ir užšaldomi iki  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vaisiaus vandenų mėginiai, kurių kiekis buvo nepakankamas imunologinių žymenų analizei arba vaisiaus vandenyse buvo gausių gleivių ar kraujo priemaišų, buvo pašalinti iš tyrimo. Į galutinę analizę įtraukti tik tie vaisiaus vandenų mėginiai, kurie buvo paimti  $< 48$  val. iki gimdymo, taip siekiant sumažinti paklaidos tikimybę dėl ilgo bevandenio laikotarpio tarp mėginio paėmimo ir gimdymo. Todėl, vertinant vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmę histologinio chorioamnionito prognozei, į galutinę analizę įtrauktos 156 nėščiosios ir jų naujagimiai (20 pav.).

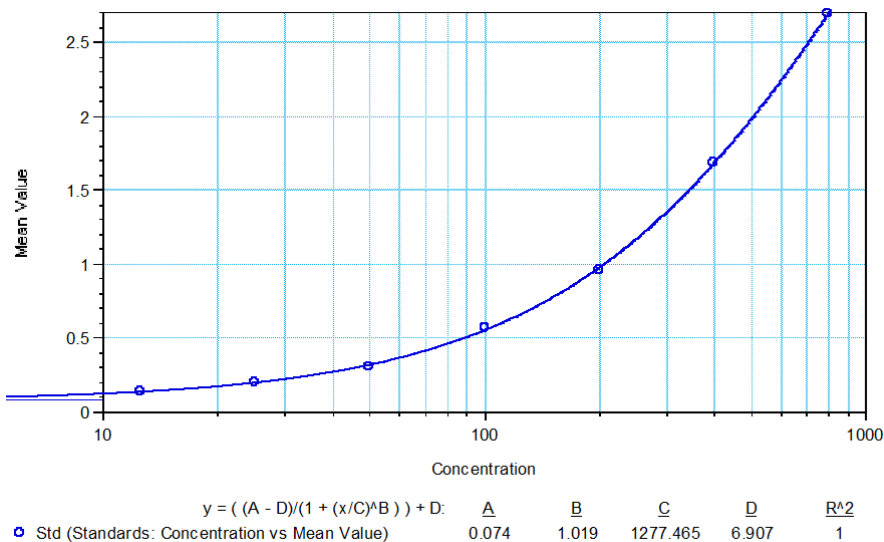


**20 pav.** Tiriamųjų atrankos schema imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse analizei.

Santrumpos: n – imties dydis.

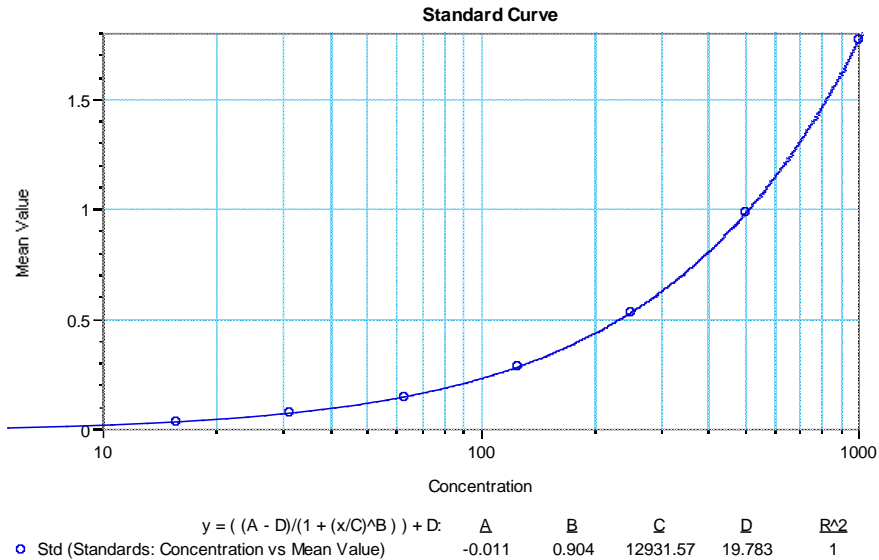
Imunologinių žymenų koncentracija vaisiaus vandenyse buvo nustatoma imunofermentiniu tyrimu (ELISA) (*Bender Medsystem*, Viena, Austrija). Visi imunologiniai tyrimai buvo atliekami vieno tyrėjo Inovatyvios medicinos centre. Mėginiai buvo atšildomi ir tiriami grupėmis. Mėginių skiedimas ir paruošimas analizei buvo atliktas remiantis komercinių rinkinių gamintojų rekomendacijomis.

IL-6 koncentracija nustatyta ELISA metodu panaudojus komercinį rinkinį „Human IL-6 Quantikine QuicKit ELISA“ (*R&D Systems*, Mineapolis, JAV). Keturių parametų logistinė standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 12,5–800 pg/ml ribose, naudojant specialią kompiuterinę programą, skirtą imunofermentinės analizės rezultatams įvertinti, *Gen5 Microplate Data Collection & Analysis Software* (*BioTek Instruments*, Vinuskis, JAV) (21 pav.). Rinkinio jautrumas (minimali nustatoma dozė) buvo 1,70 pg/ml. Mėginiai tyrimui buvo naudojami neskiesti, tačiau jei išmatuotas mėginio optinis tankis viršijo aukščiausio standarto optinio tankio reikšmę, mėginiai buvo atitinkamai skiedžiami 1:10, 1:100 arba 1:1000 ir tiriami dar kartą. Optinis tankis buvo matuojamas spektrofotometru (*BioTek Instruments*, Vinuskis, JAV).



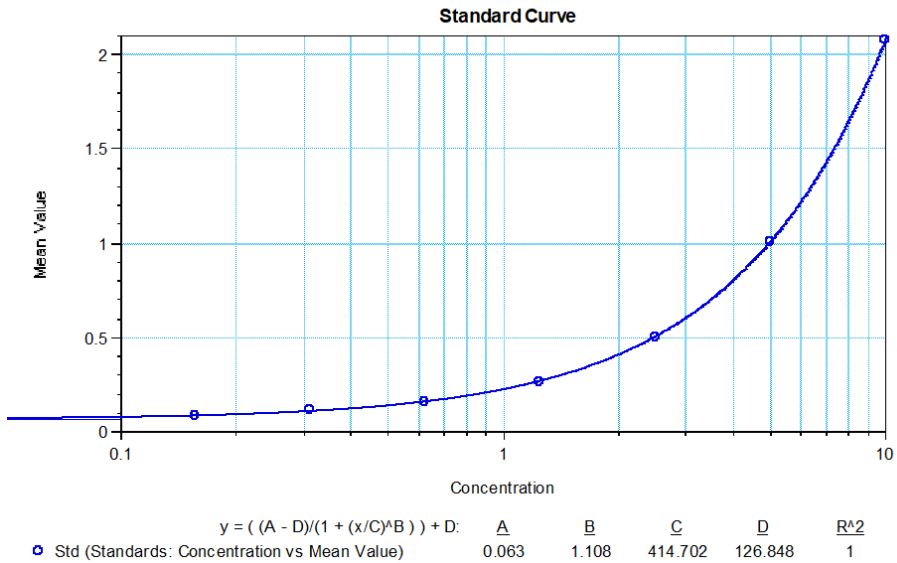
**21 pav.** Vieno IL-6 tyrimo metu gautos keturių parametų logistinės standartinės kreivės pavyzdys

TNF- $\alpha$  koncentracija nustatyta panaudojus komercinį rinkinį „Human TNF $\alpha$  ELISA Kit“ (*Life Technologies*, Voltamas, JAV). Keturių parametų logistinė standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 15,6–1 000 pg/ml ribose, rinkinio jautrumas buvo < 2 pg/ml (22 pav.). Mėginiai tyrimui buvo naudojami neskiesti, tačiau jei išmatuotas mėginio optinis tankis viršijo aukščiausio standarto optinio tankio reikšmę, mėginiai buvo atitinkamai skiedžiami 1:5 ir tiriama dar kartą.



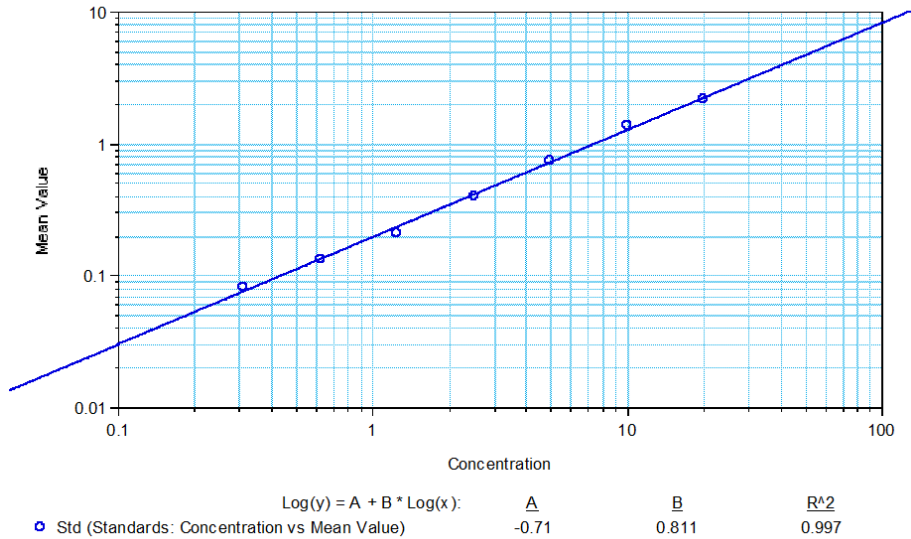
**22 pav.** Vieno TNF- $\alpha$  tyrimo metu gautos keturių parametų logistinės standartinės kreivės pavyzdys

MMP-8 koncentracija nustatyta panaudojus komercinį rinkinį „Human Total MMP-8, Quantikine ELISA“ (*R&D Systems*, Mineapolis, JAV). Keturių parametrų logistinė standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 0,156–10 ng/ml ribose, rinkinio jautrumas buvo 0,013 ng/ml (23 pav.). Mėginiai tyrimui buvo naudojami atskiesti 1:10, tačiau jei išmatuotas mėginio optinis tankis viršijo aukščiausio standarto optinio tankio reikšmę, mėginiai buvo atitinkamai skiedžiami 1:100 arba 1:1000 ir tiriami dar kartą.



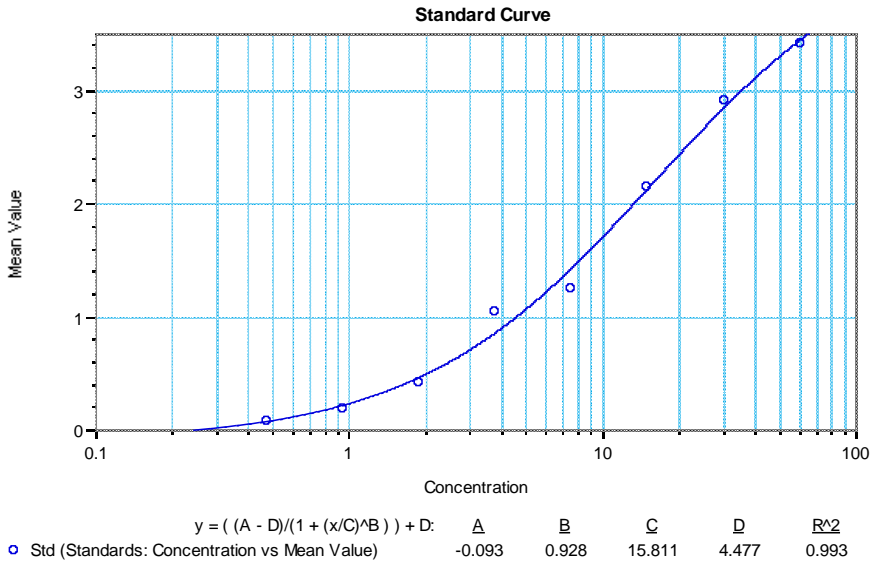
**23 pav.** Vieno MMP-8 tyrimo metu gautos keturių parametrų logistinės standartinės kreivės pavyzdys

sTLR-2 koncentracija nustatyta panaudojus komercinį rinkinį „Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Toll Like Receptor 2 (TLR2)“ (*Cloud-clone Corp.*, Keitis, JAV), o sTLR-4 – „Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Toll Like Receptor 4 (TLR4)“ (*Cloud-clone Corp.*, JAV). Log-log standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 0,312–20 ng/ml ribose abiem receptoriams (24 pav.). sTLR-2 rinkinio jautrumas buvo 0,112 ng/ml, o sTLR-4 – 0,118 ng/ml. Abiem atvejais mėginiai tyrimui buvo naudojami neskiesti.



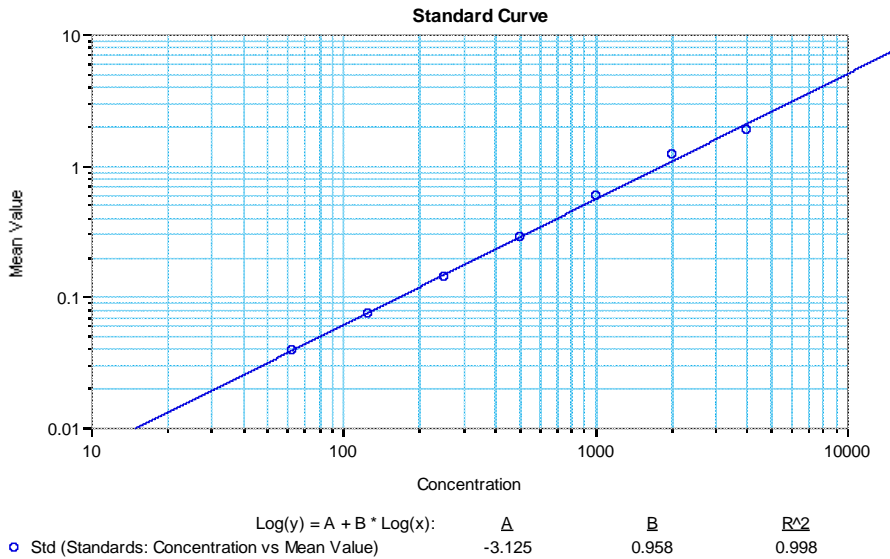
**24 pav.** Vieno s-TLR-2 tyrimo metu gautos log-log standartinės kreivės pavyzdys

$\alpha$  defensinų koncentracija nustatyta panaudojus komercinį rinkinį „Human Defensin Alpha 3, Neutrophil Specific (DEFA3) ELISA Kit“ (Abbexa Ltd, Kembridžas, Jungtinė Karalystė). Keturių parametru logistinė standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 0,47–30 ng/ml ribose, rinkinio jautrumas buvo < 0,21 ng/ml (25 pav.). Mėginiai tyrimui buvo naudojami atskiesti 1:10.



**25 pav.** Vieno  $\alpha$  defensinų tyrimo metu gautos keturių parametru logistinės standartinės kreivės pavyzdys

SuPAR koncentracija nustatyta panaudojus komercinį rinkinį „Human uPAR Immunoassay, Quantikine ELISA“ (R&D Systems, Mineapolis, JAV). Log-log standartinė kreivė apskaičiuota ir nubraižyta 62,5–4 000 pg/ml ribose, rinkinio jautrumas buvo < 33 pg/ml (26 pav.). Mėginiai tyrimui buvo naudojami atskiesti 1:5, tačiau jei išmatuotas mėginio optinis tankis viršijo aukščiausio standarto optinio tankio reikšmę, mėginiai buvo atitinkamai skiedžiami 1:10, 1:100 ir tiriami dar kartą.

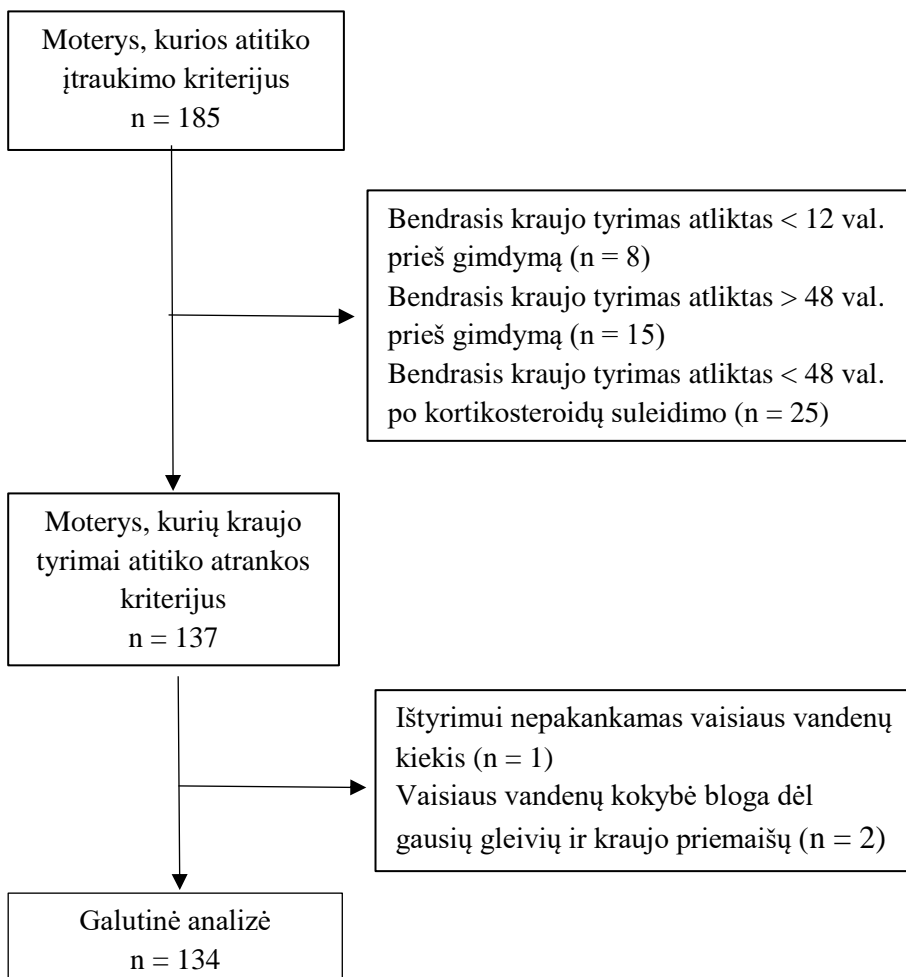


**26 pav.** Vieno suPAR tyrimo metu gautos log-log standartinės kreivės pavyzdys



#### 4.3. III dalis. Motinos kraujo ir vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų reikšmių palyginimas prognozuojant histologinį chorioamnionitą

Trečioje dalyje siekta palyginti tarpusavyje motinos kraujo ir vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų reikšmes histologinio chorioamnionito diagnozei. Į bendrą tyrimo dalį pateko tik tos moterys, kurių tiek kraujo, tiek vaisiaus vandenių mėginiai tenkino atrankos kriterijus (27 pav.).



**27 pav.** Tiriamųjų atrankos schema motinos kraujo ir vaisiaus vandenių uždegiminių žymenų reikšmių palyginimui.

Santrumpos: n – imties dydis.

#### 4.4. Tyrimo imties apskaičiavimas

Tyrimo imties dydžiams nustatyti visose trijose dalyse naudota „G\*Power“ (versija 3.1.9.4) programa. Kriterijaus reikšmingumo lygmuo pasirinktas  $\alpha = 0,05$ . Atsižvelgta į tai, kad kriterijaus galia būtų ne mažesnė kaip 0,8 ( $0,8 < \beta < 0,95$ ). Pasirinktas imčių dydis atitiko reikalavimus.

#### 4.5. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant R paketą (4.0.3 versija) (R Core Team, 2020). Duomenų pasiskirstymo normalumo sąlygai patikrinti buvo naudojamas Šapiro ir Vilko testas. Kiekybinių požymių, atitikusių normaliojo skirstinio sąlygas, reikšmių vidurkiai dviejose nepriklausomose grupėse lyginti taikant Stjudento  $t$  testą. Kiekybinių požymių, neatitikusių normaliojo skirstinio sąlygų, reikšmės palygintos taikant Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus. Visi rezultatai, kurių atvejais taikyti parametriniai kriterijai, aprašyti pateikiant kiekybinių duomenų vidurkį ( $\bar{x}$ ) su standartiniu nuokrypiu (SN). Rezultatai, kurių atvejais taikyti neparametriniai kriterijai, aprašyti pateikiant kiekybinių duomenų medianą (Md) ir tarpkvartilinį plotį (IQR). Kokybinių kintamųjų nepriklausomumui tikrinti taikytas chi kvadrato ( $\chi^2$ ) kriterijus ir duomenys pateikti absoliučiais skaičiais su išreikšta procentine dalimi.

Ryšio tarp kintamųjų stiprumui įvertinti naudotas binarinės daugialypės logistinės regresijos modelis. Siekiant įvertinti uždegiminių žymenų prognostines reikšmes histologiniam chorioamnionitui, nubraižytos ROC kreivės ir apskaičiuoti plotai po kreivėmis (AUC). Skirtingų modelių AUC palyginti naudojant DeLong testą. Optimaliai ribinei vertei nustatyti panaudotas Judeno (J) indeksas (jautrumas + (1 – specifiškumas) – 1).

Analizuojamų požymių skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai nustatytas reikšmingumo lygmuo ( $p$  reikšmė) buvo mažesnis už 0,05.

## 5. TYRIMO REZULTATAI

### 5.1. I dalis. Motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą

I biomedicininio tyrimo dalį, nagrinėjant motinos kraujo uždegiminių žymenų reikšmę histologinio chorioamnionito diagnostikoje, įtrauktos 137 moterys, kurios buvo hospitalizuotos į VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centrą dėl prieš laiką nutekėjusių vaisiaus vandenių esant nėštumo laikui  $22^{+0}$  –  $34^{+6}$  sav. I pirmąją tiriamųjų grupę pateko 52, į antrąją – 85 moterys ir jų naujagimiai.

Bendroji tiriamųjų demografinė ir klinikinė charakteristika pateikta 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Palyginamoji tiriamųjų grupių charakteristika

Charakteristika	I grupė (n = 52)	II grupė (n = 85)	p reikšmė
Motinos amžius (metai), $\bar{x} \pm SN$	30,8 ± 5,8	31,1 ± 5,2	0,89
Pirmas nėštumas, n (%)	26 (50)	43 (50,6)	0,95
Pakartotinis nėštumas, n (%)	26 (50)	42 (57,6)	0,95
Pirmas gimdymas, n (%)	29 (55,8)	52 (61,2)	0,53
Pakartotinis gimdymas, n (%)	23 (44,2)	33 (38,8)	0,53
Nėštumo trukmė gimdymo metu (sav.), Md (IQR)	32 <sup>+3</sup> (27 <sup>+3</sup> –34 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+2</sup> (28 <sup>+6</sup> –34 <sup>+2</sup> )	0,06
Klinikinis chorioamnionitas, n (%)	6 (7,7)	1 (1,2)	0,008
Bevandenis laikotarpis (val.), Md (IQR)	148,3 (91,1–246,5)	93,5 (62,1–166,05)	0,007
B grupės β hemolizinio streptokoko kolonizacija makštyje, n (%)	20 (38,5)	13 (15,3)	0,002
Gestacinis diabetas, n (%)	8 (15,4)	16 (17,6)	0,54
Hipertenzinės būklės, n (%)	7 (13,5)	11 (12,9)	0,93

<b>Charakteristika</b>	<b>I grupė (n = 52)</b>	<b>II grupė (n = 85)</b>	<b>p reikšmė</b>
Vaisiaus gimimo svoris (g), $\bar{x} \pm SN$	1810,5 ± 690,3	1950,2 ± 610,1	0,48
Apgar balai po 5 min. < 7, n (%)	6 (11,5)	1 (1,2)	0,008
Virkštelės arterinio kraujo pH, $\bar{x} \pm SN$	7,32 ± 0,08	7,35 ± 0,08	0,004

I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas;  
 II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas.  
 Santrumpos:  $\bar{x}$  – vidurkis, SN – standartinis nuokrypis, Md – mediana, IQR – tarpkvartilinis plotis (angl. *interquartile range*), n – imties dydis.

Tiriamųjų amžius, nėštumų ir gimdymų skaičius, nėštumo trukmė, gestacinio diabeto, hipertenzinių būklių dažnis ir naujagimio svoris tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Pirmoje grupėje statistiškai reikšmingai daugiau buvo nustatyta B grupės  $\beta$  hemolizininio streptokoko kolonizacijos makštyje ( $p$  reikšmė 0,002) ir klinikinio chorioamnionito ( $p$  reikšmė 0,008) atvejų. Bevandenio periodas buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis ( $p$  reikšmė 0,007), o naujagimio būklės įvertinimas pagal Apgar po 5 minučių ( $p$  reikšmė 0,008) ir virkštelės kraujo pH ( $p$  reikšmė 0,004) statistiškai reikšmingai mažesnis pirmoje grupėje nei antroje (5 lentelė).

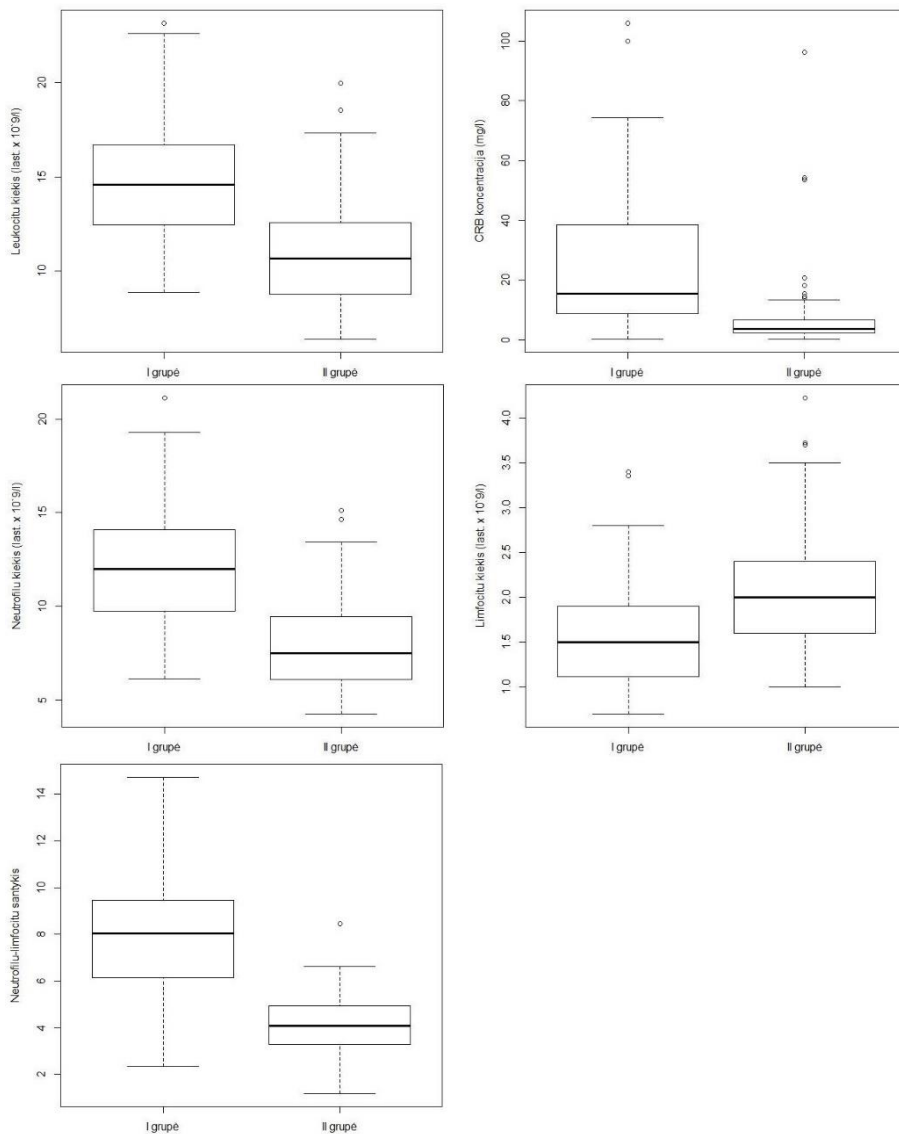
Visų nagrinėtų motinos kraujo uždegiminių žymenų lygis statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp grupių ( $p$  reikšmė < 0,001). Leukocitų ir neutrofilų skaičius, CRB ir NLS buvo didesnis pirmoje tiriamųjų grupėje, o limfocitų skaičius buvo didesnis antroje tiriamųjų grupėje (6 lentelė ir 28 pav.).

**6 lentelė.** Motinos kraujo uždegiminių rodiklių reikšmių palyginimas tarp grupių

Motinos kraujo uždegiminiai rodikliai	Uždegiminių rodiklių koncentracija kraujyje		<i>p</i> reikšmė
	I grupė (n = 52)	II grupė (n = 85)	
Leukocitai (ląstelės x 10 <sup>9</sup> /l)	14,58 (12,56–16,6)	10,68 (8,78–12,57)	< 0,001
Neutrofilai (ląstelės x 10 <sup>9</sup> /l)	12 (9,75–13,9)	7,5 (6,1–9,44)	< 0,001
Limfocitai (ląstelės x 10 <sup>9</sup> /l)	1,5 (1,13–1,9)	2 (1,6–2,4)	< 0,001
C reaktyvusis baltymas (mg/l)	15,5 (8,71–38,38)	3,66 (2,23–6,73)	< 0,001
Neutrofilų ir limfocitų santykis	8,01 (6,18–9,72)	4,09 (3,3–4,93)	< 0,001

Visi duomenys aprašyti pateikiant medianą ir tarpkvartilinį plotį. I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas; II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas.

Santrumpos: n – imties dydis.



**28 pav.** Motinos kraujo uždegiminių žymenų koncentracijų palyginimas tarp grupių. I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas; II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas

Siekiant įvertinti pavienių ir visų kartu motinos kraujo uždegiminių žymenų santykinę riziką histologiniam chorioamnionitui prognozuoti, atlikta vienalypė ir daugialypė logistinės regresijos analizės (7 lentelė). Nustatyta, kad NLS turi didžiausią prognostinę vertę tiek kaip nepriklausomas kintamasis (OR = 2,59; 95 % PI: 1,92–3,78;  $p$  reikšmė < 0,001), tiek būdamas visų kintamųjų sudėtyje (OR = 5,24; 95 % PI: 1,89–14,52;  $p$  reikšmė = 0,001). Daugialypėje analizėje leukocitų skaičiaus padidėjimas histologinio chorioamnionito santykinę riziką padidino 1,38 karto (95 % PI: 1,19–1,6;  $p$  reikšmė = 0,003), o CRB – 1,05 karto (95 % PI: 1,02– 1,08;  $p$  reikšmė = 0,003). Neutrofilų ir limfocitų skaičiaus santykinės rizikos  $p$  reikšmė daugialypėje analizėje > 0,05.

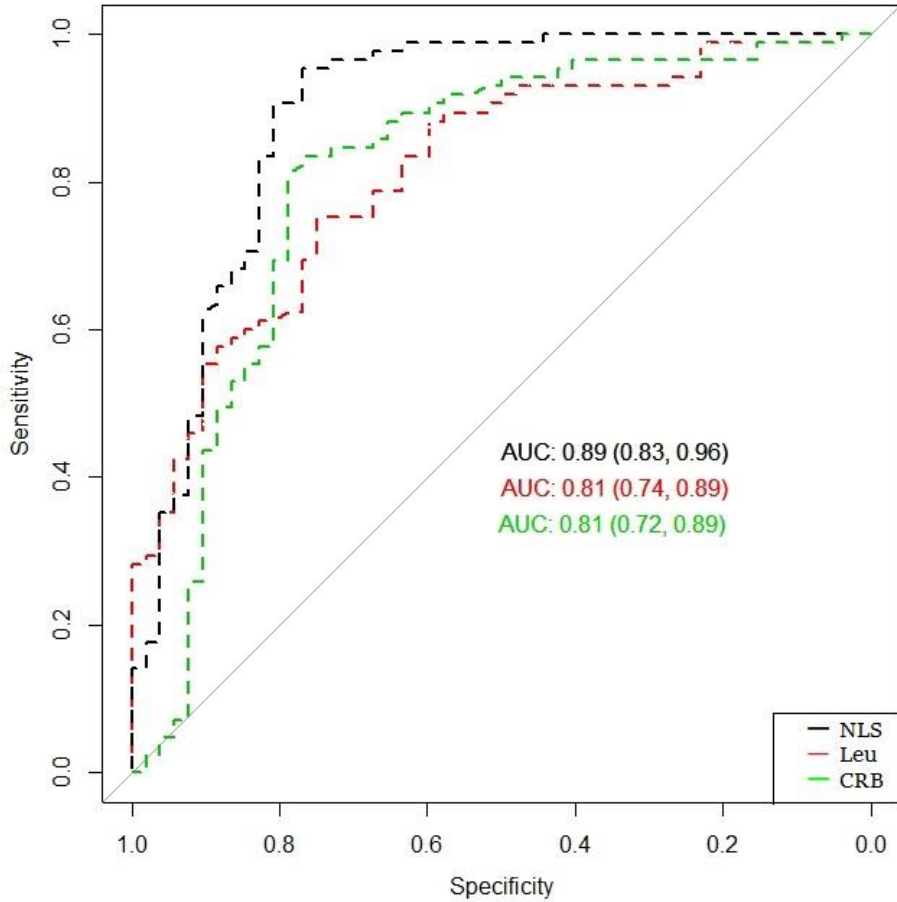
**7 lentelė.** Motinos kraujo uždegiminių žymenų įtaka histologinio chorioamnionito diagnostikai

Vaisiaus vandens imunologiniai žymenys	Vienalypė analizė			Daugialypė analizė		
	OR	95 % PI	$p$ reikšmė	OR	95 % PI	$P$ reikšmė
Leukocitai	1,45	1,26–1,68	< 0,001	1,38	(1,19–1,6)	0,003
Neutrofilai	1,69	1,4–2,04	< 0,001	1,8	(0,38–9,27)	0,4
Limfocitai	0,21	0,09–0,46	< 0,001	0,15	(0,02–1,47)	0,1
C reaktyvusis baltymas	1,07	1,03–1,1	< 0,001	1,05	(1,02–1,08)	0,003
Neutrofilų ir limfocitų santykis	2,59	1,92–3,78	< 0,001	5,24	(1,89–14,52)	0,001

$P$  reikšmės < 0,05 paryškintos.

Santrumpos: OR – šansų santykis (angl. *odds ratio*), PI – pasikliautinis intervalas.

Skirtingų žymenų tikslumas prognozuojant histologinį chorioamnionitą įvertintas nubraižius ROC kreives ir apskaičiavus plotą po kreivėmis (AUC). Apskaičiuotas leukocitų AUC siekė 0,81, CRB – 0,81, o NLS – 0,89. Palyginus tarpusavyje skirtingų žymenų ROC kreives, nestebėta statistškai reikšmingo skirtumo tarp CRB ir NLS ROC kreivių ( $p$  reikšmė 0,08). Lyginant NLS ir leukocitų ROC kreives tarpusavyje, rezultatas buvo netoli priimtino reikšmingo lygio ( $p$  reikšmė 0,053) (29 pav.)



**AUC palyginimas (p reikšmės):**

***Leukocitų sk. ir CRB: 0,8***

***Leukocitų sk. ir NLS: 0,05***

***CRB ir NLS: 0,08***

**29 pav.** Motinos kraujo uždegiminių žymenų ROC kreivių palyginimas.  
 Santrumpos: NLS – neutrofilų ir limfocitų santykis, CRB – C reaktyvusis baltymas, Leu – leukocitai, AUC – plotas po ROC kreive.



Panaudojus Judeno indeksą, apskaičiuotos kraujo uždegiminių žymenų kritinės vertės prognozuojant histologinį chorioamnionitą. Apskaičiuota leukocitų skaičiaus optimali kritinė vertė – 12,62 x 10<sup>9</sup>/l, kuomet jautrumas ir specifiškumas siekė 75 proc. CRB optimali kritinė vertė – 8,56 mg/l, kuomet jautrumas siekė 77 proc., o specifiškumas – 84 proc. NLS optimali kritinė vertė – 5,97, kurios jautrumas panašus kaip ir kitų kraujo uždegiminių žymenų – 77 proc., o specifiškumas didžiausias – 95 proc. (8 lentelė).

**8 lentelė.** Motinos kraujo uždegiminių žymenų kritinių reikšmių prognostinė reikšmė histologinio chorioamnionito diagnostikoje

<b>Kritinė reikšmė</b>	<b>Jautrumas, % (95 % PI)</b>	<b>Specifiškumas, % (95 % PI)</b>	<b>TPV, % (95 % PI)</b>	<b>NPV, % (95 % PI)</b>
<b>C reaktyvusis baltymas (mg/l)</b>				
12,35	65 (58–78)	88 (79–94)	77 (62–89)	81 (71–88)
<b>8,56</b>	<b>77 (63–87)</b>	<b>84 (74–91)</b>	<b>74 (60–85)</b>	<b>86 (76–92)</b>
5,38	81 (67–90)	69 (58–79)	62 (49–73)	86 (75–93)
3,12	90 (79–98)	44 (33–55)	49 (39–60)	88 (74–96)
<b>Leukocitai (ląstelės x 10<sup>9</sup>/l)</b>				
13,44	63 (49–76)	84 (74–91)	70 (55–83)	79 (69–87)
<b>12,62</b>	<b>75 (61–86)</b>	<b>75 (65–84)</b>	<b>65 (65–77)</b>	<b>83 (73–91)</b>
11,72	79 (65–89)	62 (51–73)	56 (44–68)	83 (71–91)
11,65	83 (70–92)	61 (50–72)	57 (45–68)	85 (74–93)
<b>Neutrofilų ir limfocitų santykis</b>				
6,55	67 (53–80)	98 (92–100)	95 (82–99)	83 (74–90)
<b>5,97</b>	<b>77 (63–97)</b>	<b>95 (88–99)</b>	<b>91 (78–97)</b>	<b>87 (79–93)</b>
5,72	81 (67–90)	91 (82–96)	84 (71–93)	89 (80–94)
5,38	83 (70–92)	84 (74–91)	75 (62–86)	89 (80–95)

Paryškintos optimalios žymenų ribinės vertės.

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas, TPV – teigiama prognostinė vertė, NPV – neigiama prognostinė vertė.

## 5.2. II dalis. Vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmė prognozuojant histologinį chorioamnionitą

Į biomedicininio tyrimo II dalį, nagrinėjant vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmę histologinio chorioamnionito diagnostikoje, įtrauktos 156 moterys, kurios buvo hospitalizuotos į VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centrą dėl prieš laiką nutekėjusių vaisiaus vandenų esant nėštumo laikui  $22^{+0}$ – $34^{+6}$  sav. Į pirmąją tiriamųjų grupę pateko 65, į antrąją – 91 moteris ir jų naujagimiai.

Bendroji tiriamųjų demografinė ir klinikinė charakteristika pateikta 9 lentelėje.

**9 lentelė.** Palyginamoji tiriamųjų grupių charakteristika

Charakteristika	I grupė (n = 65)	II grupė (n = 91)	p reikšmė
Motinos amžius (metai), $\bar{x} \pm SN$	30,6 ± 6,4	31,2 ± 5,8	0,53
Pirmas nėštumas, n (%)	32 (49,2)	46 (50,6)	0,87
Pakartotinis nėštumas, n (%)	33 (50,8)	45 (49,4)	0,87
Pirmas gimdymas, n (%)	38 (58,5)	57 (62,6)	0,59
Pakartotinis gimdymas, n (%)	27 (41,5)	34 (37,4)	0,59
Nėštumo trukmė gimdymo metu (sav.), Md (IQR)	32 <sup>+0</sup> (27 <sup>+2</sup> –33 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+0</sup> (28 <sup>+1</sup> –33 <sup>+5</sup> )	0,13
Klinikinis chorioamnionitas, n (%)	6 (9,2)	1 (1,1)	0,02
Bevandens periodo trukmė (val.), Md (IQR)	96,2 (62,5–194,4)	82,3 (58,2–171,6)	0,003
B grupės β hemolizinio streptokoko kolonizacija makštyje, n (%)	24 (36,9)	15 (16,5)	0,003
Gestacinis diabetas, n (%)	11 (16,9)	16 (17,6)	0,91
Hipertenzinės būklės, n (%)	8 (12,3)	12 (13,2)	0,87
Vaisiaus gimimo svoris (g), $\bar{x} \pm SN$	1768,2 ± 669,1	1872,7 ± 603,2	0,51
Apgar balai po 5 min. < 7, n (%)	6 (9,2)	1 (1,1)	0,02
Virštelės arterinio kraujo pH, $\bar{x} \pm SN$	7,31 ± 0,09	7,35 ± 0,09	0,003

I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas; II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas.

Santrumpos:  $\bar{x}$  – vidurkis, SN – standartinis nuokrypis, Md – mediana, IQR – tarpkvartilinis plotis (angl. *interquartile range*), n – imties dydis.

Taip pat, kaip ir pirmoje tyrimo dalyje, tiriamųjų amžius, nėštumų ir gimdymų skaičius, nėštumo trukmė, gestacinio diabeto, hipertenzinių būklių dažnis ir naujagimio svoris tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Pirmoje grupėje statistiškai reikšmingai daugiau buvo nustatyta B grupės  $\beta$  hemolizinio streptokoko kolonizacijos makštyje ( $p$  reikšmė 0,003) ir klinikinio chorioamnionito ( $p$  reikšmė 0,02) atvejų. Bevandenio periodas buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis ( $p$  reikšmė 0,003), o virkštelės kraujo pH ( $p$  reikšmė 0,003) ir naujagimio būklės įvertinimas pagal Apgar po 5 min. statistiškai reikšmingai mažesnis ( $p$  reikšmė 0,02) pirmoje grupėje nei antroje (9 lentelė).

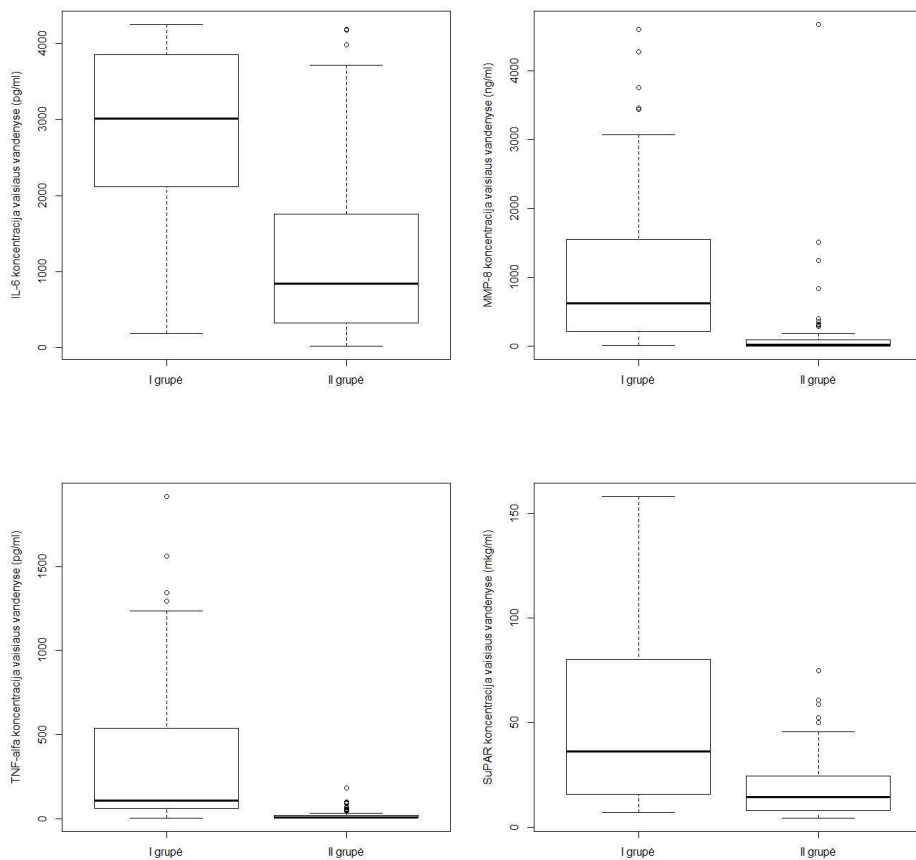
IL-6 (3003,3 ir 904,07 pg/ml), MMP-8 (636,43 ir 18,68 ng/ml), TNF- $\alpha$  (124,19 ir 8,64 pg/ml) ir suPAR (36,29 ir 16,21 mkg/ml) koncentracijos vaisiaus vandenyse buvo statistiškai reikšmingai didesnės pirmoje tiriamųjų grupėje nei antroje ( $p$  reikšmė < 0,001) (10 lentelė ir 30 pav.). sTLR-2 (0,11 ir 0,09 ng/ml), sTLR-4 (0,28 ir 0,23 ng/ml) ir  $\alpha$  defensinų (24,08 ir 20,15 ng/ml) koncentracijos tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė (10 lentelė ir 31 pav.).

**10 lentelė.** Vaisiaus vandenių imunologinių žymenų koncentracijų palyginimas tarp grupių

Vaisiaus vandenių imunologiniai žymenys	Imunologinių žymenų koncentracija		$p$ reikšmė
	I grupė (n = 65)	II grupė (n = 91)	
IL-6 (pg/ml)	3003,3 (2100,0–3920,91)	904,07 (325,27–1888,53)	< 0,001
MMP-8 (ng/ml)	636,43 (190,82–1568,53)	18,68 (4,55–93,27)	< 0,001
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	124,19 (63,84–595,97)	8,64 (6,02–17,89)	< 0,001
sTLR-2 (ng/ml)	0,11 (0,03–0,34)	0,09 (0,01–0,35)	0,403
sTLR-4 (ng/ml)	0,28 (0,13–0,78)	0,23 (0,06–0,51)	0,123
$\alpha$ defensinai (ng/ml)	24,08 (14,98–35,01)	20,15 (14,85–29,06)	0,1
SuPAR (mkg/ml)	36,29 (18,43–81,02)	16,21 (9,72–25,97)	< 0,001

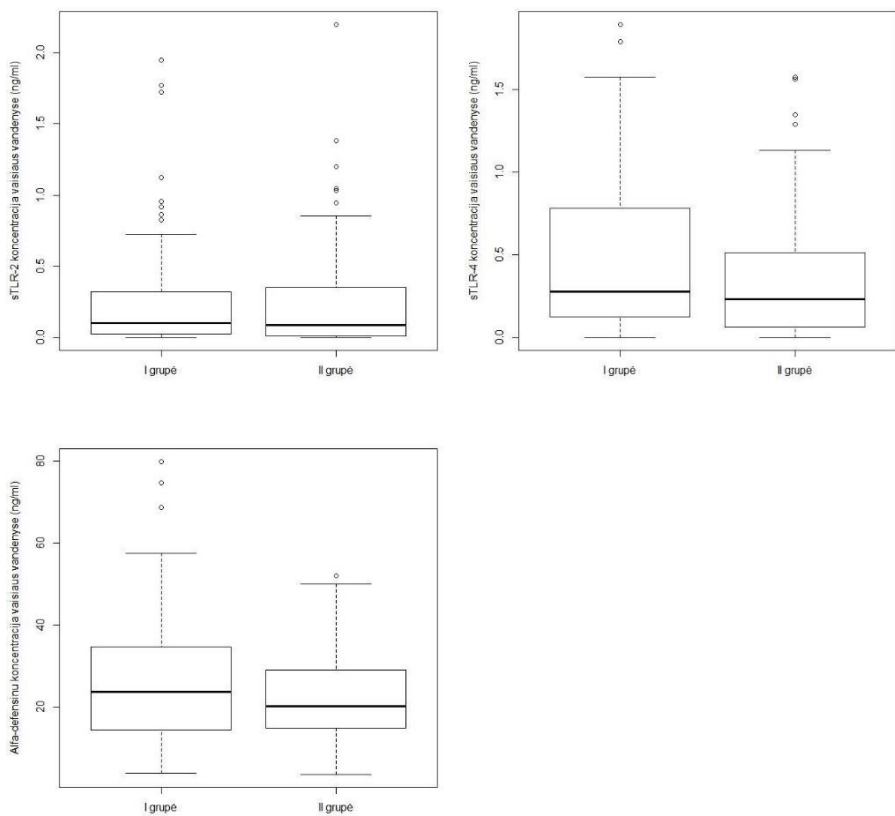
Visi duomenys aprašyti pateikiant medianą ir tarpkvartilinį plotį. I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas; II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas.

Santrumpos: n – imties dydis, IL-6 – interleukinas 6, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , sTLR-2 – tirpus *Toll-like* receptorius-2, sTLR-4 – tirpus *Toll-like* receptorius-4, suPAR – tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius.



**30 pav.** Vaisiaus vandens imunologinių žymenų koncentracijų palyginimas tarp grupių.

Santrumpos: IL-6 – interleukinas 6, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , suPAR – tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus.



**31 pav.** Vaisiaus vandenių imunologinių žymenų koncentracijų palyginimas tarp grupių.

Santrumpos: sTLR-2 – tirpus *Toll-like* receptorių-2, sTLR-4 – tirpus *Toll-like* receptorių-4.

Siekiant įvertinti pavienių ir visų kartu vaisiaus vandenų imunologinių žymenų santykinę riziką histologiniam chorioamnionitui prognozuoti, atlikta vienalypė ir daugialypė logistinės regresijos analizės (11 lentelė). Tiek vienalypėje, tiek daugialypėje logistinės regresijos analizėje nustatyti statistiškai reikšmingi vaisiaus vandenų imunologiniai žymenys chorioamnionitui prognozuoti buvo IL-6, MMP-8, TNF- $\alpha$  ir suPAR. Iš statistiškai reikšmingų imunologinių žymenų TNF- $\alpha$  turi didžiausią prognostinę vertę tiek kaip nepriklausomas kintamasis (OR = 1,03; 95 % PI: 1,02–1,05;  $p$  reikšmė < 0,001), tiek būdamas visų kintamųjų sudėtyje (OR = 1,03; 95 % PI: 1,01–1,04;  $p$  reikšmė < 0,001). Daugialypėje analizėje MMP-8 koncentracijos padidėjimas histologinio chorioamnionito santykinę riziką padidina 1,02 karto (95 % PI: 1,01–1,06;  $p$  reikšmė < 0,001), o suPAR – 1,01 karto (95 % PI: 1,002–1,02 ;  $p$  reikšmė = 0,03). Kadangi IL-6 koncentracija uždegimo metu didėja nuo keliasdešimt iki kelių šimtų kartų, IL-6 koncentracijos padidėjimas per 1 vienetą histologinio chorioamnionito santykinę riziką padidina tik 1,0001 karto (95 % PI: 1,0002–1,002;  $p$  reikšmė = 0,02).

Nubraižius ROC kreives ir apskaičiavus plotą po kreivėmis, įvertintas skirtingų imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse tikslumas prognozuojant histologinį chorioamnionitą. Apskaičiuotas IL-6 AUC siekė 0,81, MMP-8 – 0,89, TNF- $\alpha$  – 0,91, o suPAR – 0,78 (32 pav.). Atskirame brėžinyje pateiktos statistiškai nereikšmingų žymenų ROC kreivės:  $\alpha$  defensinų AUC siekė 0,58, sTLR-2 – 0,54 ir sTLR-4 – 0,57 (33 pav.).

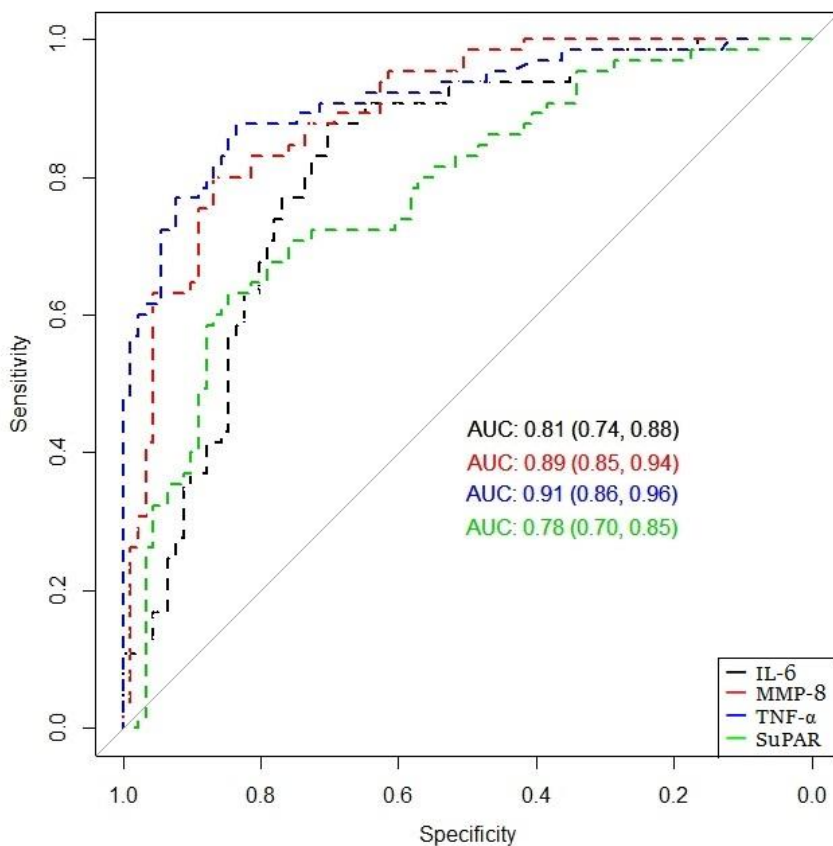
Palyginus tarpusavyje skirtingų žymenų ROC kreives, stebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp TNF- $\alpha$ , MMP-8 ir visų kitų tirtų vaisiaus vandenų imunologinių žymenų ( $p$  reikšmė < 0,05). TNF- $\alpha$  ir MMP-8 AUC reikšmės tarpusavyje statistiškai reikšmingai nesiskiria ( $p$  reikšmė = 0,51). Taip pat statistiškai reikšmingai tarpusavyje nesiskiria IL-6 ir suPAR AUC ( $p$  reikšmė = 0,43) (32 pav.). Palyginus tarpusavyje  $\alpha$  defensinų, sTLR-2 ir sTLR-4 AUC kreives, statistiškai reikšmingo skirtumo taip pat nestebėta (33 pav.).

**11 lentelė.** Vaisiaus vandens imunologinių žymenų įtaka histologinio chorioamnionito diagnostikai

Vaisiaus vandens imunologiniai žymenys	Vienalytė analizė			Daugialytė analizė		
	OR	95 % PI	<i>p</i> reikšmė	OR	95 % PI	<i>p</i> reikšmė
<b>IL-6</b>	1,0001	1,00002–1,0002	<b>0,009</b>	1,0001	1,0002–1,002	<b>0,02</b>
<b>MMP-8</b>	1,002	1,001–,003	< <b>0,001</b>	1,02	1,01–1,06	< <b>0,001</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,03	1,02–1,05	< <b>0,001</b>	1,03	1,01–1,04	< <b>0,001</b>
<b>sTLR-2</b>	1,6	0,79–3,22	0,18	1,07	0,15–3,38	0,8
<b>sTLR-4</b>	2,15	0,91–4,58	0,09	1,11	0,31–3,99	0,44
<b><math>\alpha</math> defensinai</b>	1,03	0,95–1,06	0,06	1,06	0,99–1,06	0,06
<b>SuPAR</b>	1,01	1,003–1,02	<b>0,008</b>	1,01	1,002–1,02	<b>0,03</b>

*P* reikšmės < 0,05 paryškintos.

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas, IL-6 – interleukinas 6, MMP-8 – matricso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , sTLR-2 – tirpus *Toll-like* receptorių-2, sTLR-4 – tirpus *Toll-like* receptorių-4, suPAR – tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorių.



**AUC palyginimas (p reikšmės):**

***TNF- $\alpha$  ir IL-6: 0,003***

***MMP-8 ir IL-6: 0,01***

***TNF- $\alpha$  ir MMP-8: 0,51***

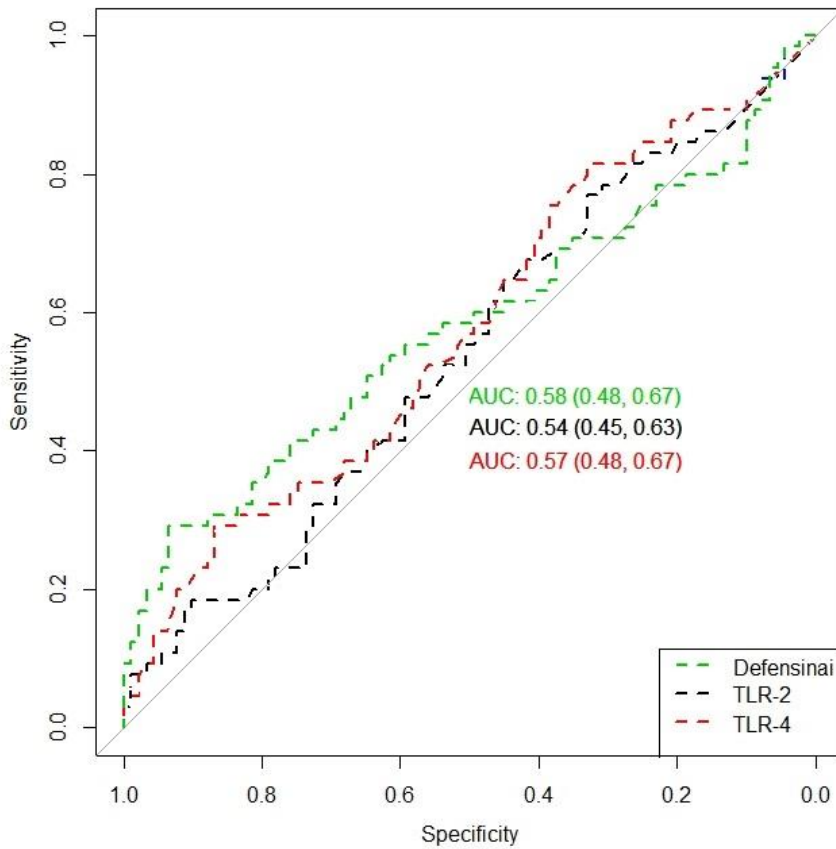
***TNF- $\alpha$  ir suPAR: < 0,001***

***MMP-8 ir suPAR: < 0,001***

***IL-6 ir suPAR: 0,43***

**32 pav.** Vaisiaus vandenų imunologinių žymenų ROC kreivių palyginimas. Santrumpos: IL-6 – interleukinas 6, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , suPAR – tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius.





**AUC palyginimas (p reikšmės):**

*sTLR-2 ir sTLR-4: 0,42*

*α defensinai ir sTLR-2: 0,48*

*α defensinai ir sTLR-4: 0,94*

**33 pav.** Vaisiaus vandenų imunologinių žymenų ROC kreivių palyginimas. Santrumpos: sTLR-2 – tirpus *Toll-like* receptorius-2, sTLR-4 – tirpus *Toll-like* receptorius-4.

Panaudojus Judeno indeksą, apskaičiuotos vaisiaus vandenų statistiškai reikšmingų imunologinių žymenų kritinės vertės prognozuojant histologinį chorioamnionitą. Apskaičiuota IL-6 optimali kritinė vertė prognozuojant histologinį chorioamnionitą – 1 389,82 pg/ml, kuomet jautrumas siekė 88 proc., o specifiškumas – 70 proc., MMP-8 – 172,53 ng/ml (jautrumas – 80 proc., specifiškumas – 87 proc.), TNF- $\alpha$  – 21,17 pg/ml (jautrumas – 88 proc., specifiškumas – 84 proc.) ir suPAR – 30,08 mkg/ml (jautrumas 63 proc., specifiškumas – 85 proc.). Iš visų apskaičiuotų kritinių verčių didžiausią jautrumą turėjo IL-6 ir TNF- $\alpha$ , o didžiausią specifiškumą – MMP-8 (12 lentelė).

**12 lentelė.** Vaisiaus imunologinių žymenų kritinių reikšmių prognostinės reikšmės histologinio chorioamnionito diagnostikoje

Kritinė reikšmė	Jautrumas, % (95 % PI)	Specifiškumas, % (95 % PI)	TPV, % (95 % PI)	NPV, % (95 % PI)
<b>IL-6 (pg/ml)</b>				
4195,68	17 (9–28)	96 (89–99)	73 (45–92)	62 (53–70)
3427,52	37 (25–50)	90 (82–95)	73 (54–87)	67 (58–75)
2844,43	57 (44–69)	85 (76–91)	73 (58–84)	73 (64–81)
<b>1389,82</b>	<b>88 (77–94)</b>	<b>70 (60–79)</b>	<b>67 (56–77)</b>	<b>89 (79–95)</b>
<b>MMP-8 (ng/ml)</b>				
413,67	63 (50–75)	96 (89–99)	91 (79–98)	78 (70–86)
294,36	65 (52–76)	90 (82–95)	82 (69–92)	78 (69–86)
<b>172,53</b>	<b>80 (68–89)</b>	<b>87 (78–93)</b>	<b>81 (70–90)</b>	<b>86 (77–92)</b>
124,5	83 (72–91)	81 (72–89)	76 (64–85)	87 (78–93)
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>				
70,77	72 (60–83)	95 (88–98)	90 (79–97)	83 (74–89)
50,39	78 (67–88)	89 (81–95)	84 (72–92)	85 (77–92)
24,56	86 (75–93)	85 (76–91)	80 (69–89)	90 (81–95)
<b>21,17</b>	<b>88 (77–95)</b>	<b>84 (74–90)</b>	<b>79 (68–88)</b>	<b>90 (82–96)</b>
<b>SuPAR (mkg/ml)</b>				
62,84	32 (21–45)	96 (89–99)	84 (64–95)	66 (58–74)
43,2	40 (28–53)	90 (82–95)	74 (57–88)	68 (59–76)
<b>30,08</b>	<b>63 (50–75)</b>	<b>85 (76–91)</b>	<b>75 (61–85)</b>	<b>76 (67–84)</b>
28,19	65 (52–76)	81 (72–89)	71 (58–82)	76 (67–84)

Paryškintos optimalios žymenų ribinės vertės.

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas, TPV – teigiama prognostinė vertė, NPV – neigiama prognostinė vertė, IL-6 – interleukinas 6, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, suPAR – tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus.

### 5.3. III dalis. Motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų reikšmių palyginimas prognozuojant histologinį chorioamnionitą

Į biomedicininio tyrimo III dalį, kurioje siekiama tarpusavyje palyginti motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų vertę prognozuojant histologinį chorioamnionitą, įtrauktos 134 moterys, kurios buvo hospitalizuotos į VUL SK Akušerijos ir ginekologijos centrą dėl prieš laiką nutekėjusių vaisiaus vandenų esant nėštumo laikui  $22^{+0}$ – $34^{+6}$  sav. bei kurios atitiko abiejų prieš tai aprašytų dalių atrankos kriterijus. Į pirmąją tiriamųjų grupę pateko 52, į antrąją – 82 moterys ir jų naujagimiai.

Bendroji tiriamųjų demografinė ir klinikinė charakteristika pateikta 13 lentelėje.

**13 lentelė.** Palyginamoji tiriamųjų grupių charakteristika

Charakteristika	I grupė (n = 52)	II grupė (n = 82)	p reikšmė
Motinos amžius (metai), $\bar{x} \pm SN$	30,8 ± 5,8	31 ± 5,2	0,9
Pirmas nėštumas, n (%)	26 (50)	42 ()	0,89
Pakartotinis nėštumas, n (%)	26 (50)	40 ()	0,89
Pirmas gimdymas, n (%)	29 (55,8)	44 ()	0,99
Pakartotinis gimdymas, n (%)	23 (44,2)	35 ()	0,99
Nėštumo trukmė gimdymo metu (sav.), Md (IQR)	32 <sup>+3</sup> (27 <sup>+3</sup> –34 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+3</sup> (29 <sup>+0</sup> –34 <sup>+2</sup> )	0,06
Klinikinis chorioamnionitas, n (%)	6 (7,7)	1 ()	0,09
Bevandenio periodo trukmė (val.), Md (IQR)	148,3 (91,1–246,5)	105,2 (80,6–210,4)	0,007
B grupės β hemolizinio streptokoko kolonizacija makštyje, n (%)	20 (38,5)	13 ()	0,03
Gestacinis diabetas, n (%)	8 (15,4)	15 ()	0,66
Hipertenzinės būklės, n (%)	7 (13,5)	11 ()	0,99
Vaisiaus gimimo svoris (g), Md (IQR)	1810,5 ± 690,3	1980 ± 665,5	0,44
Apgar balai po 5 min. < 7, n (%)	6 (11,5)	1 (1,2)	0,09
Virkštelės arterinio kraujo pH, Md (IQR)	7,32 ± 0,08	7,35 ± 0,07	0,004

I grupė – moterys, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas; II grupė – moterys, kurioms nediagnozuotas histologinis chorioamnionitas. Santrumpos:  $\bar{x}$  – vidurkis, SN – standartinis nuokrypis, Md – mediana, IQR – tarpkvartilinis plotis, n – imties dydis.

Taip pat, kaip ir pirmose dviejose tyrimo dalyse, tiriamųjų amžius, nėštumų ir gimdymų skaičius, nėštumo trukmė, gestacinio diabeto, hipertenzinių būklių dažnis ir naujagimio svoris tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Pirmoje grupėje statistiškai reikšmingai daugiau buvo nustatyta B grupės  $\beta$  hemolizinio streptokoko kolonizacijos makštyje ( $p$  reikšmė 0,03) ir klinikinio chorioamnionito ( $p$  reikšmė 0,09) atvejų. Bevandenis periodas buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis ( $p$  reikšmė 0,007), o virkštelės kraujo pH ( $p$  reikšmė 0,004) ir naujagimio būklės įvertinimas pagal Apgar po 5 min. statistiškai reikšmingai mažesnis ( $p$  reikšmė 0,09) pirmoje grupėje nei antroje (13 lentelė).

Į motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų prognostinės histologinio chorioamnionito reikšmės tarpusavio palyginimą įtraukti geriausią prognostinę vertę parodę motinos kraujo (NLS ir CRB) ir vaisiaus vandenų uždegiminiai žymenys (TNF- $\alpha$  ir MMP-8). Siekiant įvertinti šių žymenų santykinę riziką histologiniam chorioamnionitui prognozuoti, atlikta bendra šių duomenų daugialypė logistinės regresijos analizė (14 lentelė).

**14 lentelė.** Motinos kraujo ir vaisiaus vandenų imunologinių žymenų įtaka histologinio chorioamnionito diagnostikai

Uždegiminiai žymenys	Daugialypė analizė		
	OR	95 % PI	$p$ reikšmė
C reaktyvusis baltymas	1,01	0,98–1,06	0,42
Neutrofilų ir limfocitų santykis	2,51	1,53–4,14	<b>&lt; 0,001</b>
TNF- $\alpha$	1,02	1,009–1,04	0,02
MMP-8	1,003	1,0002–1,005	0,02

$P$  reikšmės < 0,05 paryškintos.

Santrumpos: TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, OR – šansų santykis (angl. *odds ratio*), PI – pasikliautinis intervalas.

Didžiausią santykinę riziką daugialypėje analizėje parodė NLS (OR = 2,51; 95 % PI: 1,53–4,14;  $p$  reikšmė < 0,001). TNF- $\alpha$  uždegimo metu padidėja keliasdešimt kartų, o MMP-8 – kelis šimtus kartų, todėl TNF- $\alpha$  (OR = 1,02; 95 % PI: 1,009–1,04;  $p$  reikšmė = 0,021) ir MMP-8 (OR = 1,003; 95 % PI: 1,009–1,04;  $p$  reikšmė = 0,02) santykinė rizika daugialypėje analizėje buvo mažesnė nei NLS. CRB šioje analizėje buvo statistiškai nereikšmingas žymuo: OR = 1,01; 95 % PI: 0,98–1,06;  $p$  reikšmė = 0,42).

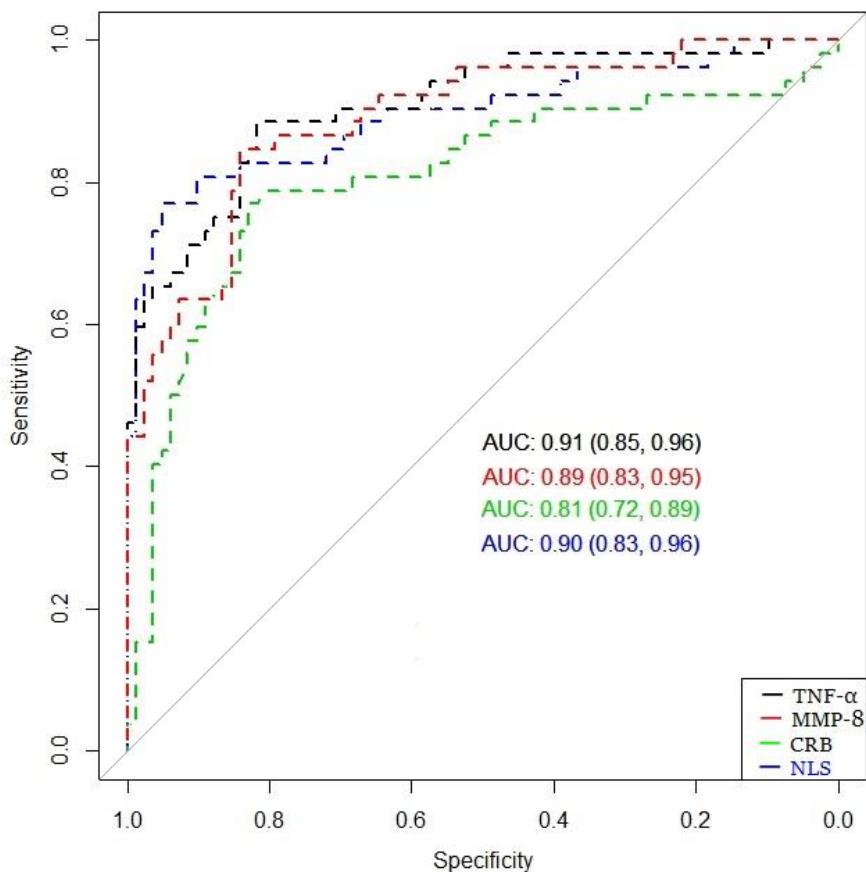
Palyginus tarpusavyje kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų ROC kreives, stebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CRB ir TNF- $\alpha$  AUC reikšmių (0,81 ir 0,91,  $p$  reikšmė = 0,05). Lyginant tarpusavyje CRB, IL-6 ir MMP-8 bei TNF- $\alpha$  su IL-6 ir MMP, statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo stebėta (15 lentelė ir 34 pav.).

Sukurti 4 atskiri modeliai, vertinant kraujo uždegiminius rodiklius kartu su vaisiaus vandenų uždegiminiais rodikliais: CRB + TNF- $\alpha$ , CRB + MMP-8, NLS + CRB ir NLS + MMP-8. Kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų modeliai parodė didesnes prognostines vertes nei vertinant pavienius žymenis: CRB + TNF- $\alpha$  modelio AUC – 0,88, CRB + MMP-8 – 0,89, NLS + TNF- $\alpha$  – 0,91 ir NLS + MMP-8 – 0,93 (15 lentelė, 35 ir 36 pav.). Visi modeliai rodė statistiškai reikšmingai didesnes prognostines vertes nei pavienio CRB vertinimas, tačiau tik vieno modelio (NLS + MMP-8) prognostinės vertės buvo statistiškai reikšmingai didesnės nei pavienio NLS vertinimas. Visi naujai sukurti modeliai tarpusavyje statistiškai reikšmingai nesiskyrė (15 lentelė, 35 ir 36 pav.).

**15 lentelė.** Kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų prognostinių verčių chorioamnionito diagnostikoje palyginimas

Uždegiminiai žymenys (AUC)	CRB (0,81)	NLS (0,9)	MMP-8 (0,89)	TNF- $\alpha$ (0,91)	CRB + TNF- $\alpha$	CRB + MMP-8	NLS + TNF- $\alpha$ (0,91)	NLS + MMP-8 (0,93)
CRB (0,81)	—	0,08	0,11	0,05	0,02	0,01	0,02	0,02
NLS (0,9)	0,08	—	0,89	0,79	0,74	0,87	0,1	0,04
MMP-8 (0,89)	0,11	0,89	—	0,58	0,82	0,98	0,3	0,53
TNF- $\alpha$ (0,91)	0,05	0,79	0,58	—	0,49	0,63	0,53	0,85
CRB+TNF- $\alpha$ (0,88)	0,02	0,74	0,82	0,49	—	0,73	0,22	0,42
CRB+MMP-8 (0,89)	0,01	0,87	0,98	0,63	0,73	—	0,3	0,47
NLS+TNF- $\alpha$ (0,91)	0,02	0,1	0,3	0,53	0,22	0,3	—	0,3
NLS+MMP-8 (0,93)	0,02	0,04	0,42	0,85	0,42	0,47	0,3	—

Santrumpos: CRB – C reaktyvusis baltymas, NLS – neutrofilų ir limfocitų santykis, MMP-8 – matricso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ , AUC – plotas po kreive (angl. *plot under the curve*).



**AUC palyginimas (p reikšmės):**

***CRB ir TNF- $\alpha$ : 0,05***

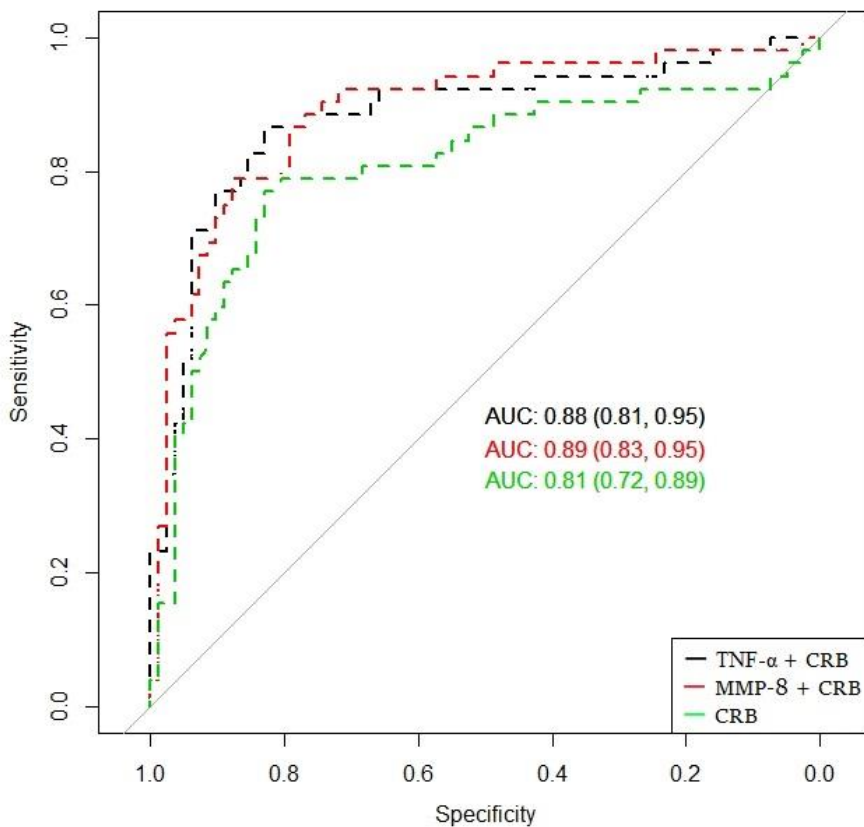
***CRB ir MMP-8: 0,11***

***NLS ir TNF- $\alpha$ : 0,79***

***NLS ir MMP-8: 0,89***

**34 pav.** Motinos kraujo ir vaisiaus vandens uždegiminių žymenų ROC kreivių palyginimas.

Santrumpos: NLS – neutrofilų ir limfocitų santykis, CRB – C reaktyvusis baltymas, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ .



**AUC palyginimas (p reikšmės):**

**CRB ir CRB+TNF- $\alpha$ : 0,02**

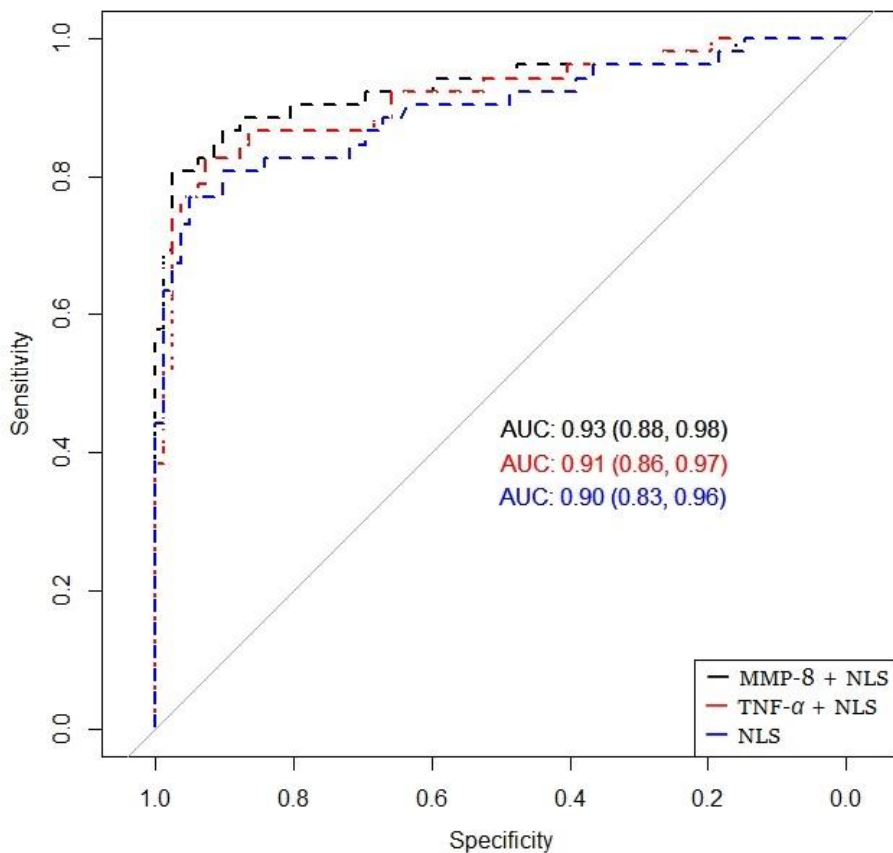
**CRB ir CRB+MMP-8: 0,01**

**CRB+TNF- $\alpha$  ir CRB+MMP-8: 0,73**

**35 pav.** Vieno CRB ir CRB modelių su MMP-8 ir TNF- $\alpha$  ROC kreivių palyginimas.

Santrumpos: CRB – C reaktyvusis baltymas, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ .





**AUC palyginimas (p reikšmės):**  
*NLS ir NLS+TNF- $\alpha$ : 0,1*  
*NLS ir NLS+MMP-8: 0,04*  
*NLS+TNF- $\alpha$  ir NLS+MMP-8: 0,3*

**36 pav.** Vieno NLS ir NLS modelių su MMP-8 ir TNF- $\alpha$  ROC kreivių palyginimas.

Santrumpos: NLS – neutrofilų ir limfocitų santykis, MMP-8 – matrikso metaloproteinazė 8, TNF- $\alpha$  – vėžio nekrozės faktorius  $\alpha$ .

## 6. REZULTATŲ APTARIMAS

Greita ir tiksli chorioamnionito diagnostika – vienas svarbiausių uždavinių, esant prieššlaikiniam neišnešoto vaisiaus dangalų plyšimui. Šiuo metu chorioamnionito diagnostikai dažniausiai naudojami klinikiniai Gibso kriterijai, kurių specifiškumas siekia 98 proc., tačiau jautrumas – tik 15 proc. [27], todėl vis daugiau dėmesio skiriama tyrimams, siekiant aptikti naujus uždegiminius pokyčius, kurie padėtų tiksliau ir greičiau nustatyti chorioamnionito diagnozę.

Savo tyrime įvertinome uždegiminius pokyčius rutiniškai atliekamuose motinos kraujo tyrimuose ir biocheminius pokyčius neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse. Motinos kraujo tyrime įvertinome leukocitų skaičius, CRB pokyčius ir neutrofilų-limfocitų santykį. NLS yra plačiai naudojamas įvairių infekcijų diagnostikoje, tačiau akušerijoje šio santykio vertinimas nėra rutiniškai priimtas ir mokslinių straipsnių, analizuojančių NLS reikšmę chorioamnionito diagnostikoje, esama tik pavienių. Iki šiol dažniausiai naudojamas ir į klinikinius kriterijus įtrauktas leukocitų skaičius vertinimas, mūsų tyrime vertinant uždegiminius motinos kraujo pokyčius, turėjo žemesnes diagnostines vertes nei NLS: leukocitų skaičiaus santykinė rizika daugialypėje logistinės regresijos analizėje kraujo uždegiminių žymenų siekė 1,38 (95 % PI: 1,19–1,6), AUC – 0,81, o NLS santykinė rizika siekė 5,24 (95 % PI: 1,89–14,52), o AUC – 0,89. Skirtumas tarp leukocitų skaičiaus ir NLS diagnostinių verčių buvo netoli priimtino statistiškai reikšmingo skirtumo ( $p$  reikšmė = 0,053). NLS mokslinėje literatūroje vertinamas kaip tikslesnis infekcijos rodiklis nei pavienių leukocitų rūšių vertinimas, nes vienu metu sujungia 2 uždegiminius žymenis. Savo tyrime nustatėme optimalią NLS ribinę vertę – 5,97, kurios jautrumas siekė 77 proc., o specifiškumas – 98 proc. M.A. Kim su bendraautoriais 2014 m. savo tyrime taip pat įvertino NLS pranašumą prieš leukocitų skaičiaus vertinimą. Jų apskaičiuota NLS ribinė vertė buvo panaši į mūsų nustatytą ribinę vertę – 6,48, kurios jautrumas siekė 71,4 proc., o specifiškumas – 77,9 proc. [48]. Šiame tyrime taip pat buvo stebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp NLS ir CRB diagnostinių verčių, ko mes savo tyrime nepastebėjome. Skirtingus rezultatus galėjo lemti tai, kad M.A. Kim su kolegomis į tyrimą įtraukė visas nėščias moteris, kurioms diagnozuotas prieššlaikinis gimdymas nuo 24 iki 37 savaičių, o mūsų tyrime dalyvavo moterys, kurioms nustatytas prieššlaikinis neišnešoto vaisiaus dangalų plyšimas nuo 22 iki 34 savaičių.

NLS vertinimą apriboja tai, kad kortikosteroidų vartojimas sukelia leukocitozę su formulės nuokrypiu į kairę ir reliatyvia limfopenija, kuri tęsiasi

24–48 val. [37–39]. Visoms nėščiosioms, esant priešlaikiniam neišnešioti vaisiaus dangalų plyšimui iki 33<sup>+6</sup> savaičių, skiriamas vaisiaus plaučių brandinimas kortikosteroidais. Todėl NLS vertinimas kortikosteroidų skyrimo metu ir iki 48 val. po paskutinės dozės suleidimo nėra tikslus. Taip pat leukocitų formulę gali keisti magnio sulfato skyrimas vaisiaus neuroprotekcijai bei tokios ligos, kaip nėščiųjų hipertenzinės būklės, gestacinis diabetas ar intrahepatinė nėščiųjų cholestazė [143–145]. Todėl NLS rekomenduojama vertinti atsižvelgiant į esamą klinikinę situaciją.

Neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse pasirinkome vertinti citokinus, kurių didelė diagnostinė vertė buvo įrodyta tiriant amniocentezės būdu paimtus vaisiaus vandenį (IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8, sTLR-2, sTLR-4,  $\alpha$  defensinus), ir suPAR žymenį, kurio didelė diagnostinė vertė nustatoma įvairių infekcijų metu. Mūsų tyrime stebėti statistiškai reikšmingi žymenys buvo IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8 ir suPAR, o sTLR-2, sTLR4 ir  $\alpha$  defensinai statistiškai reikšmingai tarp moterų, kurioms diagnozuotas histologinis chorioamnionitas, ir kontrolinės grupės nesiskyrė.

TNF- $\alpha$  ir MMP-8 parodė didžiausias diagnostines vertes iš visų tirtų imunologinių žymenų. TNF- $\alpha$  santykinė rizika daugialypėje analizėje buvo 1,02 (95 % PI: 1,01–1,06), o MMP-8 – 1,03 (95 % PI: 1,01–1,04). TNF- $\alpha$  ir MMP-8 AUC reikšmės (0,91 ir 0,89) buvo statistiškai reikšmingai didesnės už visų kitų žymenų, bet tarpusavyje statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Mūsų tyrime nustatyta optimali TNF- $\alpha$  ribinė vertė buvo 21,17 pg/ml, kai jautrumas siekė 88 proc., specifiškumas – 84 proc., o MMP-8 nustatyta optimali ribinė vertė – 172,53 ng/ml, kai jautrumas – 80 proc., o specifiškumas – 87 proc. N. Thomakos su kolegomis 2001 m. tyrė amniocentezės būdu paimtus vaisiaus vandenį ir nustatė, kad TNF- $\alpha$  vertė > 6,3 pg/ml (jautrumas – 7,8 proc., specifiškumas – 70,1 proc.) yra susijusi su teigiamu vaisiaus vandenų pasėlio tyrimu [74]. G. Kayemas su bendraautorais įvertino TNF- $\alpha$  neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse ir pastebėjo, kad TNF- $\alpha$  koncentracijos > 50  $\mu$ g/l jautrumas prognozuojant klinikinį chorioamnionitą siekia 47 proc., o specifiškumas – 81 proc. [146].

J.S. Parkas su bendraautorais 2001 m. savo tyrime nustatė ribinę optimalią MMP-8 vertę amniocentezės būdu paimtuose vandenyse (23 ng/ml), kurios jautrumas – 90 proc., o specifiškumas – 78 proc. [84]. Mynti su kolegomis 2016 m. nustatė kiek didesnę optimalią MMP-8 vertę (41,5 mg/ml), kurios jautrumas išaugo net iki 100 proc., tačiau specifiškumas sumažėjo iki 69 proc. [80]. E. Holmstrom su kolegomis pateikė prieštarigus duomenis: jų tyrimo rezultatai parodė, kad MMP-8 koncentracija vaisiaus vandenyse nesiskyrė tarp moterų, kurioms nustatyta intraamnioninė infekcija ir kurioms ši infekcija nebuvo diagnozuota [147]. Tačiau į šį tyrimą buvo įtrauktos tik 25 moterys,

kurioms diagnozuotas PNVDP, ir tik 10 iš šių atvejų buvo diagnozuota intraamnioninė infekcija.

Mūsų tyrime IL-6 taip pat buvo statistiškai reikšmingas žymuo histologinio chorioamnionito diagnostikoje, tačiau prognostinės vertės žemesnės nei TNF- $\alpha$  ar MMP-8. IL-6 uždegimo metu didėja nuo keliasdešimt iki kelių šimtų kartų, todėl IL-6 koncentracijai pasikeitus per 1 matavimo vienetą, chorioamnionito rizika keičiasi neženkliai. Santykinė IL-6 rizika nustatyta 1,0001 (95 % PI: 1,0002–1,002), AUC – 0,81, kuris statistiškai reikšmingai mažesnis nei TNF- $\alpha$  ir MMP-8. Nustatyta optimali ribinė vertė – 1 389,82 pg/ml, kurios jautrumas siekė 88 proc., o specifiškumas – 70 proc. N. Chaiyasitas su kolegomis, kaip ir mes savo tyrime, nustatė, kad MMP-8 turi geresnes prognostines reikšmes chorioamnionito diagnostikoje nei IL-6 [83]. M. Kacerovsky su bendraautorais savo tyrime įvertino IL-6 koncentraciją neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse ir nustatė optimalią ribinę vertę chorioamnionito diagnostikoje 2 500 pg/ml, kurios jautrumas ir specifiškumas siekė 91 proc. Šis tyrimas skyrėsi nuo mūsų tyrimo tuo, kad buvo įtraukti atvejai esant PNVDP nuo 34 iki 37 savaičių [69]. Kitas tyrimas, savo struktūra panašiausias į mūsų tyrimą, buvo atliktas M. Kunze ir bendraautorų 2016 m. Į jį įtrauktos moterys, kurioms nustatytas PNVDP nuo 23 iki 33 savaičių. Šiame tyrime nustatyta optimali ribinė IL-6 reikšmė buvo 1 000 pg/ml. Šio tyrimo metodika nuo mūsų tyrimo skyrėsi tuo, kad vaisiaus vandenys buvo surenkami panaudojus higieninius paketus ir vaisiaus vandenį iš jų išspaudus česnakų spaustuku [148].

Mūsų tyrime taip pat stebėtos statistiškai reikšmingos suPAR neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse diagnostinės vertės histologinio chorioamnionito diagnostikoje. Apskaičiuotas AUC buvo 0,78 statistiškai reikšmingai mažesnis nei TNF- $\alpha$  ir MMP-8, tačiau panašus kaip IL-6. Literatūroje iki šiol nėra paskelbta tyrimų, analizuojančių šio žymens koncentracijas vaisiaus vandenyse, tačiau Y. Cekmez su bendraautorais 2013 m. savo tyrime nustatė, kad serumo uPAR tyrimo jautrumas ir specifiškumas diagnozuojant histologinį chorioamnionitą yra panašūs kaip IL-6 [105].

Tirpūs TLR-2 ir TLR-4 mūsų tyrime statistiškai reikšmingų rezultatų histologinio chorioamnionito diagnostikoje neturėjo. M. Kacerovsky su bendraautorais savo tyrime išanalizavo sTLR-2 koncentraciją gimdos kaklelio ir makšties išskyrose ir jų rezultatai taip pat parodė, kad sTLR-2 neturi statistiškai reikšmingų prognostinių verčių histologinio chorioamnionito diagnostikoje [149]. Kitų tyrimų, nagrinėjančių sTLR-4 koncentraciją neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse ar makšties išskyrose, iki šiol nebuvo paskelbta. O amniocentezės būdu tirtuose vaisiaus

vandenyse sTLR-2 ir sTLR-4 parodė statistiškai reikšmingus rezultatus histologinio chorioamnionito diagnostikoje [93, 150]. Nustatyta optimali sTLR-2 ribinė vertė buvo 222,7 ng/ml, kurios jautrumas siekė 63 proc., o specifiškumas – 98 proc. [93].

$\alpha$  defensinai mūsų tyrime statistiškai reikšmingų rezultatų histologinio chorioamnionito diagnostikoje taip pat neturėjo. Prieštarungas duomenis pateikė M. Lucovnikas su bendraautoriais, kurie savo tyrime taip pat analizavo defensinų koncentraciją neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse, tačiau į šį tyrimą buvo įtrauktos tik 42 nėščios moterys (29 iš jų diagnozuotas histologinis choriomnionitas), kurioms diagnozuotas priešlaikinis neišnešio to vaisiaus dangalų plyšimas iki 32 sav. Jų tyrime defensinų koncentracija buvo statistiškai reikšmingai didesnė histologinio choriomnionito grupėje nei grupėje, kurioje infekcijos nebuvo diagnozuota [101]. Vertinant  $\alpha$  defensinų prognostines reikšmes amniocentezės būdu paimtuose vaisiaus vandenyse, apskaičiuotas  $\alpha$  defensinų jautrumas histologinio chorioamnionito diagnozei nustatyti buvo 86,4 proc. o specifiškumas svyravo nuo 70,6 iki 88,2 proc. [151].

Veiksniai, galintys nulemti skirtingus vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų rezultatus skirtinguose tyrimuose:

1. Skirtinga vaisiaus vandenų paėmimo technika. Šiaurės Amerikoje rutiniškai priimta, įtariant chorioamnionitą, vaisiaus vandenį ištyrimui paimti amniocentezės būdu. Amniocentezės būdu paimti vaisiaus vandenys nėra užteršti makšties floros, todėl uždegiminių žymenų koncentracijos vaisiaus vandenyse nustatomos mažesnės nei surenkant vaisiaus vandenį per makštį. Europos šalių mokslininkai daugiau tyrimų atlieka surinkdami vaisiaus vandenį neinvaziniu būdu, tačiau stebimos skirtingos vaisiaus vandenų surinkimo metodikos: vieni tyrėjai vaisiaus vandenį surenka per makštį panaudoję tamponus, higieninius įklotus, kiti sterilius makšties skėtiklius ar specialius surinkiklius (pvz., *Yoon* vaisiaus vandenų surinkiklis).
2. Skirtingas vaisiaus vandenų paėmimo laikas. Vieni tyrėjai vaisiaus vandenį ėmė kasdien ir, siekiant stipresnio ryšio tarp histologinio placentos ištyrimo ir vaisiaus vandenų analizės rezultatų, tyrimuose buvo vertinami tik tie mėginiai, kurie buvo paimti arčiausiai gimdymo. Kiti autoriai vaisiaus vandenį tyrė kelis kartus per savaitę ir į analizę įtraukė paskutinį vaisiaus vandenų mėginį, nepriklausomai nuo laiko trukmės iki gimdymo. Todėl skirtinguose tyrimuose bevandenį laikotarpis nuo vaisiaus vandenų paėmimo iki gimdymo svyruoja nuo kelių iki keliasdešimt valandų. Esant ilgesniam nei 48

val. laikotarpiui nuo vaisiaus vandenų paėmimo iki gimdymo, vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų ir histologinio chorioamnionito tarpusavio ryšys gali būti interpretuojamas klaidingai. Imant vaisiaus vandenį pirmo gimdymo metu, uždegiminių žymenų koncentracija gali būti padidėjusi dėl paties gimdymo proceso.

3. Skirtinga vaisiaus vandenų paruošimo ir laikymo metodika. Prieš atliekant vaisiaus vandenų analizę ELISA metodu, rekomenduojama vaisiaus vandenį centrifuguoti. Bendrai patvirtintos vaisiaus vandenų paruošimo metodikos nėra, todėl centrifugavimo dažnis gali skirtis. Taip pat vieni tyrėjai tiria šviežiai paimtus vaisiaus vandenį, kiti juos šaldo ir analizę atlieka tik suformavę atitinkamą mėginių grupę. Skirtinga vaisiaus vandenų paruošimo ir laikymo metodika gali lemti imunologinių žymenų skirtingas reikšmes atskiruose tyrimuose.
4. Skirtinga nėštumo trukmė. Tiriamųjų grupės dažnai suformuojamos pasirenkant įvairios nėštumo trukmės moteris. Dažniausiai įtraukiamos moterys, esant neišnešiotam nėštumui nuo 22<sup>+0</sup> ar 23<sup>+0</sup> iki 33<sup>+6</sup> savaičių, tačiau kiti autoriai įtraukia visas nėščias moteris iki 36<sup>+6</sup> savaičių ar nuo 34<sup>+0</sup> iki 36<sup>+6</sup> savaičių. Uždegiminių žymenų koncentracija gali kisti priklausomai nuo nėštumo trukmės, todėl tyrimų, į kuriuos įtrauktos moterys, kurių nėštumo trukmė yra skirtinga, rezultatai tarpusavyje gali skirtis.
5. Skirtingos tiriamųjų grupės. Vieni tyrėjai įtraukia visas nėščias moteris, kurioms diagnozuotas priešlaikinis gimdymas, kiti – tik priešlaikinius gimdymus, kuomet diagnozuotas PNVD. Vieni tyrėjai taiko neįtraukimo kriterijus moterims, kurioms diagnozuotas gestacinis diabetas, nėščiųjų hipertenzinės būklės, vaisiaus raidos ydos ar placentos patologija, kiti tyrėjai įtraukia visas moteris, netaikydami šių neįtraukimo kriterijų. Taip pat vieni tyrėjai į savo tyrimą įtraukė tik vienvaisius nėštumus, kiti – ir vienvaisius, ir daugiavaisius nėštumus. Nėštumo metu nustatytos patologijos gali keisti uždegiminių žymenų koncentraciją vaisiaus vandenyse, todėl tyrimų su skirtingais įtraukimo ir neįtraukimo kriterijais rezultatai tarpusavyje gali skirtis.
6. Skirtinga chorioamnionito diagnostika. Vieni tyrėjai tiriamuosius į grupes skirsto remdamiesi histologinio ar mikrobiologinio tyrimo rezultatais, kiti remdamiesi biocheminiais iki šiol nustatytais vaisiaus vandenų pokyčiais. Biocheminiai žymenys yra plačiai tyrinėjami, tačiau vienos aiškios kurio nors uždegiminio žymens ribinės vertės ir vaisiaus vandenų ištyrimo metodikos iki šiol nėra patvirtinta.

Mikrobiologinis tyrimas yra laikomas vienu tiksliausių tyrimų chorioamnionito diagnostikai nėštumo metu, o histologinis chorioamnionitas – auksiniu standartu intrauterinės infekcijos diagnostikoje po gimdymo. Tyrėjams pasirinkus skirtingus chorioamnionito diagnostikos kriterijus, suformuojamos skirtingos tiriamųjų grupės, kuriose imunologinių žymenų koncentracija gali skirtis.

7. Imunologinių žymenų tyrimai atliekami skirtingomis metodikomis, naudojami įvairūs reagentai. Tyrimuose dažniausiai nurodoma, kad imunologiniams žymenims nustatyti naudojamas ELISA metodas, tačiau komercinių rinkinių pavadinimai nėra nurodomi. Skirtingų reagentų jautrumas gali skirtis, todėl, panaudojus skirtingus reagentus tam pačiam imunologiniam žymeniui nustatyti, reikšmės tarpusavyje gali nežymiai skirtis.

Savo tyrime taip pat įvertinome histologinio chorioamnionito diagnostikos galimybes motinos kraujo uždegiminius pokyčius vertindami kartu su imunologinių žymenų pokyčiais vaisiaus vandenyse. Buvo atrinkti 2 geriausias diagnostines vertes turėję motinos kraujo (CRB ir NLS) ir vaisiaus vandenų (TNF- $\alpha$  ir MMP-8) uždegiminiai žymenys. Panaudojus šiuos 4 žymenis, sukurti 4 modeliai: CRB + TNF- $\alpha$ , CRB + MMP-8, NLS + CRB ir NLS + MMP-8. Visi modeliai rodė statistiškai reikšmingai didesnes prognostines vertes nei pavienio CRB vertinimas, tačiau tik vieno modelio (NLS + MMP-8) prognostinės vertės buvo statistiškai reikšmingai didesnės nei vieno NLS. Nei vienas modelis statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo pavienių vaisiaus vandenų imunologinių žymenų MMP-8 ir TNF- $\alpha$ . Vertinant vienus žymenis vaisiaus vandenyse, TNF- $\alpha$  diagnostinės vertės buvo didžiausios, tačiau modelyje kartu su motinos kraujo uždegiminiais žymenimis MMP-8 diagnostinės vertės buvo didesnės. Taip yra todėl, kad TNF- $\alpha$  ir kraujo uždegiminių žymenų jautrumas ir specifiskumas diagnozuojant histologinį chorioamnionitą yra panašūs, o MMP-8 mažėjant specifiskumui, jautrumas išlieka aukštesnis nei kitų žymenų.

## 6.1. Tyrimo privalumai

1. Mūsų atliktas tyrimas yra vienas didžiausių iš publikuotų tyrimų, kuriame buvo analizuojama IL-6, MMP-8, TNF- $\alpha$ ,  $\alpha$  defensinų ir TLR-2 koncentracija neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse.
2. Tai yra pirmas publikuotas tyrimas, kuriame vertinta TLR-4 ir suPAR koncentracija neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse. Taip pat tai yra pirmas publikuotas tyrimas, kuriame vertinta NLS reikšmė chorioamnionito diagnostikai, esant PNVDP iki 34 savaičių.
3. Moterys buvo skirstomos į grupes tik atliekant statistinę duomenų analizę, todėl analizuotų uždegiminių žymenų rezultatai neturėjo įtakos ištyrimo ir gydymo taktikai.
4. Visi imunologiniai vaisiaus vandenų tyrimai buvo atliekami vieno imunologo ir histologiniai placentos tyrimai buvo atliekami vieno gydytojo patologo.

## 6.2. Tyrimo trūkumai

1. Šio tyrimo metu surinkti vaisiaus vandenys buvo nucentrifuguojami, išskirstomi į frakcijas ir užšaldomi iki  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Imunologiniai tyrimai buvo atliekami tik surinkus atitinkamą mėginių skaičių, reikalingą norint užpildyti tiriamąsias plokšteles. M. Kacerovsky su bendraautorais pateikė duomenis, įrodančius stiprią tiesioginę koreliaciją tarp imunologinių žymenų koncentracijų tiriant šviežiai paimtus ir užšaldytus vaisiaus vandenys [152], tačiau tokia mėginių paruošimo ir laikymo metodika gali turėti įtakos uždegiminių žymenų tyrimų rezultatams.
2. Savo tyrime chorioamnionito diagnostikai pasirinkome histologinį placentos ir vaisiaus dangalų tyrimą. Šis chorioamnionito diagnostikos metodas laikomas auksiniu standartu intrauterinės infekcijos diagnostikoje [33], tačiau yra tyrimų, įrodančių histologinio chorioamnionito abejotina reikšmę naujagimio išėjimams [153–155].



## 7. IŠVADOS

1. Vertinant motinos kraujo uždegiminių žymenų tikslumą chorioamnionito diagnostikoje, NLS turi didesnes diagnostines vertes nei leukocitų skaičiaus ir CRB vertinimas, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp NLS ir CRB nestebima.
2. IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8 ir suPAR neinvaziniu būdu paimtuose vaisiaus vandenyse yra statistiškai reikšmingi histologinio chorioamnionito diagnostikos žymenys, o sTLR-2, sTLR-4 ir  $\alpha$  defensinai - statistiškai reikšmingos vertės neturi. Didžiausią histologinio chorioamnionito diagnostinę vertę turi TNF- $\alpha$  ir MMP-8.
3. Nustatytos motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų optimalios reikšmės chorioamnionito diagnostikai:
  - 3.1. Kraujo uždegiminių žymenų nustatytos optimalios ribinės vertės:
    - NLS – 5,97 (jautrumas – 77 proc., specifiškumas – 95 proc.);
    - CRB – 8,56 mg/l (jautrumas – 77 proc., specifiškumas – 84 proc.).
  - 3.2. Vaisiaus vandenų uždegiminių žymenų optimalios ribinės vertės :
    - IL-6 – 1 389,82 pg/ml (jautrumas – 88 proc., specifiškumas – 70 proc.);
    - TNF- $\alpha$  – 21,17 pg/ml (jautrumas – 88 proc., specifiškumas – 84 proc.);
    - MMP-8 – 172,53 ng/ml (jautrumas – 80 proc, specifiškumas – 87 proc);
    - SuPAR – 30,08 mkg/ml (jautrumas – 63 proc, specifiškumas – 85 proc).
4. Vertinant CRB kartu su MMP-8 ar TNF- $\alpha$  ir NLS kartu su MMP-8, stebima statistiškai reikšmingai didesnė diagnostinė vertė nei vertinant pavienį CRB ar NLS.

## 8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

### 1. Klinikinė chorioamnionito diagnostika:

- rekomenduojama papildomai vertinti NLS;
- NLS  $> 5,97$ , rekomenduojama vertinti kaip padidėjusią chorioamnionito riziką;
- NLS vertinti ne anksčiau nei po 48 val. nuo paskutinės kortikosteroidų dozės suleidimo.

### 2. Esant galimybei atlikti vaisiaus vandenų imunologinę analizę:

- rekomenduojama vaisiaus vandenį surinkti neinvaziniu būdu, paimant per makštį steriliu makšties skėtikliu;
- vaisiaus vandenyse rekomenduojama ištirti MMP-8 ir TNF- $\alpha$  imunologinius žymenis;
- MMP-8 koncentraciją  $> 172,53$  ng/ml ir TNF- $\alpha$   $> 21,17$  pg/ml rekomenduojama vertinti kaip padidėjusią chorioamnionito riziką.

### 3. Siekiant pagerinti chorioamnionito prognozę, rekomenduojama motinos kraujo ir vaisiaus vandenų uždegiminiuosius žymenis vertinti kartu.

## 9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intraamniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(5): 1130–1136.
2. Blume HK, Li CI, Loch CM, Koepsell TD. Intrapartum fever and chorioamnionitis as risks for encephalopathy in term newborns: a case-control study. *Dev Med Child Neurol.* 2008; 50(1): 19–24.
3. Zackler A, Flood P, Dajao R, Maramara L, Goetzl L. Suspected Chorioamnionitis and Myometrial Contractility: Mechanisms for Increased Risk of Cesarean Delivery and Postpartum Hemorrhage. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* 2019; 26(2): 178–183.
4. Fowler JR, Simon LV. Chorioamnionitis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2021 Feb 21]. Priega internete: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532251/>>.
5. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1993; 36(4): 795–808.
6. Cornette L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9(6): 459–470.
7. Conde-Agudelo A, Romero R, Jung EJ, Garcia Sanchez AJ. Management of clinical chorioamnionitis: an evidence-based approach. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 223: 848–869.
8. Catano-Sabogal CP, Fonseca J, Garcia-Perdomo HA. Validation of Diagnostic Tests for Histologic Chorioamnionitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2018; 228: 13-26.
9. Jummaat F, Ahmad S, Ismail NAM. 5-Year review on amniocentesis and its maternal fetal complications. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2019; 40(2): [/j/hmbci.2019.40.issue-2/hmbci-2019-0006/hmbci-2019-0006.xml](#).
10. Geffen KT, Ben-Zvi O, Weitzner O, Peleg A, Biron-Shental T, Sukenik-Halvey R. The yield and complications of amniocentesis performed after 24 weeks of gestation. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2017; 296: 69–75.
11. Musilova I, Bestvina T, Stranik J, Stepan M, Jacobsson B, Kacerovsky M. Transabdominal Amniocentesis Is a Feasible and Safe Procedure in Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *Fetal Diagn. Ther.* 2017; 42: 257–261.
12. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in

- 2014: a systematic review and modelling analysis. *The Lancet* 2019; 7(1): E37-E46.
13. Higienos instituto sveikatos informacijos centras. Gimimų medicininiai duomenys, 2020. Prieinama internete pagal prieigą: [https://hi.lt/uploads/pdf/leidiniai/Statistikos/Gimimu/gimimai\\_2020.pdf](https://hi.lt/uploads/pdf/leidiniai/Statistikos/Gimimu/gimimai_2020.pdf)
  14. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371(9606): 75–84.
  15. Metcalfe A, Lisonkova S, Sabr Y, Stritzke A, Joseph KS. Neonatal respiratory morbidity following exposure to chorioamnionitis. *BMC Pediatrics*. 2017; 17: 128.
  16. Tita ATN, Andrews WW. Diagnosis and Management of Clinical Chorioamnionitis. *Clin Perinatol*. 2010; 37(2): 339–354.
  17. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 164 (5 Pt 1): 1317–1326.
  18. Sung JH, Choi SJ, Oh SY, Roh CR, Kim JH. Revisiting the diagnostic criteria of clinical chorioamnionitis in preterm birth. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2017; 124(5): 775–783.
  19. Conti N, Torricelli M, Voltolini C, Vannuccini S, Clifton VL, Bloise E, et al. Term histologic chorioamnionitis: a heterogeneous condition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 188: 34–38.
  20. Newton ER. Preterm Labor, Preterm Premature Rupture of Membranes, and Chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 2005; 32: 571–600.
  21. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Biedaet J, et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion – a molecular microbiological study. *J Perinat Med*. 2019; 47: 915–931.
  22. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2: 675–680.
  23. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*. 2012; 3: 79.
  24. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11: 373–384.
  25. Carpenter S, O’Neill LA. How important are toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol*. 2007; 9: 1891–1901.
  26. Gibbs RS. Diagnosis of intra-amniotic infection. *Semin Perinatol*. 1977; 1(1): 71–77.
  27. Maki Y, Furukawa S, Nakayama T, Oohashi M, Shiiba N, Furuta K, et al. Clinical chorioamnionitis criteria are not sufficient for predicting intraamniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022; 35(1): 52-57.

28. Lencki SG, Maciulla MB, Eglinton GS. Maternal and umbilical cord serum interleukin levels in preterm labor with clinical chorioam - nionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170 (5 Pt 1): 1345–1351.
29. Higgins RD, Saade G, Polin RA, Grobman WA, Buhimschi IA, Watterberg K, et al. Evaluation and Management of Women and Newborns With a Maternal Diagnosis of Chorioamnionitis: Summary of a Workshop. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(3): 426–436.
30. Romero R, Miranda J, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Martinez A, et al. Clinical chorioamnionitis at term I: microbiology of the amniotic cavity using cultivation and molecular techniques. *J Perinat Med.* 2015; 43(1): 19–36.
31. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140: 698–713.
32. Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C. Amniotic Fluid Infection Nosology Committee Society for Pediatric Pathology Perinatal Section. Amniotic infection syndrome: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol.* 2003; 6: 435–448.
33. Pugni L, Pietrasanta C, Acaia B, Merlo D, Ronchi A, Ossola MW, et al. Chorioamnionitis and neonatal outcome in preterm infants: a clinical overview. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29: 1525–1529.
34. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Laboratory Investigation.* 2009; 89: 924–936.
35. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 2018; 9: 1-17.
36. de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(6): 378–391.
37. Kurtoglu E, Kokcu A, Celik H, Tosun M, Malatyalioglu E. May ratio of neutrophil to lymphocyte be useful in predicting the risk of developing preeclampsia? A pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28: 97–99.
38. Sahbaz A, Cicekler H, Aynioglu O, Isik H, Ozmen U. Comparison of the predictive value of plateletcrit with various other blood parameters in gestational diabetes development. *J Obstet Gynaecol.* 2016; 36: 589–593.
39. Kirbas A, Biberoglu E, Daglar K, Iskender C, Erkaya S, Dede H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a diagnostic marker of intrahepatic

- cholestasis of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 180: 12–15.
40. Davis JM, Albert JD, Tracy KJ, Calvano SE, Lowry SF, Shires GT, et al. Increased neutrophil mobilization and decreased chemotaxis during cortisol and epinephrine infusions. *J Trauma.* 1991; 31: 725–731.
  41. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31: 318–324.
  42. Matalka KZ, Sidk A. Academic Stress — Influence on Leukocyte Distribution, Cortisol, and Prolactin. *Lab Med.* 1998; 29: 697–701.
  43. Farkas JD. Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR): Free upgrade to your WBC. *PulmCrit*; 2019. Prieiga internete: <<https://emcrit.org/pulmcrit/nlr/>>.
  44. Martins EC, Silveira L da F, Viegas K, Beck AD, Fioravanti-Junior G, Cremonese RV, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in the early diagnosis of sepsis in an intensive care unit: a case-control study. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2019; 31: 63–70.
  45. Imran MM, Ahmed U, Usman U, Ali M, Shaukat A, Gul N. Neutrophil/Lymphocyte Ratio – A Marker of COVID-19 Pneumonia Severity. *Int J Clin Pract.* 2021; 00:e13698.
  46. Hajibandeh S, Hajibandeh S, Hobbs N, Mansour M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute appendicitis and distinguishes between complicated and uncomplicated appendicitis: A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg.* 2020; 219(1): 154-163.
  47. Jiang J, Liu R, Yu X, Yang R, Xu H, Mao Z, Wang Y. The neutrophil-lymphocyte count ratio as a diagnostic marker for bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2019; 37(8): 1482-1489.
  48. Kim MA, Lee YS, Seo K. Assessment of Predictive Markers for Placental Inflammatory Response in Preterm Births. *PLoS One.* 2014; 9: e107880.
  49. Pathak A, Agrawal A. Evolution of C-Reactive Protein. *Front Immunol.* 2019; 10: 943.
  50. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(47): 48487–48490.
  51. Glingston RS, Deb R, Kumar S, Nagotu S. Organelle dynamics and viral infections: at cross roads. *Microbes Infect.* 2019; 21(1): 20-32.
  52. Pfäfflin A, Schleicher E. Inflammation markers in point-of-care testing (POCT) Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009; 393(5): 1473–1480.
  53. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007; 45(2): 27–37.
  54. van der Meer JW, Vogels MT, Netea MG, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and treatment of disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 856: 243–251.

55. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4): 1162–1172.
56. Bamola VD, Sharma N, Chaudhry R. Probiotics and Immunomodulation. In book: *Probiotics*. Chapter: Probiotics and Immunomodulation. Probiotics; 2013: 21-38.
57. Suzuki Y, Yamamoto T, Kojima K, Tanemura M, Tateyama H, Suzumori K. Evaluation Levels of Cytokines in Amniotic Fluid of Women with Intrauterine Infection in the Early Second Trimester. *Fetal Diagn Ther*. 2006; 21(1): 45–50.
58. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst R-M, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003; 82(5): 423–431.
59. Xu GY, Yu HA, Hong J, Stahl M, McDonagh T, Kay LE, Cumming DA. Solution Structure of Recombinant Human Interleukin-6. *J. Mol. Biol*. 1997; 268: 468–481.
60. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016; 64(6): 1403–1415.
61. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y. 1989. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74: 1241–1244.
62. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485–517.
63. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235–238.
64. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, et al. Brief report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2499–2503.
65. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(10): a016295.
66. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Gonzalez R, Diamond MP, et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169(4): 839–851.
67. Cobo T, Palacio M, Martínez-Terron M, Navarro-Sastre A, Bosch J, Filella X, et al. Clinical and inflammatory markers in amniotic fluid as predictors of

- adverse outcomes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205: 126.e1-8.
68. Chaemsathong P, Romero R, Korzeniewski SJ, Martinez-Varea A, Dong Z, Yoon BH, et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intraamniotic inflammation/infection *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29(3): 360-367.
  69. Kacerovsky M, Musilova I, Stepan M, Andrys C, Drahosova M, Jacobsson B. Detection of intraamniotic inflammation in fresh and processed amniotic fluid samples with the interleukin-6 point of care test. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 213: 435–436.
  70. Eck MJ, Sprang SR. Announcing the Worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology.* 2003; 10(12): 980.
  71. Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccharide. *Biol Reprod.* 1997; 57: 1438–1444.
  72. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microscopy Research and Technique.* 2000; 50: 184–195.
  73. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008; 118(11): 3537–3545.
  74. Thomakos N, Daskalakis G, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  at mid-trimester genetic amniocentesis: Relationship to intra-amniotic microbial invasion and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 148: 147–151.
  75. Vihinen P, Ala-aho R, Kahari VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 203–220.
  76. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827–839.
  77. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562–573.
  78. Vihinen P, Kähäri WK. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99: 157–166.
  79. Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Maletta M, Yeo KJ. Snapshots of the Reaction Mechanism of Matrix Metalloproteinases. *Angewandte Chemie.* 2006; 45(47): 7952–7955.



80. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinase8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22(2): 73–81.
81. Thirkettle S, Decock J; Arnold H, Pennington C, Jaworski D, Edwards DR. Matrix metalloproteinase 8 (collagenase 2) induces the expression of interleukins 6 and 8 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2013; 288(23): 16282–16294.
82. Vrachnis N, Karavolos S, Iliodromiti Z, Sifakis S, Siristatidis C, Mastorakos G, et al. Review: Impact of mediators present in amniotic fluid on preterm labour. *Vivo Athens Greece.* 2012; 26(5): 799–812.
83. Chaiyasit N, Romero R, Chaemsaitong P, Docheva N, Bhatti G, Kusanovic JP, et al. Clinical chorioamnionitis at term VIII: a rapid MMP-8 Test for the identification of intra-amniotic inflammation. *J Perinat Med.* 2017; 45(5): 539–550.
84. Park JS, Romero R, Yoon BH, Moon JB, Oh SY, Han SY, Ko EM. The relationship between amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 and funisitis. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 1156–1161.
85. Myntti T, Rahkonen L, Patari-Sampo A, Tikkanen M, Sorsa T, et al. Comparison of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 and cathelicidin in the diagnosis of intra-amniotic infection *Journal of Perinatology* 2016; 36: 1049–1054.
86. Park CW, Lee SM, Park JS, Jun JK, Romero R, Yoon BH. The antenatal identification of funisitis with a rapid MMP-8 bedside test. *J Perinat Med.* 2008; 36: 497–502.
87. Jin MS, Lee JP. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity.* 2008; 29: 182–191.
88. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4: a006049.
89. Tiwar U, Das S, Tandon M, Ramachandran VG, Saha R. Vaccines for fungal infections. *The National medical journal of India.* 2015; 28(1): 14–19.
90. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009; 113: 1399–1407.
91. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: 1346–1355.
92. Andrys C, Kacerovsky M, Drahosova M, Musilova I, Pliskova L, Hornychova H, et al. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2013; 26: 520–527.

93. Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, Oliver EA, Mbele A, Jing S, et al. Soluble TLR2 Is Present in Human Amniotic Fluid and Modulates the Intraamniotic Inflammatory Response to Infection. *Journal of Immunology*. 2009; 182: 7244–7253.
94. Robert I. Lehrer Wuyuan Lu.  $\alpha$ -Defensins in human innate immunity. *Immunological Reviews* 2012; 245: 84–112.
95. Szyk A, Wu Z, Tucker K, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Crystal structures of human  $\alpha$ -defensins HNP4, HD5, and HD6. *Protein Science*. 2006; 15(12); 2749–2760.
96. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med*. 2005; 83: 587–595.
97. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*. 1985; 76(4): 1427–1435.
98. Buhimschi IA, Zambrano E, Pettker CM, Bahtiyar MO, Paidas M, Rosenberg, V, et al. Using proteomic analysis of the human amniotic fluid to identify histological chorioamnionitis. *Obstet Gynecol*. 2008; 111: 403–412.
99. Buhimschi CS, Dulay AT, Abdel-Razeq S, Zhao G, Lee S, Hodgson EJ, et al. Fetal inflammatory response in women with proteomic biomarkers characteristic of intra-amniotic inflammation and preterm birth. *BJOG*. 2009; 116: 257–267.
100. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2003; 13: 22–21.
101. Lucovnik M, Kornhauser-Cerar L, Premru-Srsen T, Gmeiner-Stopar T, Dergan M. Neutrophil defensins but not interleukin-6 in vaginal fluid after preterm premature rupture of membranes predict fetal/neonatal inflammation and infant neurological impairment. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2011; 90: 908–991.
102. Desmedt S, Desmedt V, Delanghe J, Speeckaert R, Speeckaert M. The intriguing role of soluble urokinase receptor in inflammatory diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017; 54(2): 117–133.
103. Rademakersa SE, Spanb PN, Kaandersa JHAM, Sweepb FCGJ, van der Kogela AJ, Bussinka J. Molecular aspects of tumour hypoxi. *Molecular Oncology*. 2008; 2: 41–53.
104. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol*. 2004; 25(8): 450–455.

105. Cekmez Y, Cekmez F, Ozkaya E, Pirgon O, Yılmaz Z, Yılmaz EA, et al. uPAR, IL-33, and ST2 Values as a Predictor of Subclinical Chorioamnionitis in Preterm Premature Rupture of Membranes. *Journal Of Interferon & Cytokine Research*. 2013; 33(12): 778–782.
106. Roos C, Schuit E, Scheepers HCJ, Bloemenkamp KWM, Bolte AC. Predictive Factors for Delivery within 7 Days after Successful 48-Hour Treatment of Threatened Preterm Labor. *AJP Rep*. 2015; 5(2): e141-149.
107. Prelabor Rupture of Membranes: ACOG Practice Bulletin, Number 217. *Obstet Gynecol*. 2020; 135: e80.
108. Kenyon S, Boulvain M, Neilson JP. Antibiotics for preterm rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev* 2013: CD001058.
109. Lee J, Romero R, Kim SM, Chaemsaihong P, Yoon BH. A new antibiotic regimen treats and prevents intra-amniotic inflammation/infection in patients with preterm PROM. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29(17): 2727–2737.
110. Pierson RC, Gordon SS, Haas DM. A retrospective comparison of antibiotic regimens for preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 2014; 124(3): 515–519.
111. Wolf MF, Miron D, Peleg D, Rechnitzer H, Portnov I, Salim R, et al. Am J Perinatol. Reconsidering the Current Preterm Premature Rupture of Membranes Antibiotic Prophylactic Protocol. 2015; 32(13): 1247–1250.
112. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 164(3): 859–862.
113. Bond DM, Middleton P, Levett KM, van der Ham DP, Crowther CA, Buchanan SL, Morris J. Planned early birth versus expectant management for women with preterm prelabour rupture of membranes prior to 37 weeks' gestation for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 3(3): CD004735.
114. Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59(RR-10): 1–36.
115. Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, Leindecker S, Varner MW, Caritis SN, et al. The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 211-216.
116. Mark SP, Croughan-Minihane MS, Kilpatrick SJ. Chorioamnionitis and uterine function. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 909-12.

117. Satin AJ, Maberry MC, Leveno KJ, Sherman ML, Kline DM. Chorioamnionitis: a harbinger of dystocia. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 913-915.
118. Newton ER, Schroeder BC, Knape KG, Bennett BL. Epidural analgesia and uterine function. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 749-755.
119. Al-Ostad G, Kezouh A, Spence AR, Abenhaim HA. Incidence and risk factors of sepsis mortality in labor, delivery and after birth: population-based study in the USA. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; 41: 1201-1206.
120. Kacerovsky M, Romero R, Stepan M, Stranik J, Maly J, Pliskova L, et al. Antibiotic administration reduces the rate of intraamniotic inflammation in preterm prelabor rupture of the membranes. *J Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223(1): 114.e1-114.e20.
121. Edwards SE, Grobman WA, Lappen JR, Winter C, Fox R, Lenguerrand E, Draycott TL. Modified obstetric early warning scoring systems (MOEWS): validating the diagnostic performance for severe sepsis in women with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 212(4): 536.e1-8.
122. Venkatesh KK, Jackson W, Hughes BL, Laughon MM, Thorp JM, Stamilio DM. Association of chorioamnionitis and its duration with neonatal morbidity and mortality. *J Perinatol* 2019; 39(5): 673-682.
123. Yoder PR, Gibbs RS, Blanco JD, Castaneda YS, St Clair PJ. A prospective, controlled study of maternal and perinatal outcome after intra-amniotic infection at term. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145(6): 695-701.
124. Alexander JM, McIntire DM, Leveno KJ. Chorioamnionitis and the prognosis for term infants. *Obstet Gynecol* 1999; 94(2): 274-278.
125. Morales WJ, Washington SR, Lazar AJ. The effect of chorioamnionitis on perinatal outcome in preterm gestation. *J Perinatol* 1987; 7(2): 105-110.
126. Lau J, Magee F, Qiu Z, Hoube J, von Dadelszen P, Lee SK. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(3 Pt 1): 708-713.
127. Aziz N, Cheng YW, Caughey AB. Neonatal outcomes in the setting of preterm premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22(9): 780-784.
128. Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 192(4): 1162-1166.
129. Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL. Chorioamnionitis and cerebral palsy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010; 116(2PT1): 387-392.

130. Pappas A, Kendrick DE, Shankaran S, Stoll BJ, Bell EF, Laptook AR, et al. Chorioamnionitis and early childhood outcomes among extremely low-gestational-age neonates. *JAMA Pediatr* 2014; 168(2): 137-147.
131. Leviton A, Allred EN, Kuban KC, Hecht JL, Onderdonk AB, O'shea TM, Paneth N. Microbiologic and histologic characteristics of the extremely preterm infant's placenta predict white matter damage and later cerebral palsy. the ELGAN study. *Pediatr Res* 2010; 67(1): 95-101.
132. Xiao D, Zhu T, Qu Y, Gou X, Huang Q, Li X, Mu D. Maternal chorioamnionitis and neurodevelopmental outcomes in preterm and very preterm neonates: A meta-analysis. *PLoS One* 2018; 13(12): e0208302.
133. Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, et al. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res* 1999; 46(5): 566-575.
134. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177(1): 19-26.
135. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, de Prez S, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001; 56(10): 1278-1284.
136. Debillon T, Gras-Leguen C, Verielle V, Winer N, Caillon J, Roze JC, Gressens P, et al. Intrauterine infection induces programmed cell death in rabbit periventricular white matter. *Pediatr Res* 2000; 47(6): 736-742.
137. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res.* 1997; 42(1): 1-8.
138. Lu HY, Zhang Q, Wang QX, Lu JY. Contribution of Histologic Chorioamnionitis and Fetal Inflammatory Response Syndrome to Increased Risk of Brain Injury in Infants With Preterm Premature Rupture of Membranes. *Pediatr Neurol.* 2016; 61: 94-98.e1.
139. Ward RM, Beachy JC. Neonatal complications following preterm birth. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2003; 110 (20): 8–16.
140. Priešlaikinis neišnešioti vaisiaus dangalų plyšimas. Paskelbta LR SAM puslapyje, Akušerijos diagnostikos ir gydymo metodikos, 2019 m. redakcija. Prieiga internete: [https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/Akus%CC%8Cerine%CC%87%20metodika\\_Pries%CC%8Claikinis%20neis%CC%8Cnes%CC%8Ccioto%20vaisiaus%20dangalu%CC%A8%20plys%CC%8Cimas\\_SAM\\_2019-07-20.pdf](https://sam.lrv.lt/uploads/sam/documents/files/Akus%CC%8Cerine%CC%87%20metodika_Pries%CC%8Claikinis%20neis%CC%8Cnes%CC%8Ccioto%20vaisiaus%20dangalu%CC%A8%20plys%CC%8Cimas_SAM_2019-07-20.pdf).

141. VUL SK gydymo protokolas „Priešlaikinis neišnešioti vaisiaus dangalų plyšimas“, GP38 – 2017.
142. VUL SK gydymo protokolas „Priešlaikinis gimdymas“, GP50 – 2021.
143. Orgul G, Agbal T, Celen S, Caglar AT. Neuroprotective magnesium sulfate administration increases maternal Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio and Systemic Immune-Inflammation Index. *Arch Gynecol Obstet.* 2021; 303(6): 1433-1437.
144. Pagni L, Pietrasanta C, Acaia B, Merlo D, Ronchi A, Ossola MW, et al. Chorioamnionitis and neonatal outcome in preterm infants: A clinical overview. *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29: 1525–1529.
145. Romero R, Chaemsaihong P, Docheva N, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Yoon BH, et al. Clinical chorioamnionitis at term VI: Acute chorioamnionitis and funisitis according to the presence or absence of microorganisms and inflammation in the amniotic cavity. *J. Perinat Med.* 2016; 44: 33–51.
146. Kayem G, Batteux F, Girard N, Schmitz T, Willaime M, Maillard F, et al. Predictive value of vaginal IL-6 and TNF $\alpha$  bedside tests repeated until delivery for the prediction of maternal-fetal infection in cases of premature rupture of membranes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2017; 211: 8–14.
147. Holmstrom E, Myntti T, Sors E, Kruit H, Juhila J, Paavonen J, et al. Cervical and Amniotic FluidMatrix Metalloproteinase-8 and Interleukin-6 Concentrations in Preterm Pregnancies with or without Preterm Premature Ruptureof Membranes. *Fetal Diagn. Ther.* 2019; 46: 103–110.
148. Kunze M, Klar M, Morfeld CA, Thorns B, Schild RL, Markfeld-Erol F, et al. Cytokines in noninvasively obtained amniotic fluid as predictors of fetal inflammatory response syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016; 215: 96.e1–96.
149. Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, Drahosova M, Hornychova H, Rezac A, Andrys C. Cervical and vaginal fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28(10): 1116–1122.
150. Kacerovsky M, Andrys C, Hornychova H, Pliskova L, Lancz K, Musilova I, et al. Amniotic fluid soluble Toll-like recep-tor 4 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2012; 25 (7): 1148–1155.
151. Liu Y, Liu Y, Du C, Zhang R, Feng Z, Zhang J. Diagnostic value of amniotic fluid inflammatory biomarkers for 3 subclinical chorioamnionitis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2016; 134(2): 160–164.
152. Kacerovsky M, Musilova I, Stepan M, Andrys C, Drahosova M, Jacobsson B. Detection of intraamniotic inflammation in fresh and processed amniotic fluid

samples with the interleukin-6 point of care test. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2015; 213: 435–436.

153. Pagni L, Pietrasanta C, Acaia B, Merlo D, Ronchi A, Ossola MW, et al. Chorioamnionitis and neonatal outcome in preterm infants: A clinical overview. *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29: 1525–1529.
154. Romero R, Chaemsaithong P, Docheva N, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Yoon BH, et al. Clinical chorioamnionitis at term VI: Acute chorioamnionitis and funisitis according to the presence or absence of microorganisms and inflammation in the amniotic cavity. *J. Perinat Med.* 2016; 44: 33–51.
155. Ocheke N, Ocheke IE, Agaba PA, Imadde GE, Silas OA, Ajetunmobi OI, et al. Maternal and Neonatal Outcomes of Histological Chorioamnionitis. *J. West. Afr. Coll Surg.* 2016; 6: 1–14.

## 10. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

### 10.1. Straipsniai disertacijos tema

1. Balciuniene G, Kvederaite-Budre G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Neutrophil-lymphocyte ratio for the prediction of chorioamnionitis in cases of preterm premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2021;21:656.

2. Balciuniene G, Kvederaite-Budre G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. A Value of Soluble Toll-Like Receptor 2 and 4 in Vaginally Obtained Amniotic Fluid for the Prediction of Chorioamnionitis. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 2021.

3. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Bartkeviciene D, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Prognostic Markers for Chorioamnionitis: IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-8 in Vaginally Obtained Amniotic Fluid. *Amniotic Fluid. J. Clin. Med.* 2021;10:1136.

4. Balčiūnienė G, Kvederaitė-Budrė G, Gulbiniėnė V, Pilypienė I, Drasutienė GS, Ramašauskaitė D. Antenatalinė chorioamnionito diagnostika. *Lietuvos Akušerija ir ginekologija*. 2021;3:190-194.

5. Balciuniene G, Jakubauskiene L, Drasutiene GS, Meskauskiene A, Ramasauskaite D. The significance of amniotic fluid immunological analysis for the prediction of intrauterine infection. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2020;47:810-813.

### 10.2. Straipsniai ne disertacijos tema

1. Balciuniene G, Balciunas L, Jakubauskiene L, Ramasauskaite D, Serpytis M, Gumbiene L, Dementaviciene J. Massive postpartum pulmonary embolism successfully treated with v-a-v ECMO: a case report. *J Obstet Gynaecol.* 2020;17:1-3.

2. Gričius R, Balciuniene G, Jakubauskiene L, Ramasauskaite D. The Significance of Endometrial Scratching for Clinical Pregnancy Rate in Long Agonist and Antagonist Protocols. *Medicina*. 2019;55:527.

3. Vasilevska D, Balciuniene G, Andreicik J, Semczuk A, Silkunas M, Rudaitis V. Hysterectomies for Benign Pathology: Seven-Year Experience of a Single Tertiary Care Institution. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2018;6:901-904.



4. Kvederaitė-Budrė G, Balčiūnienė G, Gaupšienė A, Meškauskienė A, Ramašauskaitė D. Naujagimio gimimo svorio reikšmė žindymo sėkmei. Lietuvos akušerija ir ginekologija. 2021;24:17-21.

5. Gulbinienė V, Pilypienė I, Navarackaitė I, Dauengauer-Kirlienė S, Balčiūnienė G, Ramašauskaitė D. Bevandenio laikotarpio trukmės įtaka neišnešiotų naujagimių, gimusių 24–32 gestacijos savaitę, baigtims. Lietuvos akušerija ir ginekologija. 2020;23:26-32.

6. Butkevičiūtė A, Ramašauskaitė D, Matuolytė A, Balčiūnienė G. Sužadinto gimdymo užbaigimo skubia cezario pjūvio operacija prognozės vertinimas. Lietuvos akušerija ir ginekologija. 2020;23:104-110.

### 10.3. Pranešimai disertacijos tema

1. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Predictive Value of SuPar on Chorioamnionitis Sydney. World Congress 2021. 2021 m. spalio 25–28 d. Sidnėjus, Australija.

2. Gulbiniene V, Balciuniene G, Petroniene J, Viliene R, Dumalakiene I, Pilypiene I, Ramasauskaite D. The Significance of TNF- $\alpha$ , MMP-8 Concentrations in Non-invasively Obtained Amniotic Fluid Predicting Fetal Inflammatory Response Syndrome. World Congress 2021. 2021 m. spalio 25–28 d. Sidnėjus, Australija.

3. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Neutrophil-Lymphocyte Ratio for the Prediction of Chorioamnionitis. 27<sup>th</sup> EBCOG Conference. 2021 m. rugsėjo 2–4 d. Atėnai, Graikija.

4. Gulbiniene V, Balciuniene G, Petroniene J, Viliene R, Dumalakiene I, Pilypiene I, Ramasauskaite D. The Significance of Epidermal Growth Factor Concentrations in Non-Invasively Obtained Amniotic Fluid Predicting Respiratory Outcomes of Preterm Neonates. 27<sup>th</sup> EBCOG Conference. 2021 m. rugsėjo 2–4 d. Atėnai, Graikija.

5. Balciuniene G, Drasutiene GS, Girkontaite I, Zinkeviciene A, Dumalakiene I, Ramasauskaite D. Significance of Immunological Markers in Vaginally Obtained Amniotic Fluid in Predicting Intrauterine Inflammation. 11<sup>th</sup> World Conference on Gynecology, Obstetrics and Women's Health. 2020 m. birželio 22–23 d. Praha, Čekija.

6. Balciuniene G, Ramasauskaite D, Drasutiene GS, Pilypiene I, Gulbiniene V, Bartkeviciene D, Dumalakiene I. Significance of TNF- $\alpha$  and RANTES Concentration in Vaginally Obtained Amniotic Fluid In Predicting

Fetal Inflammatory Response Syndrome. ECIC Congress. 2019 m. kovo 14–16 d. Turinas, Italija.

7. Gulbiniene V, Pilypiene I, Petroniene J, Balciuniene G, Ramasauskaite D, Dumalakiene I. The Association between TNF- $\alpha$  in Non-invasively Obtained Amniotic Fluid and Major Outcomes in Preterm Infants. 4<sup>th</sup> Baltic Paediatric Congress. 2019 m. gegužės 16–18 d. Vilnius, Lietuva.

8. Balciuniene G, Drasutiene GS, Pilypiene I, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Bartkevicienne D, Ramasauskaite D. The Prognostic Values of Vaginally Obtained Amniotic Fluid IL-6 and TNF- $\alpha$  for Fetal Inflammatory Response Syndrome. BIRTH congress “Clinical Challenges in Labor and Delivery“. 2018 m. lapkričio 15–17 d. Venecija, Italija.

#### 10.4. Pranešimai ne disertacijos tema

1. Balciuniene G, Tutukova V, Ramasauskaite D, Drasutiene GS. Quantative Ultrasound Analysis of Fetal Lung Maturity to Predict Neonatal Respiratory Morbidity. Evolutionary Medicine: Health and Diseases in Changing Environment. 2018 m. birželio 5–10 d. Vilnius, Lietuva.

2. Balciuniene G, Balciunas L, Morozovaite L, Ramasauskaite D, Serpytis M, Gumbiene L. Massive Postpartum Pulmonary Embolism Successfully Treated with v-a ECMO: A Case Report. European Clinical Case Reports Congress. 2018 m. balandžio 21–22 d. Viena, Austrija.

#### 10.5. Kiti leidiniai

1. Balčiūnienė G, Mickevičiūtė D, Praninskienė R, Vingras A, Žilinskaitė V (2020). Nėštumas. Gimdymas. Pirmieji gyvenimo metai. Kaunas: Vitae litera.

# 11. PRIEDAI

## 1 priedas



### VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Vietoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.  
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.  
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705,  
el. p. mf@mf.vu.lt

### VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtck@mf.vu.lt

## LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ

2017-07-04 Nr.158200-17-931-434

Tyrimo pavadinimas:

**Biocheminių ir imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse reikšmė,  
prognozuojant intrauterinę infekciją**

Protokolo Nr.:	VVT
Versija:	02
Data:	2017-06-29
Informuoto asmens sutikimo forma: versija data	nėščiajai 2 2017-06-29
Informuoto asmens sutikimo forma: versija data	naujagimio tėvams/globėjams 2 2017-06-29
Pagrindinis tyrėjas:	<b>Diana Ramašauskaitė</b>
Įstaigos pavadinimas: Adresas:	VUL Santaros klinikos Santariškių g. 2, Vilnius
Leidimas galioja iki:	<b>2021-09</b>

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2017/07), vykusio 2017 m. liepos 4 d. sprendimu.

Pirmininkas



Saulius Vosylius



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS  
sui generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

**Biomedicininio tyrimo** „Biocheminių ir imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse reikšmė, prognozuojant intrauterinę infekciją“ 2019-09-19 Nr. 2019-LP-40  
**pagrindinei tyrėjai Dianai Ramašauskaitei**

Dėl leidimo Nr. 158200-17-931-434 papildymo Nr. 1

**PRITARIMAS**

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas išnagrinėjo Jūsų prašymą keisti/papildyti biomedicininio tyrimo „*Biocheminių ir imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse reikšmė, prognozuojant intrauterinę infekciją*“, leidimą Nr. 158200-17-931-434, išduotą 2017-07-04 d. Ekspertai pritaria:

- Tyrimo pratęsimui iki 2022-09-01 d.;
- Atnaujintam protokolui (versijos Nr. 03, data 2019-08-06 d.);
- Atnaujintų informuoto asmens sutikimo formų teikimui (dėl naujagimio įtraukimo – versijos Nr. 3, data 2019-08-13 d. ir dėl nėščiosios dalyvavimo - versijos Nr. 3, data 2019-08-13 d).

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius



VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikoms

(per E. pristatymo informacinę sistemą  
ir el.p. [diana.ramasauskaite@santa.lt](mailto:diana.ramasauskaite@santa.lt))

SPRENDIMAS  
DĖL LEIDIMO VŠĮ VILNIAUS UNIVERSITETO LIGONINĖS SANTAROS  
KLINIKOMS ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO VEIKSMUS

2018 m. kovo 9 d. Nr. 2R-~~APL~~26-1.)  
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, išnagrinėjusi VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų 2018-03-06 raštu Nr. SR-1172 pateiktą Pranešimą dėl išankstinės patikros Nr. SR-1172 (toliau – Pranešimas) (Inspekcijoje gauta 2018-03-07, reg. Nr. 1R-1774),

**n u s t a t ė,**

kad Pranešime nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus bei numatytos tinkamos organizacinės ir techninės duomenų saugumo priemonės.

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Išankstinės patikros atlikimo taisyklių, patvirtintų Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2016 m. birželio 22 d. įsakymu Nr. 1T-23(1.12.E), 12 ir 19.2 punktais,

**n u s p r e n d ž i a**

VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikoms išduoti leidimą atlikti Pranešime nurodytų asmens duomenų apie *sveikatą* tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „Biocheminių ir imunologinių žymenų vaisiaus vandenyse reikšmė, prognozuojant intrauterinę infekciją“, prot. Nr. VVT, tikslu veiksmus.

Šis sprendimas Administracinių bylų teisenos įstatymo nustatyta tvarka per vieną mėnesį nuo jo įteikimo dienos gali būti skundžiamas Vilniaus apygardos administraciniam teismui.

Direktorius



Raimondas Andrijauskas



V. Perednienė, tel. (8 5) 2197279, el. p. [vanda.peredniene@ada.lt](mailto:vanda.peredniene@ada.lt)

Biudžetinė įstaiga  
A. Juozapavičiaus g. 6,  
09310 Vilnius

Tel. (8 5) 279 1445  
Faks. (8 5) 261 9494  
El. p. [ada@ada.lt](mailto:ada@ada.lt)

Duomenys kaupiami ir saugomi  
Juridinių asmenų registre  
Kodas 188607912

## 11. FINANSINĖ PARAMA

Mokslinį tyrimą rėmė Lietuvos mokslo taryba kaip mokslinių grupių projektą (Nr. S-MIP-19-57) ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

Už akademinį pasiekimą 2021 m. doktorantei Gretai Balčiūnienei skirta Lietuvos mokslo tarybos stipendija (registracijos Nr. P-DAP-21-145 , įsakymo Nr. V-472).

## SUMMARY

### LIST OF ACRONYMS

AUC	—	Area under the curve
CRP	—	C-reactive protein
ELISA	—	Immunoenzymatic test
IL	—	Interleukin
IQR	—	Interquartile range
Md	—	Median
MMP	—	Matrix metalloproteinases
NLR	—	Neutrophil-to-lymphocyte ratio
NPV	—	Negative predictive value
OR	—	Odds ratio
CI	—	Confidence interval
PMN	—	Polymorphonuclear leukocytes
PPROM	—	Preterm premature rupture of the membranes
ROC	—	Receiver operating characteristic
SD	—	Standard deviation
sTLR	—	Soluble Toll-like receptor
suPAR	—	Soluble urokinase plasminogen activator receptor
TNF	—	Tumour necrosis factor
PPV	—	Positive predictive value
VUH SK	—	Vilnius university hospital santaros klinikos

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Relevance of the study

Preterm birth is any birth in the 22<sup>+0</sup> to 36<sup>+6</sup> week of pregnancy. Chorioamnionitis is one of the most common causes of spontaneous preterm birth, accounting for 40–70% of all preterm births. Chorioamnionitis is an acute inflammation of the foetal membranes and placenta. This infection is dangerous for women because it increases the risk of uterine atony and postpartum haemorrhage, endometritis, peritonitis and sepsis. This infection is dangerous to the neonate, because of the increased risk of foetal inflammatory response syndrome, pneumonia, meningitis, sepsis and death. Long-term complications of chorioamnionitis in an infant can include mental retardation, necrotising enterocolitis and cerebral palsy. Because of the potential complications of chorioamnionitis for both the foetus and the mother, it is recommended not to continue the pregnancy after a diagnosis of this infection.

Currently, chorioamnionitis can be diagnosed on the basis of clinical, histological, microbiological or biochemical criteria. The clinical diagnostic criteria for chorioamnionitis have a low sensitivity, while microbiological tests are performed for several days and a histological examination is possible only after delivery. Due to these shortcomings, there is still no universally accepted single method for diagnosing chorioamnionitis. Each year, more studies are being carried out to validate a test method that is suitable for the early diagnosis of chorioamnionitis, is quick and easy to perform, and that has a high specificity and sensitivity.

## 1.2. Novelty and practical relevance

In order to diagnose chorioamnionitis during pregnancy quickly and accurately, more attention is now being paid to the development of clinical criteria for the diagnosis of chorioamnionitis and to the biochemical profile of the amniotic fluid.

So far, an assessment of the leukocyte count and C-reactive protein (CRP) in the maternal blood has been widely used in the diagnosis of the clinical chorioamnionitis, but leukocytosis is considered to be a low-sensitive marker for the prediction of chorioamnionitis. The scientific literature contains data on the advantages of the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in the diagnosis of various infections, but there are only a few studies analysing the role of this ratio in the diagnosis of chorioamnionitis. Therefore, in this study,



we evaluated the role of the NLR in the diagnosis of chorioamnionitis and compared its diagnostic values with those of the leukocyte count and CRP.

Inflammatory markers in the amniotic fluid were detected by an enzyme immunoassay. The amniotic fluid for this test can be collected by the invasive method of amniocentesis or the non-invasive method of vaginal collection. Amniocentesis is an invasive procedure that can cause complications such as damage to the foetus, umbilical cord, placenta, placental abruption and foetal death. It has been proved that the risk of complications during amniocentesis is low (up to 1%); however, the procedure is more complex and the risk of complications is higher in the case of premature leakage of the amniotic fluid due to a low residual amniotic fluid volume.

In our study, we aimed to diagnose chorioamnionitis biochemically by detecting changes in the inflammatory markers in the amniotic fluid. The amniotic fluid was collected non-invasively, by collecting it from the vaginal pool. This procedure is easy to perform and requires no special skills. Collecting amniotic fluid from the vaginal pool is also a non-invasive procedure; therefore, it does not carry additional risks.

The high diagnostic value of IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8, sTLR-2, sTLR-4 and  $\alpha$ -defensins in the amniocentesis amniotic fluid has been demonstrated in the diagnosis of chorioamnionitis. Fewer data is available on the significance of these inflammatory markers in non-invasively collected amniotic fluid. suPAR in the blood has a high diagnostic value in the diagnosis of various infections, but no data has been published on the detection of suPAR in the amniotic fluid and its relevance for the diagnosis of chorioamnionitis. In our study, we evaluated the concentrations of all these inflammatory markers in non-invasively collected amniotic fluid and their relevance for the diagnosis of chorioamnionitis in the preterm premature rupture of the membranes of prematurity (PPROM) up to 34 weeks.

### 1.3. Aim of the dissertation

The aim of this dissertation is to evaluate the role of inflammatory markers in maternal blood and non-invasively collected amniotic fluid, for the antenatal diagnosis of chorioamnionitis.

### 1.4. Objectives

1. To evaluate the accuracy of inflammatory markers in the maternal blood (leucocytes, neutrophils, lymphocytes, neutrophil-to-lymphocyte ratio and C-

reactive protein) for the antenatal diagnosis of chorioamnionitis in the setting of a preterm premature rupture of the membranes.

2. To evaluate the accuracy of non-invasively collected inflammatory markers in the amniotic fluid (*IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-8*, *s-TLR-2*, *s-TLR-4*,  *$\alpha$ -defensins*, *suPAR*) for the antenatal diagnosis of chorioamnionitis.

3. To determine the optimal values of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid for the diagnosis of chorioamnionitis.

4. To compare the accuracy of inflammatory markers in the maternal blood and non-invasively collected amniotic fluid in the diagnosis of chorioamnionitis.

### 1.5. Statements of the dissertation to be defended

1. Currently, the total leucocyte count, which is used to diagnose clinical chorioamnionitis, is not a marker of sufficient prognostic value in the diagnosis of chorioamnionitis.

2. The C-reactive protein concentration and neutrophil-to-lymphocyte ratio have better prognostic values for chorioamnionitis than the maternal blood leukocyte count.

3. The levels of inflammatory markers (*IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MMP-8*, *s-TLR-2*, *s-TLR-4*,  *$\alpha$ -defensins*, *suPAR*) in non-invasively collected amniotic fluid are reliably different in women with and without histological chorioamnionitis, and may therefore improve the diagnosis of chorioamnionitis.

4. Biochemical testing of non-invasively collected amniotic fluid combined with changes in inflammatory markers in the maternal blood can improve the antenatal diagnosis of chorioamnionitis.

## 2. MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the Centre of Obstetrics and Gynaecology, VUH SK, in 2017-2021, and immunological markers in the amniotic fluid were tested at the State Research Institute Centre for Innovative Medicine.

The study was authorised by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee No. 158200-17-931-434 of 4 July 2017 and its supplement No. 2019-LP-40 of 19 September 2019, and by the State Data Protection Inspectorate (SDPI) on 9 March 2018, under the Data Processing Authorisation No. 2R-1765 (2.6-1). The research was supported by the Lithuanian Research Council as a research group project (No. S-MIP-19-57) and the Vilnius University Faculty of Medicine.

Pregnant women admitted to the Obstetrics and Gynaecology Centre of the VUH SK for preterm premature rupture of the membranes at < 34 weeks gestation were included in the study. All the participants were informed about the aims of the study, the process, possible inconveniences and the use of the study findings, their confidence was secured and they signed an informed consent form. Both parents signed the informed consent form for the participation of the newborn. The women could discontinue their or their newborn's participation in the study at any time.

Inclusion criteria:

- Female aged  $\geq 18$  years
- Singleton pregnancy
- Gestational age of  $22^{+0}$  to  $34^{+6}$  weeks
- Diagnosed with PPRM
- Signed the informed consent form

Exclusion criteria:

- Multiple pregnancy
- Placenta previa
- Vaginal bleeding
- Diagnosed foetal malformations
- Unstable foetal lie
- Refusal to participate in the study

After their enrolment in the study, the personal health and pregnancy history data of the women were collected: age, number of previous pregnancies and births, chronic illnesses, date of last menstrual cycle and regularity, tests carried out during the pregnancy and diagnosed diseases. The postnatal database was expanded to include the obstetric history: mode of delivery, birthweight, Apgar score and umbilical cord arterial blood pH results.

The timing of the pregnancy was based on the first day of the last menstrual period, if the menstrual cycle was regular. If the menstrual cycle was irregular or the difference was  $> 5$  days at week  $11^{+0}$  to  $13^{+6}$  after the ultrasound scan, the timing of the pregnancy was based on the ultrasound scan.

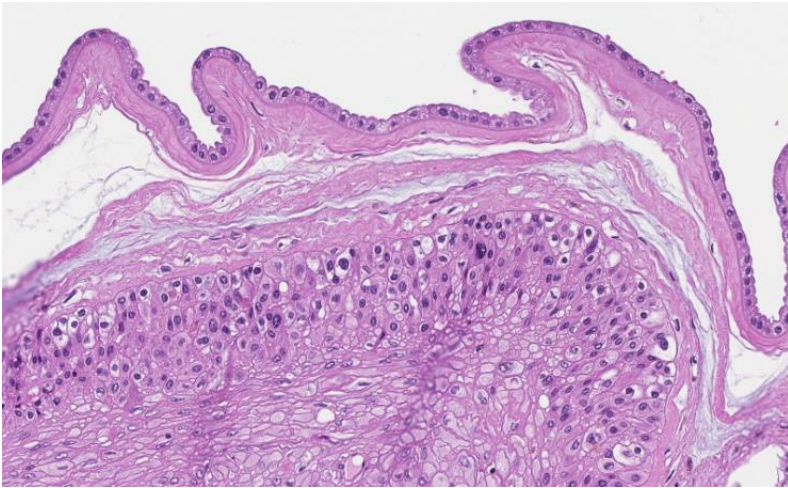
A preterm premature rupture of the membranes was diagnosed if amniotic fluid leaking was observed during a vaginal examination. In the case of an uncertain diagnosis, a test for placental  $\alpha$  microglobulin-1 (Amnisure®, Germantown, USA) in the vaginal secretions was performed: a positive test confirmed PPRM.

In accordance with the Obstetric Methodology approved by the Lithuanian Society of Obstetricians and Gynaecologists and published on the website of the Ministry of Health of the Republic of Lithuania, as well as with the procedures and protocols of examination and treatment approved by the VUH SK, antibiotic prophylaxis and foetal lung maturation were administered to all pregnant women diagnosed with PPROM up to 34 weeks. For antibiotic prophylaxis, 2 g of intravenous ampicillin was administered every 6 hours for 2 days; after 2 days, oral amoxicillin 500 mg was administered every 8 hours for 5 days. This was accompanied by oral erythromycin 250 mg every 6 hours for a total of 7 days, or azithromycin 1 g on the day of arrival and 0.5 g on the fifth day of the follow-up. For foetal lung maturation, 12 mg dexamethasone intramuscular injection was administered every 12 hours for 2 times.

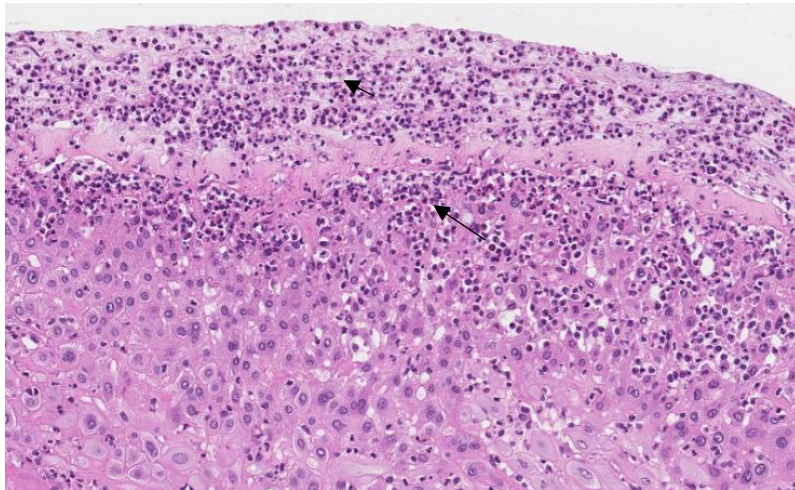
Clinical chorioamnionitis was diagnosed in the presence of a fever  $\geq 38$  °C and at least 2 of the following symptoms:

- Tachycardia in the woman ( $> 100$  beats/min.)
- Tachycardia in the foetus ( $> 160$  beats/min.)
- Foul-smelling purulent vaginal discharge or amniotic fluid
- Uterine tenderness (soreness)
- Leukocytosis ( $> 15 \times 10^9/l$ )
- CRP  $> 40$ mg/l

In accordance with the current VUH SK examination and the treatment guidelines for preterm birth, the placentas of all the pregnant women were sent for a histological examination after delivery. Pathohistological analysis were performed by one specialist at the National Center of Pathology. Inflammatory lesions of the placenta and foetal membranes were assessed according to the diagnostic criteria of the Amsterdam Placenta Working Group and the Perinatal Section of the Paediatric Pathology Society. After PMN infiltration to the chorion and amnion were detected, histological chorioamnionitis was diagnosed (Figure 1). Based on the findings of the histological analysis, all the participants were divided into 2 groups: women diagnosed with histological chorioamnionitis (Group I); and a control group, i.e. women not diagnosed with histological chorioamnionitis (Group II).



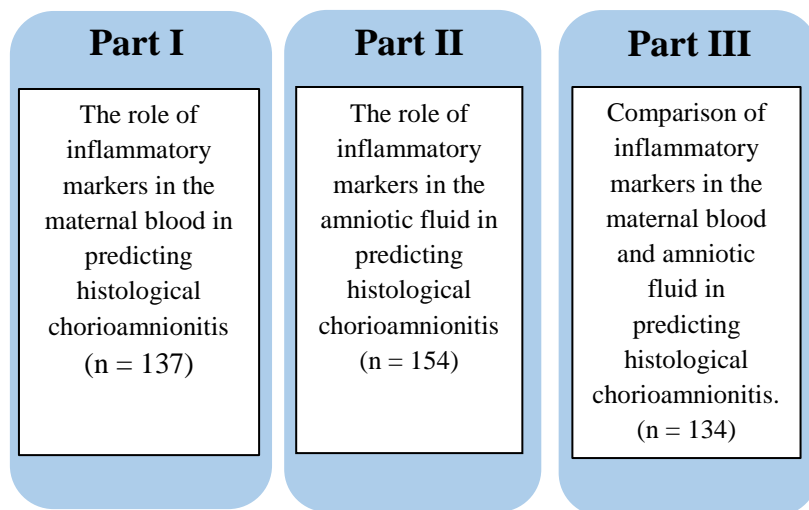
A



B

**Figure 1** A - Histological structure of a normal placenta and foetal membranes. B - Structure of the placenta and foetal membranes in histological chorioamnionitis (photos from the National Centre of Pathology, VUH SK branch). Arrows indicate polymorphonuclear inflammatory infiltration in the placental and fetal membranes.

The study was divided into three parts (Figure 2):



**Figure 2** Parts of the biomedical study

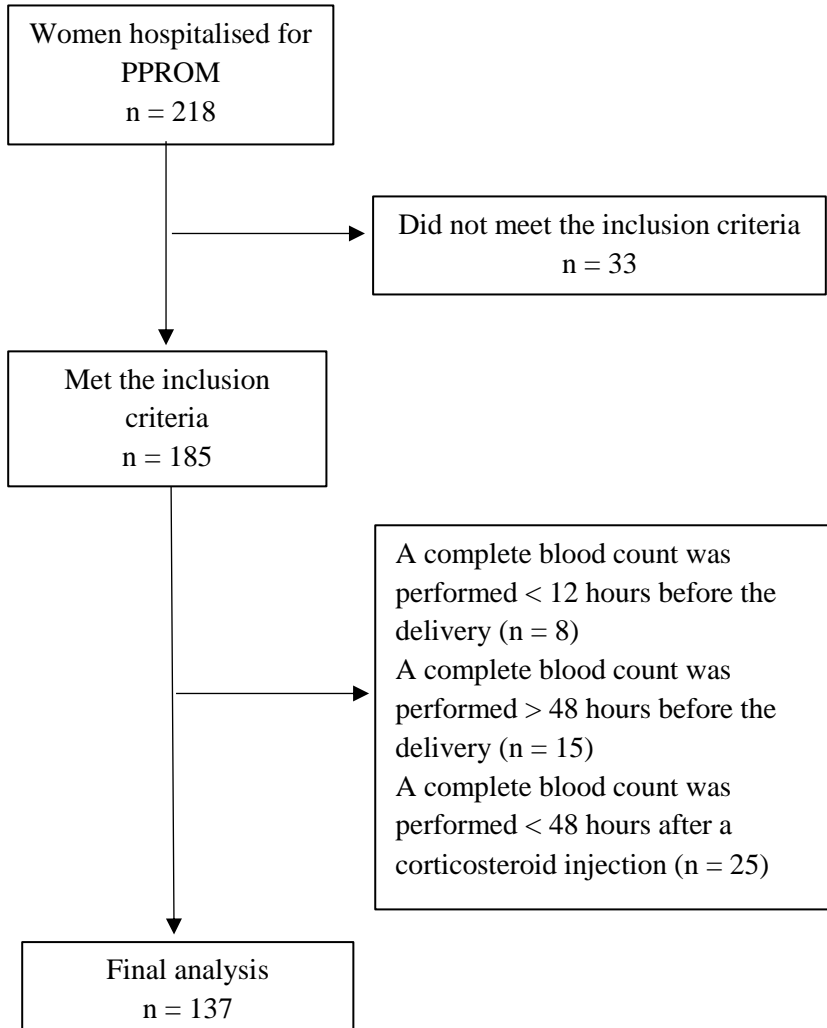
Abbreviations: n – sample size.

### 3.1. Part I. The role of inflammatory markers in the maternal blood in predicting histological chorioamnionitis

In the first part, we aimed to assess the role of inflammatory markers in the maternal blood in predicting histological chorioamnionitis. To assess the role of the maternal blood results in the prognosis of histological chorioamnionitis, only blood tests performed within 12-48 hours before delivery were selected. The pre-delivery period of more than 12 hours was chosen to reduce the probability of error because of an inflammatory response to the delivery process itself. A less than 48 h antepartum period was chosen to reduce the probability of error due to a long rupture to delivery interval between the blood test and the delivery: the risk of chorioamnionitis increases with a longer rupture to delivery interval, and the results of a blood test collected more than 48 hours antepartum may not reflect the inflammatory process.

The maternal blood results also took the administration of corticosteroids into account. As mentioned above, all pregnancies with PPRM up to 34 weeks were administered dexamethasone for foetal lung maturation. The use of corticosteroids causes leukocytosis with a leftward deviation of the formula and relative lymphopenia lasting 24-48 hours. For this reason, it was chosen to evaluate only the blood tests performed more than 48 hours after the

administration of corticosteroids. Therefore, 137 women and their newborns were included in the final analysis to assess the role of maternal blood results in the prediction of histological chorioamnionitis (Figure 3).

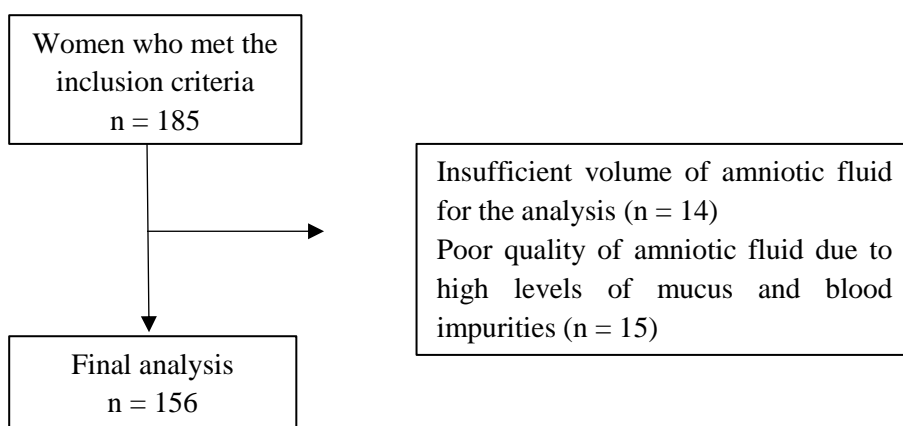


**Figure 3** Subject selection scheme for the analysis of the maternal blood parameters.

Abbreviations: PPRM – preterm premature rupture of the membranes, n – sample size.

### 3.2. Part II: The role of inflammatory markers in the amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis

In the second part of the study, we aimed to assess the role of inflammatory markers in the amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis. Amniotic fluid was collected with sterile vaginal speculums during a non-invasive vaginal examination. The amniotic fluid samples were collected every second day, and were centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes, then fractionated and frozen at a -80 °C temperature. Amniotic fluid samples the volume of which was insufficient for an analysis of the immunological markers, or with high levels of mucus or blood impurities in the amniotic fluid, were excluded from the study. Only the amniotic fluid samples collected < 48 hours before delivery were included in the final analysis, to reduce the probability of error due to the long rupture to delivery interval between the sample collection and delivery. Therefore, 156 pregnant women and their newborns were included in the final analysis to assess the role of inflammatory markers in the amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis (Figure 4).



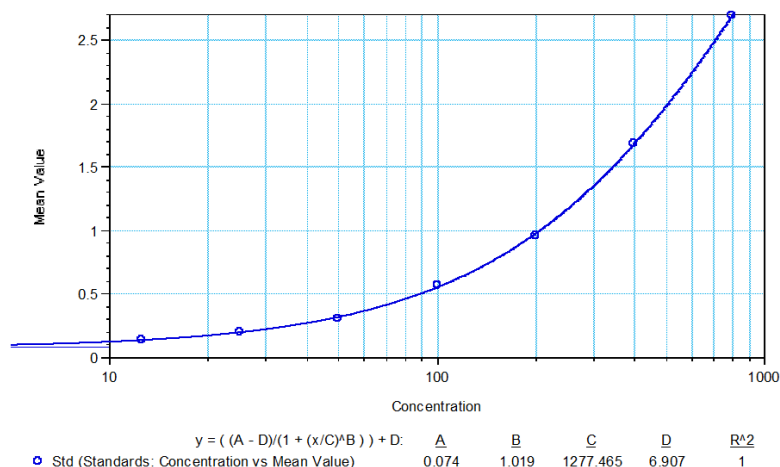
**Figure 4** Subject selection scheme for the analysis of immunological markers in the amniotic fluid

Abbreviations: n – sample size.



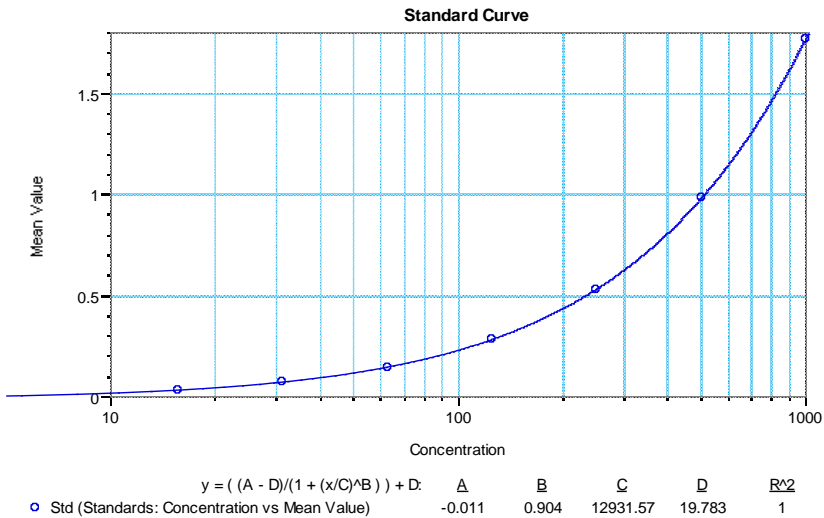
The concentration of immunological markers in the amniotic fluid was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (*Bender Medsystem*, Vienna, Austria). All immunological tests were performed by a single specialist at the State Research Institute Centre for Innovative Medicine. The dilution and preparation of the samples for the analysis was carried out according to recommendations of the manufacturers of the commercial kits.

The IL-6 concentrations were determined by ELISA using the commercial kit “Human IL-6 Quantikine QuicKit ELISA” (*R&D Systems*, Minneapolis, USA). The four-parameter logistic curve was calculated and plotted in the range of 12.5-800 pg/ml using a special software for the evaluation of immunoassay results, *Gen5 Microplate Data Collection & Analysis Software* (*BioTek Instruments*, Winooski, USA) (Figure 5). The sensitivity of the kit (minimum detectable dose) was 1.70 pg/ml. The samples were used undiluted, but if the measured optical density of the sample exceeded the highest value of the optical density, the samples were diluted to 1:10, 1:100 or 1:1000, as appropriate, and were tested again. The optical density was measured using a spectrophotometer (*BioTek Instruments*, Winooski, USA).



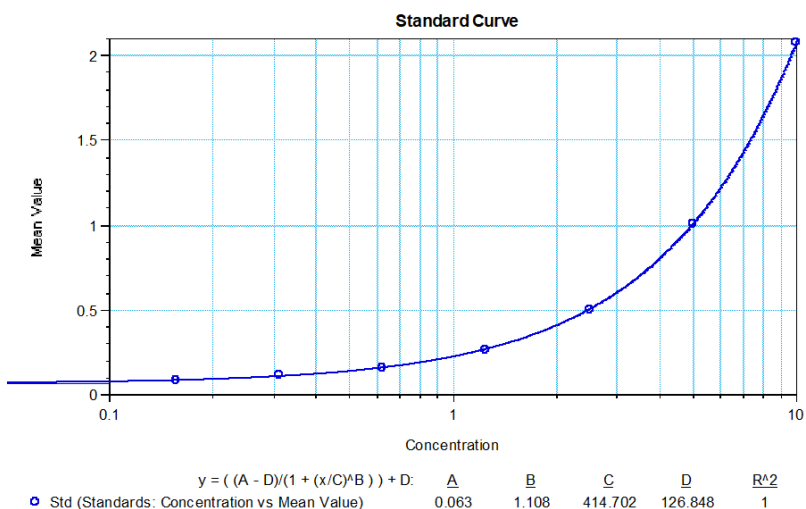
**Figure 5** Example of a four-parameter logistic curve from one IL-6 study

The TNF- $\alpha$  concentrations were determined using the commercial “Human TNF $\alpha$  ELISA Kit” (*Life Technologies*, Waltham, USA). The four-parameter logistic curve was calculated and plotted in the range of 15.6 and 1,000 pg/ml, with a sensitivity of < 2 pg/ml (Figure 6). The samples were used undiluted, but if the measured optical density of the sample exceeded the highest value of the optical density, the samples were diluted to 1:5 and were tested again.



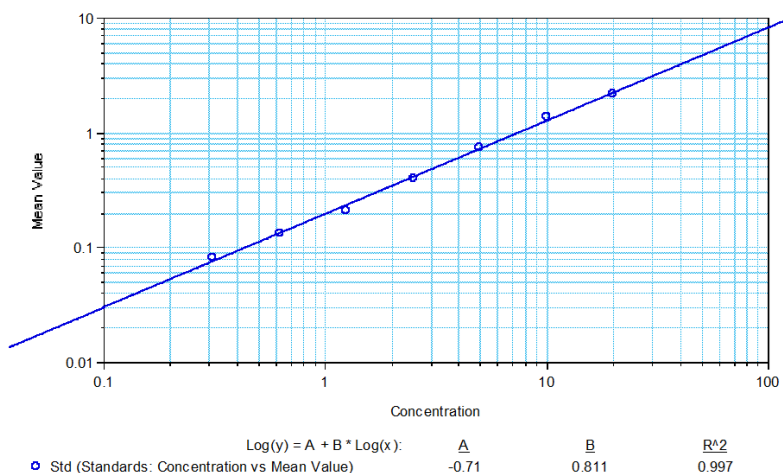
**Figure 6** Example of a four-parameter logistic curve from one TNF- $\alpha$  study

The MMP-8 levels were determined by ELISA using the commercial kit “Human Total MMP-8, Quantikine ELISA” (R&D Systems, Minneapolis, USA). The four-parameter logistic curve was calculated and plotted in the range of 0.156 and 10 ng/ml, with a sensitivity of < 0.013 ng/ml (Figure 7). The samples used were diluted to 1:10, but if the measured optical density of the sample exceeded the highest value of the optical density, the samples were diluted to 1:100 or 1:1000, as appropriate, and were tested again.



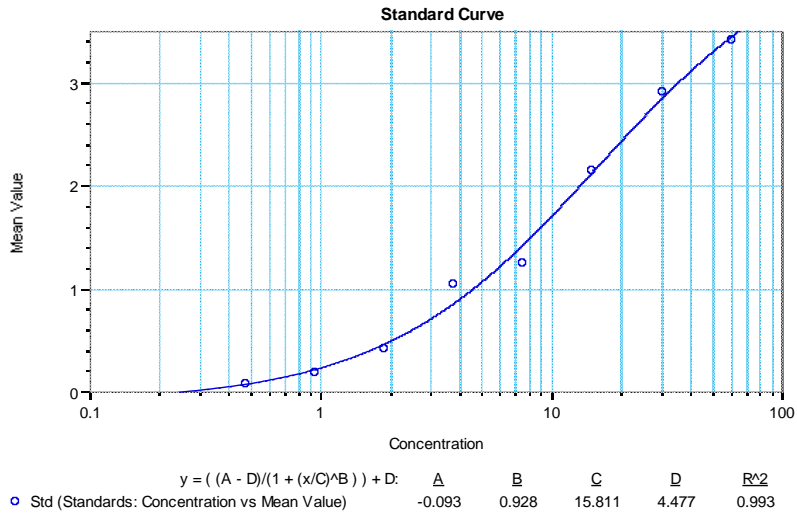
**Figure 7** Example of a four-parameter logistic curve from one MMP-8 study

The sTLR-2 levels were determined using the commercial kit “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit For Toll-Like Receptor 2 (TLR2)” (*Cloud-Clone Corp.*, Keith, USA) and the sTLR-4 levels were determined using the commercial kit “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit For Toll-Like Receptor 4 (TLR4)” (*Cloud-Clone Corp.*, USA). The log-log standard curve was calculated and plotted in the range of 0.312-20 ng/ml for both receptors (Figure 8). The sTLR-2 sensitivity was 0.112 ng/ml and the sTLR-4 sensitivity was 0.118 ng/ml. In both cases, undiluted samples were used.



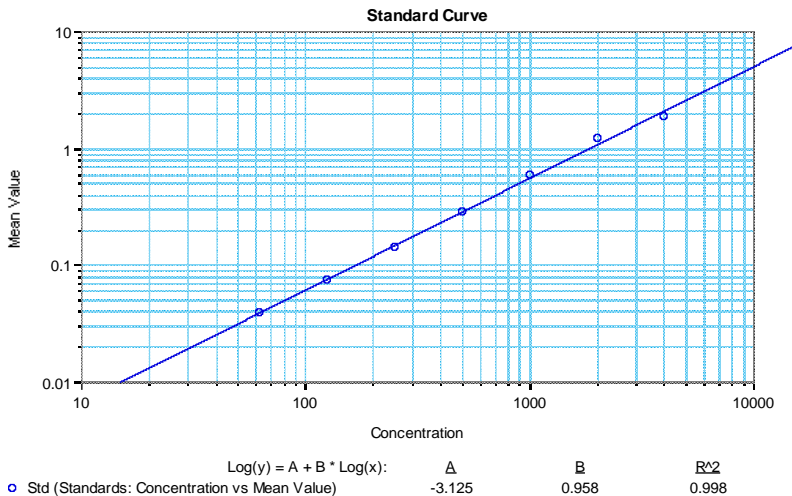
**Figure 8.** Example of a log-log standard curve from one s-TLR-2 test

The concentration of  $\alpha$ -defensins was determined using the commercial “Human Defensin Alpha 3, Neutrophil Specific (DEFA3) ELISA Kit” (*Abbexa Ltd*, Cambridge, United Kingdom). The four-parameter logistic curve was calculated and plotted in the range of 0.47 and 30 ng/ml, with a sensitivity of < 0.21 ng/ml (Figure 9). The samples were used at a dilution of 1:10.



**Figure 9.** Example of a four-parameter logistic curve from a single  $\alpha$ -defensins test

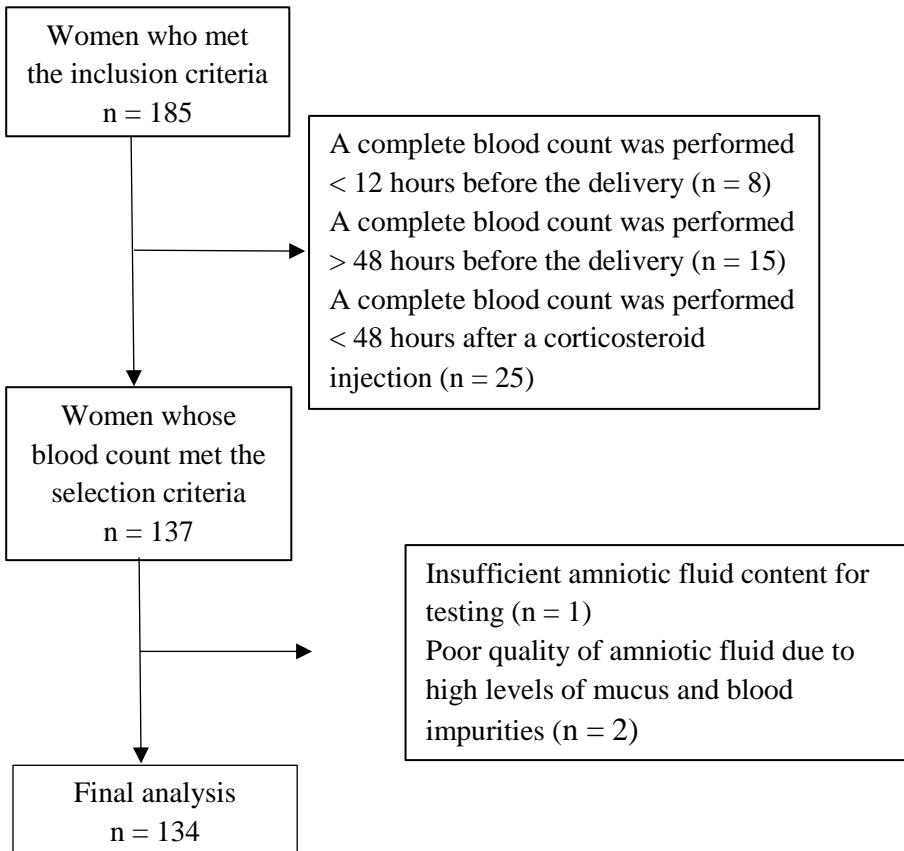
The suPAR concentrations were determined using the commercial kit “Human suPAR Immunoassay, Quantikine ELISA” (*R&D Systems*, Minneapolis, USA). The log-log curve was calculated and plotted in the range of 62.5-4,000 pg/ml and the sensitivity of the kit was < 33 pg/ml (Figure 10). The samples were used diluted to 1:5, but if the measured optical density of the sample exceeded the highest value of the optical density, the samples were diluted to 1:10 or 1:100, as appropriate, and were tested again.



**Figure 10.** Example of a log-log curve from one suPAR test

### 3.3. Part III. Comparison of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis

The aim of third part of the study was to compare the significance of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid for the histological diagnosis of chorioamnionitis. Only women with both blood and amniotic fluid samples that met the selection criteria were included in the general part of the study (Figure 11).



**Figure 11** Subject selection scheme for a comparison of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid variations: n – sample size.

### 3.4. Research sample size calculation

G\*Power (version 3.1.9.4) was used to determine the sample sizes in all three parts of the study. The selected criteria for the significance level was  $\alpha = 0.05$ . The power criterion was considered to be at least 0.8 ( $0.8 < \beta < 0.95$ ). The selected sample size met above the requirements.

### 3.5. Statistical data analysis

The statistical data analysis was carried out using the R package (version 4.0.3) (R Core Team, 2020). The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution. The mean values of the quantitative traits that met the conditions of a normal distribution were compared between two independent groups using the Student's *t* test. The values of the quantitative traits that did not meet the conditions of a normal distribution were compared using the Mann-Whitney U test and the Wilcoxon rank-sum criteria. All results for which parametric criteria were applied are described in terms of the mean of the quantitative data ( $\bar{x}$ ) with the standard deviation (SD). Results where nonparametric criteria were applied are described in terms of the median (Md) and interquartile range (IQR) of the quantitative data. The chi-squared ( $\chi^2$ ) criterion was used to test the independence of the qualitative variables and the data is presented as absolute numbers with percentages.

A binary multiple logistic regression model was used to assess the strength of association between the variables. To assess the prognostic value of the inflammatory markers for histological chorioamnionitis, ROC curves were plotted and the areas under the curves (AUC) were calculated. The DeLong test was used for a comparison of the AUCs from different models. The Youden (Y) index (sensitivity + (1 – specificity) – 1) was used to determine the optimal cut-off value.

Differences in the traits analysed were considered to be statistically significant when the significance level (*p*-value) was less than 0.05.

## 4. RESULTS OF THE STUDY

### 4.1. Part I. The role of inflammatory markers in the maternal blood in predicting histological chorioamnionitis

The biomedical part of the study, which investigated the significance of inflammatory markers in the maternal blood in diagnosing histological

chorioamnionitis, included 137 women who were admitted to the Centre of Obstetrics and Gynaecology of the VUH SK for premature leakage of amniotic fluid at a gestational age of 22<sup>+0</sup> to 34<sup>+6</sup> weeks. The first group included 52 women and the second group included 85 women and their newborns.

The general demographic and clinical characteristics of the subjects are shown in Table 1.

**Table 1.** Comparative characteristics of the subject groups

Characteristics	Group I (n = 52)	Group II (n = 85)	p-value
Mother's age (years), $\bar{x} \pm SN$	30.8 $\pm$ 5.8	31.1 $\pm$ 5.2	0.89
First pregnancy, n (%)	26 (50)	43 (50.6)	0.95
Repeat pregnancy, n (%)	26 (50)	42 (57.6)	0.95
First birth, n (%)	29 (55.8)	52 (61.2)	0.53
Repeat birth, n (%)	23 (44.2)	33 (38.8)	0.53
Gestational age at delivery (weeks), Md (IQR)	32 <sup>+3</sup> (27 <sup>+3</sup> –34 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+2</sup> (28 <sup>+6</sup> –34 <sup>+2</sup> )	0.06
Clinical chorioamnionitis, n (%)	6 (7.7)	1 (1.2)	0.008
Rupture to delivery interval (hours), Md (IQR)	148.3 (91.1–246.5)	93.5 (62.1–166.05)	0.007
Group B $\beta$ hemolytic streptococci colonisation in the vagina, n (%)	20 (38.5)	13 (15.3)	0.002
Gestational diabetes, n (%)	8 (15.4)	16 (17.6)	0.54
Hypertensive conditions, n (%)	7 (13.5)	11 (12.9)	0.93
Foetal birth weight (g), $\bar{x} \pm SN$	1,810.5 $\pm$ 690.3	1,950.2 $\pm$ 610.1	0.48
Apgar score after 5 min. < 7, n (%)	6 (11.5)	1 (1.2)	0.008
Umbilical cord arterial pH, $\bar{x} \pm$ SN	7.32 $\pm$ 0.08	7.35 $\pm$ 0.08	0.004

Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Abbreviations:  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation, Md – median, IQR – interquartile range, n – sample size.

There were no statistically significant differences in the age, number of pregnancies, number of deliveries, gestational age, prevalence of gestational

diabetes, prevalence of hypertensive conditions and birth weight between the groups. In Group I, there was a statistically significant increase in the incidence of group B  $\beta$  hemolytic streptococci colonisation in the vagina ( $p$  value 0.002) and in the incidence of clinical chorioamnionitis ( $p$  value 0.008). The rupture to delivery interval was statistically significantly longer ( $p$  value 0.007), while the neonatal Apgar score after 5 minutes ( $p$  value 0.008) and the umbilical cord blood pH ( $p$  value 0.004) were statistically significantly lower in Group I than in Group II (Table 1).

The levels of all maternal blood inflammatory markers were statistically significantly different between the groups ( $p$ -value < 0.001). The leucocyte and neutrophil counts, as well as the CRP and NLR were higher in the Group I subjects, while the lymphocyte count was higher in the Group II subjects (Table 2 and Figure 12).

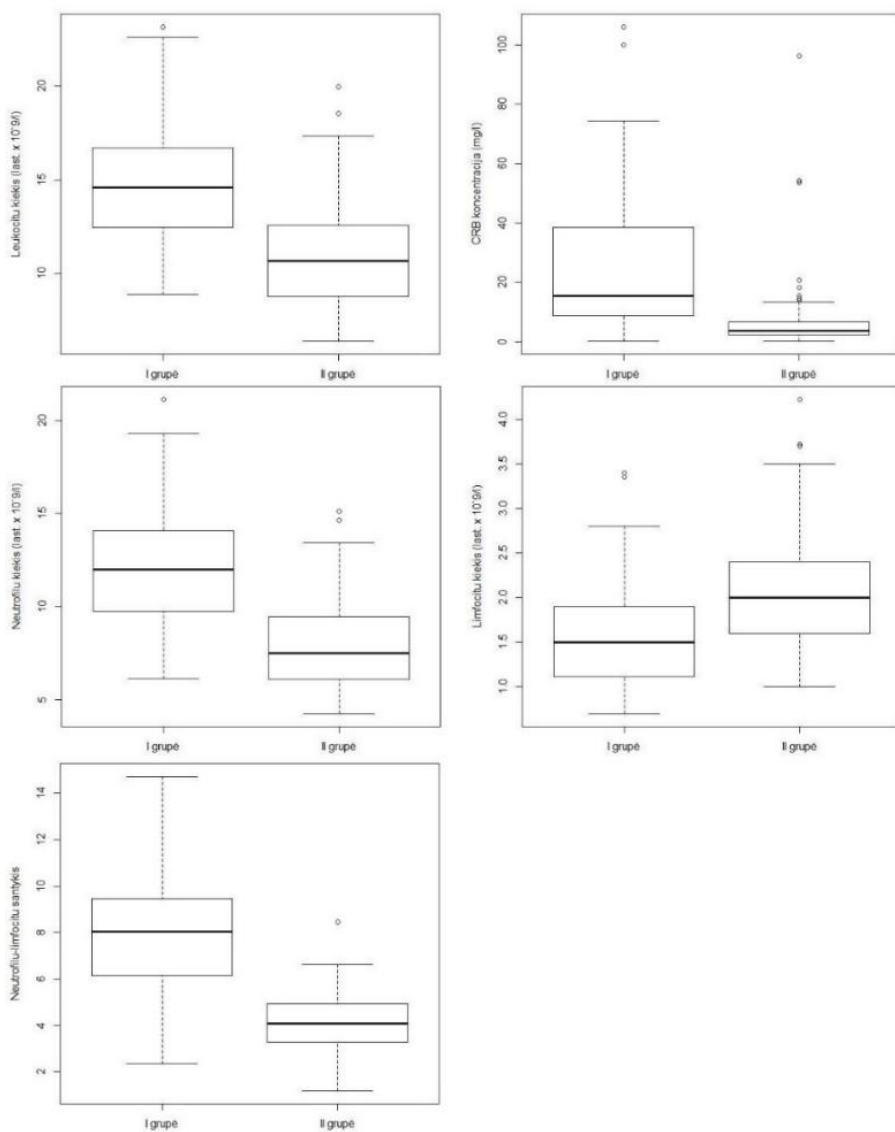
**Table 2.** Comparison of inflammatory markers in the maternal blood between the groups

Inflammatory markers in the maternal blood	Concentration of inflammatory markers in the blood		<i>p</i> -value
	Group I (n = 52)	Group II (n = 85)	
Leukocytes (cells x 10 <sup>9</sup> /l)	14.58 (12.56–16.6)	10.68 (8.78–12.57)	< 0.001
Neutrophils (cells x 10 <sup>9</sup> /l)	12 (9.75–13.9)	7.5 (6.1–9.44)	< 0.001
Lymphocytes (cells x 10 <sup>9</sup> /l)	1.5 (1.13–1.9)	2 (1.6–2.4)	< 0.001
C-reactive protein (mg/l)	15.5 (8.71–38.38)	3.66 (2.23–6.73)	< 0.001
Neutrophil-to-lymphocyte ratio	8.01 (6.18–9.72)	4.09 (3.3–4.93)	< 0.001

All data is described in terms of the median and interquartile range. Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Abbreviations: n – sample size.





**Figure 12.** Comparison of inflammatory markers in the maternal blood between the groups. Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Univariate and multivariate logistic regression analyses were conducted to assess the relative risk of the individual and combined inflammatory markers in the maternal blood in predicting histological chorioamnionitis (Table 3). NLR was found to have the highest predictive value as an independent variable (OR = 2.59; 95% CI: 1.92– 3.78;  $p$ -value < 0.001), as well as being present in all variables (OR = 5.24; 95% CI: 1.89–14.52;  $p$ -value = 0.001). In the multivariate analysis, an increase in the leukocyte count increased the relative risk of histological chorioamnionitis by a factor of 1.38 (95% CI: 1.19–1.6;  $p$ -value = 0.003) and 1.05 times for CRP (95% CI: 1.02–1.08;  $p$ -value = 0.003). The relative risk  $p$ -value for the neutrophil and lymphocyte counts was > 0.05 in the multivariate analysis.

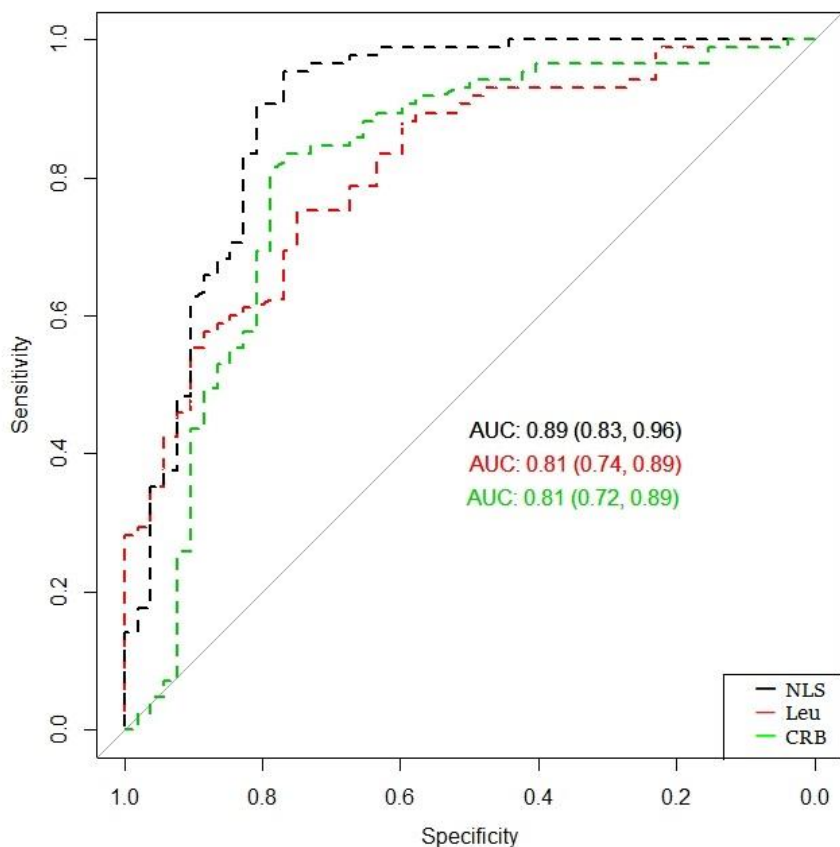
**Table 3.** Influence of inflammatory markers in the maternal blood for the histological diagnosis of chorioamnionitis

Immunological markers in the amniotic fluid	Univariate analysis			Bivariate analysis		
	OR	95% CI	$p$ -value	OR	95% CI	$p$ -value
Leukocytes	1.45	1.26–1.68	< <b>0.001</b>	1.38	1.19–1.6	<b>0.003</b>
Neutrophils	1.69	1.4–2.04	< <b>0.001</b>	1.8	0.38–9.27	0.4
Lymphocytes	0.21	0.09–0.46	< <b>0.001</b>	0.15	0.02–1.47	0.1
C-reactive protein	1.07	1.03–1.1	< <b>0.001</b>	1.05	1.02–1.08	<b>0.003</b>
Neutrophil-to-lymphocyte ratio	2.59	1.92–3.78	< <b>0.001</b>	5.24	1.89–14.52	<b>0.001</b>

$P$ -values < 0.05 are indicated in bold.

Abbreviations: OR – odds ratio, CI – confidence interval.

The accuracy of the different markers in predicting histological chorioamnionitis was assessed by plotting ROC curves and calculating the area under the curves (AUC). The calculated AUC for leukocytes was 0.81, for CRP 0.81 and for NLR was 0.89. Comparing the ROC curves of the different markers, there was no statistically significant difference between the ROC curves of CRP and NLR ( $p$ -value was 0.08). Comparing the NLR and leukocyte ROC curves with each other, the result was close to an acceptable level of significance ( $p$ -value was 0.053) (Figure 13).



**AUC comparison (p-values):**  
***Leukocyte count and CRP: 0.8***  
***Leukocyte count and NLR: 0.05***  
***CRP and NLR: 0.08***

**Figure 13.** Comparison of the ROC curves of inflammatory markers in the maternal blood

Abbreviations: NLR – neutrophil-to-lymphocyte ratio, CRP – C-reactive protein, Leu – leukocytes, AUC – area under the ROC curve.

Using the Youden index, the critical values of inflammatory markers in the blood for predicting histological chorioamnionitis were calculated. The calculated optimal critical value for the leukocyte count was  $12.62 \times 10^9/l$ , with a sensitivity and specificity of 75%. The optimal critical value for CRP was 8.56 mg/l, with a sensitivity of 77% and a specificity of 84%. The optimal

critical value for NLR was 5.97, with a sensitivity similar to other inflammatory markers in blood at 77% and a maximum specificity of 95%. (Table 4)

**Table 4** Prognostic significance of inflammatory marker critical values in the maternal blood for a diagnosis of histological chorioamnionitis

Critical value	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	PPV, % (95% CI)	NPV, % (95% CI)
<b>C-reactive protein (mg/l)</b>				
12.35	65 (58–78)	88 (79–94)	77 (62–89)	81 (71–88)
<b>8.56</b>	<b>77 (63–87)</b>	<b>84 (74–91)</b>	<b>74 (60–85)</b>	<b>86 (76–92)</b>
5.38	81 (67–90)	69 (58–79)	62 (49–73)	86 (75–93)
3.12	90 (79–98)	44 (33–55)	49 (39–60)	88 (74–96)
<b>Leukocytes (cells x 10<sup>9</sup>/l)</b>				
13.44	63 (49–76)	84 (74–91)	70 (55–83)	79 (69–87)
<b>12.62</b>	<b>75 (61–86)</b>	<b>75 (65–84)</b>	<b>65 (65–77)</b>	<b>83 (73–91)</b>
11.72	79 (65–89)	62 (51–73)	56 (44–68)	83 (71–91)
11.65	83 (70–92)	61 (50–72)	57 (45–68)	85 (74–93)
<b>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</b>				
6.55	67 (53–80)	98 (92–100)	95 (82–99)	83 (74–90)
<b>5.97</b>	<b>77 (63–97)</b>	<b>95 (88–99)</b>	<b>91 (78–97)</b>	<b>87 (79–93)</b>
5.72	81 (67–90)	91 (82–96)	84 (71–93)	89 (80–94)
5.38	83 (70–92)	84 (74–91)	75 (62–86)	89 (80–95)

Optimal cut-off values for the markers are indicated in bold.

Abbreviations: CI – confidence interval, PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value.

#### 4.2. Part II: The role of inflammatory markers in the amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis

Part II of the biomedical study, investigating the role of inflammatory markers in the amniotic fluid in the diagnosis of histological chorioamnionitis, included 156 women admitted to the Centre of Obstetrics and Gynaecology of the VUH SK for a premature leakage of amniotic fluid at 22<sup>+0</sup> to 34<sup>+6</sup> weeks of gestation. Group I included 65 women and Group II included 91 women and their neonates.

The general demographic and clinical characteristics of the subjects are shown in Table 5.

**Table 5** Comparative characteristics of the subject groups

Characteristics	Group I (n = 65)	Group II (n = 91)	p-value
Mother's age (years), $\bar{x} \pm SD$	30.6 $\pm$ 6.4	31.2 $\pm$ 5.8	0.53
First pregnancy, n (%)	32 (49.2)	46 (50.6)	0.87
Repeat pregnancy, n (%)	33 (50.8)	45 (49.4)	0.87
First birth, n (%)	38 (58.5)	57 (62.6)	0.59
Repeat birth, n (%)	27 (41.5)	34 (37.4)	0.59
Gestational age at delivery (weeks), Md (IQR)	32 <sup>+0</sup> (27 <sup>+2</sup> –33 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+0</sup> (28 <sup>+1</sup> –33 <sup>+5</sup> )	0.13
Clinical chorioamnionitis, n (%)	6 (9.2)	1 (1.1)	0.02
Rupture to delivery interval (in hours), Md (IQR)	96.2 (62.5–194.4)	82.3 (58.2–171.6)	0.003
Group B $\beta$ hemolytic streptococci colonisation in the vagina, n (%)	24 (36.9)	15 (16.5)	0.003
Gestational diabetes, n (%)	11 (16.9)	16 (17.6)	0.91
Hypertensive conditions, n (%)	8 (12.3)	12 (13.2)	0.87
Foetal birth weight (g), $\bar{x} \pm SN$	1,768.2 $\pm$ 669.1	1,872.7 $\pm$ 603.2	0.51
Apgar score after 5 min. < 7, n (%)	6 (9.2)	1 (1.1)	0.02
Umbilical cord arterial pH, $\bar{x} \pm SN$	7.31 $\pm$ 0.09	7.35 $\pm$ 0.09	0.003

Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Abbreviations:  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation, Md – median, IQR – interquartile range, n – sample size.

Like in the first part of the study, the age, number of pregnancies, number of deliveries, duration of pregnancy, incidence of gestational diabetes, hypertensive conditions and birth weight were not statistically significantly different between the groups. In Group I, there was a statistically significant increase in the incidence of group B  $\beta$  hemolytic streptococcus colonisation in the vagina (*p*-value 0.003) and in the incidence of clinical chorioamnionitis (*p*-value 0.02). The rupture to delivery interval was statistically significantly longer (*p*-value 0.003), while the umbilical cord arterial pH (*p*-value 0.003) and assessment of the newborn according to the Apgar score after 5 min were

statistically significantly lower ( $p$ -value 0.02) in Group I than in Group II (Table 5).

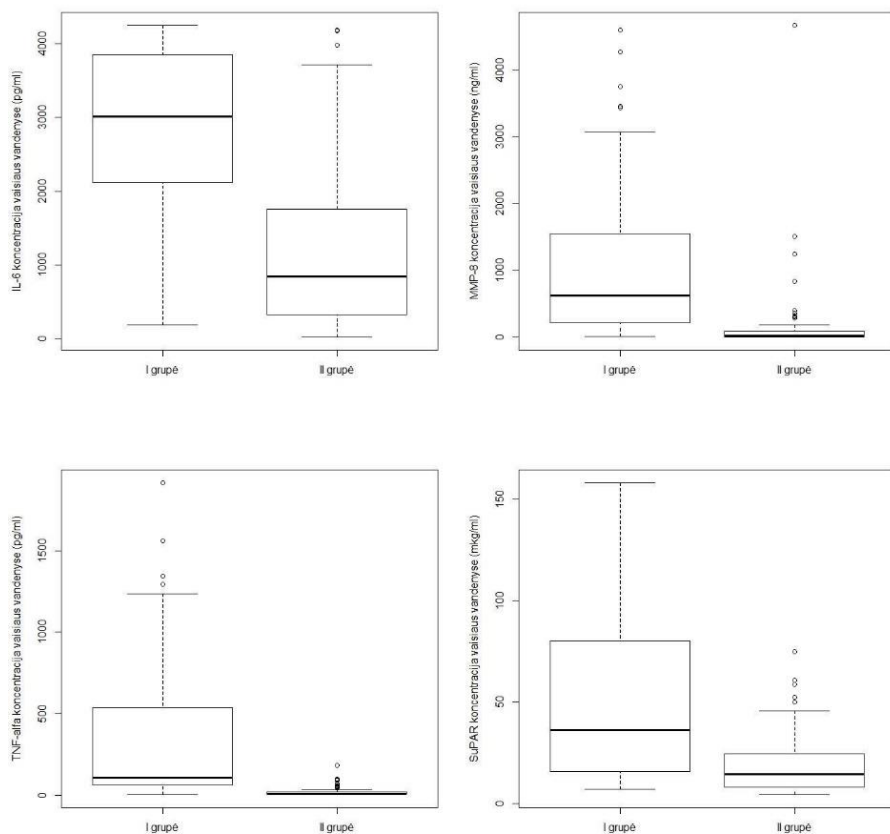
The concentrations of IL-6 (3003.3 and 904.07 pg/ml), MMP-8 (636.43 and 18.68 ng/ml), TNF- $\alpha$  (124.19 and 8.64 pg/ml) and suPAR (36.29 and 16.21 mcg/ml) in the amniotic fluid of the Group I subjects were significantly higher than in the Group II subjects ( $p$ -value <0.001) (Table 6, Figure 14). Meanwhile, the concentrations of sTLR-2 (0.11 and 0.09 ng/ml), sTLR-4 (0.28 and 0.23 ng/ml) and  $\alpha$ -defensins (24.08 and 20.15 ng/ml) were not statistically significantly different between the groups (Table 6 and Figure 15).

**Table 6** Comparison of the concentrations of immunological markers in the amniotic fluid between the groups

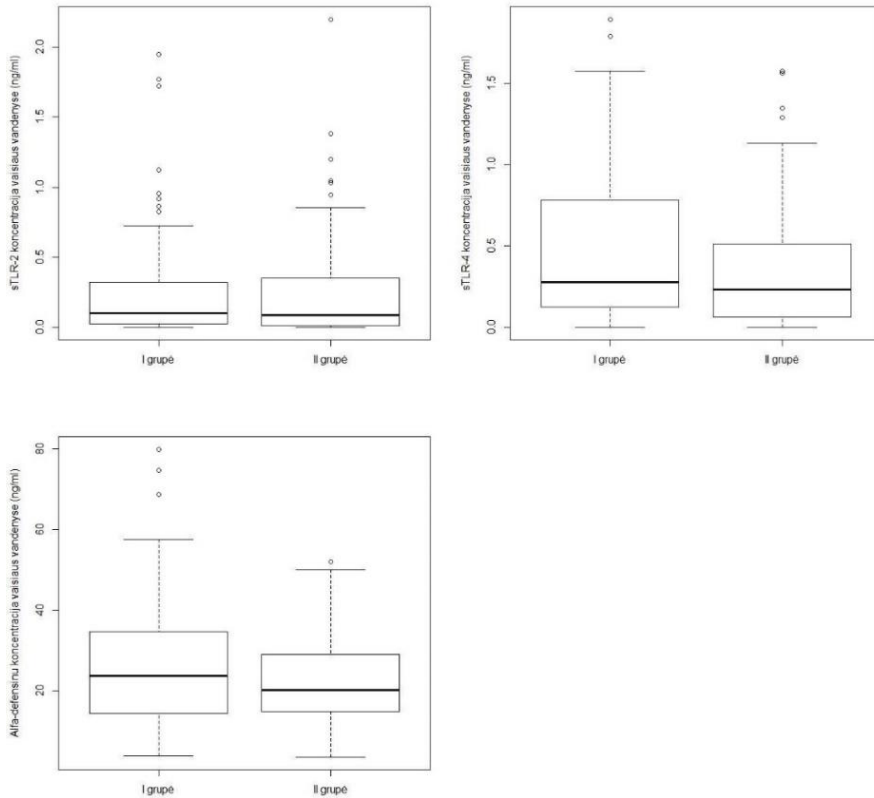
Immunological markers in the amniotic fluid	Concentration of the immunological markers		$p$ -value
	Group I (n = 65)	Group II (n = 91)	
IL-6 (pg/ml)	3,003.3 (2,100.0–3,920.91)	904.07 (325.27–1,888.53)	<0.001
MMP-8 (ng/ml)	636.43 (190.82–1,568.53)	18.68 (4.55–93.27)	<0.001
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	124.19 (63.84–595.97)	8.64 (6.02–17.89)	<0.001
sTLR-2 (ng/ml)	0.11 (0.03–0.34)	0.09 (0.01–0.35)	0.403
sTLR-4 (ng/ml)	0.28 (0.13–0.78)	0.23 (0.06–0.51)	0.123
$\alpha$ -defensins (ng/ml)	24.08 (14.98–35.01)	20.15 (14.85–29.06)	0.1
suPAR(mkg/ml)	36.29 (18.43–81.02)	16.21 (9.72–25.97)	<0.001

All data is described in terms of the median and interquartile range. Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Abbreviations: n – sample size, IL-6 – interleukin 6, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , sTLR-2 – soluble *Toll-like* receptor-2, sTLR-4 – soluble *Toll-like* receptor-4, suPAR – soluble urokinase-like plasminogen activator receptor.



**Figure 14** Comparison of the concentration of immunological markers in the amniotic fluid between the groups  
 Abbreviations: IL-6 – interleukin 6, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , suPAR – soluble urokinase-like plasminogen activator receptor.



**Figure 15** Comparison of the concentration of immunological markers in the amniotic fluid between the groups.

Abbreviations: sTLR-2 –soluble *Toll-like* receptor-2; sTLR-4 – soluble *Toll-like* receptor-4.

Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed to assess the relative risk of an individual and immunological markers in the amniotic fluid were pooled for predicting histological chorioamnionitis (Table 7). In both the univariate and multivariate logistic regression analyses, IL-6, MMP-8, TNF- $\alpha$  and suPAR were found to be statistically significant immunological markers in the amniotic fluid for the prediction of chorioamnionitis. Among the statistically significant immunological markers, TNF- $\alpha$  had the highest probability value as an independent variable (OR = 1.03; 95% CI: 1.02–1.05;  $p$ -value < 0.001), as well as being present in all the variables (OR = 1.03; 95% CI: 1.01–1.04;  $p$ -value = 0.001). In the multivariate



analysis, an increase in the leukocyte count increased the relative risk of histological chorioamnionitis by a factor of 1.02 (95 % CI: 1.01–1.06;  $p$ -value < 0.001) and suPAR increased the risk by 1.01 times (95% CI: 1.002–1.02;  $p$ -value = 0.03). Since IL-6 concentrations increase dozens to hundreds of times during inflammation, a 1-unit increase in the IL-6 concentration only increased the relative risk of histological chorioamnionitis by a factor of 1.0001 (95 % CI: 1.0002–1.002;  $p$ -value = 0.02).

By plotting the ROC curves and calculating the area under the curves, the accuracy of different immunological markers in the amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis was evaluated. The estimated AUC for IL-6 was 0.81, for MMP-8 was 0.89, for TNF- $\alpha$  was 0.91 and for suPAR was 0.78 (Figure 16). The ROC curves for the statistically insignificant markers are shown in a separate figure: the AUC for  $\alpha$ -defensins was 0.58, for sTLR-2 was 0.54 and for sTLR-4 was 0.57 (Figure 17).

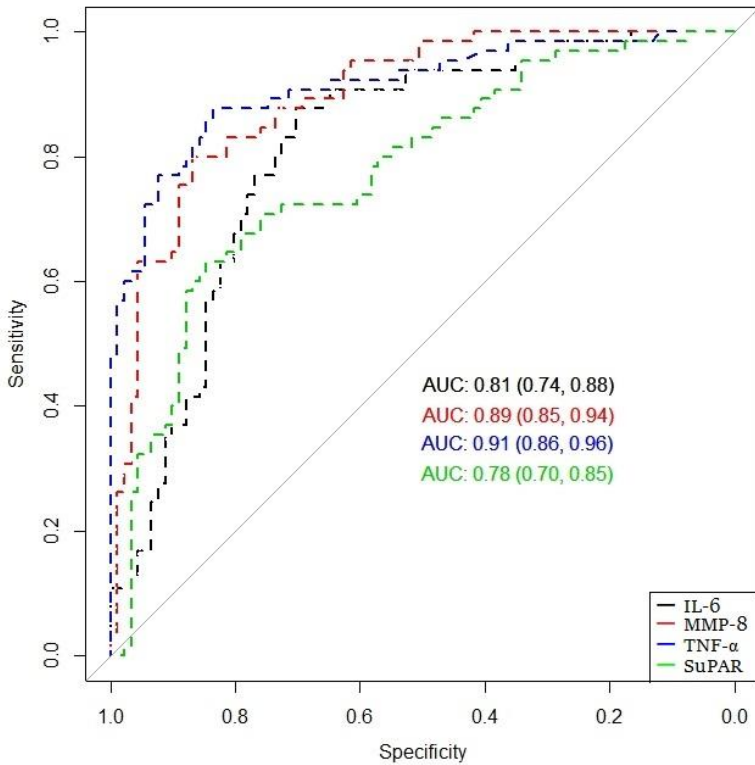
A comparison of the ROC curves of different markers showed a statistically significant difference between TNF- $\alpha$ , MMP-8 and all the other immunological markers in the amniotic fluid that was tested ( $p$ -value < 0.05). The TNF- $\alpha$  and MMP-8 AUC values were not statistically significantly different from each other ( $p$ -value = 0.51). There was also no statistically significant difference between the AUC of IL-6 and suPAR ( $p$ -value = 0.43) (Figure 16). A comparison of the AUC curves for  $\alpha$ -defensins, sTLR-2 and sTLR-4 again showed no statistically significant difference (Figure 17).

**Table 7.** Influence of immunological markers in the amniotic fluid on the histological diagnosis of chorioamnionitis

Immunological markers in the amniotic fluid	Univariate analysis			Bivariate analysis		
	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
<b>IL-6</b>	1.0001	1.00002–1.0002)	<b>0.009</b>	1.0001	1.0002–	<b>0.02</b>
<b>MMP-8</b>	1.002	1.001–1.003	< <b>0.001</b>	1.02	1.01–1.06	< <b>0.001</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1.03	1.02–1.05	< <b>0.001</b>	1.03	1.01–1.04	< <b>0.001</b>
<b>sTLR-2</b>	1.6	0.79–3.22	0.18	1.07	0.15–3.38	0.8
<b>sTLR-4</b>	2.15	0.91–4.58	0.09	1.11	0.31–3.99	0.44
<b><math>\alpha</math>-defensins</b>	1.03	0.95–1.06	0.06	1.06	0.99–1.06	0.06
<b>suPAR</b>	1.01	1.003–1.02	<b>0.008</b>	1.01	1.002–1.02	<b>0.03</b>

P-values < 0.05 are indicated in bold.

Abbreviations: Abbreviations: n – sample size, IL-6 – interleukin 6, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , sTLR-2 – soluble *Toll-like* receptor-2, sTLR-4 – soluble *Toll-like* receptor-4, suPAR – soluble urokinase-like plasminogen activator receptor.



**AUC comparison (p-values):**

***TNF- $\alpha$  and IL-6: 0.003***

***MMP-8 and IL-6: 0.01***

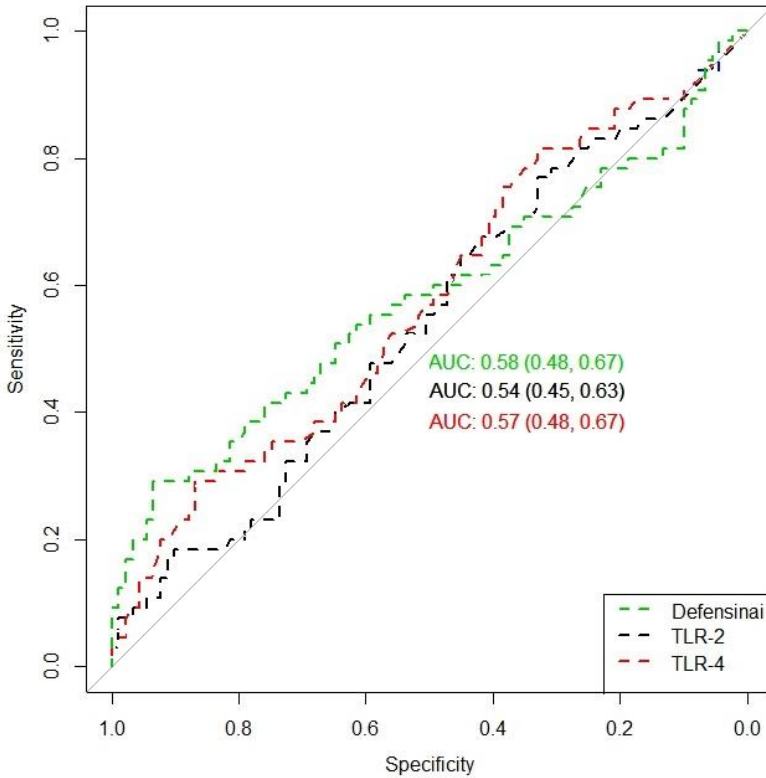
***TNF- $\alpha$  and MMP-8: 0.51***

***TNF- $\alpha$  and suPAR: < 0.001***

***MMP-8 and suPAR: < 0.001***

***IL-6 and suPAR: 0.43***

**Figure 16.** Comparison of the ROC curves of immunological markers in the amniotic fluid Abbreviations: IL-6 – interleukin 6, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , suPAR – soluble urokinase-like plasminogen activator receptor.



**AUC comparison (p-values):**

***sTLR-2 and sTLR-4: 0.42***

***α-defensins with sTLR-2: 0.48***

***α-defensins and sTLR-4: 0.94***

**Figure 17.** Comparison of the ROC curves of immunological markers in the amniotic fluid

Abbreviations: sTLR-2 –soluble *Toll-like* receptor-2; sTLR-4 – soluble *Toll-like* receptor-4.

Using the Youden index, the critical values of immunological markers in the amniotic fluid for predicting histological chorioamnionitis were calculated. The optimal critical value for predicting histological chorioamnionitis was calculated to be 1,389.82 pg/ml for IL-6, with a sensitivity of 88% and a specificity of 70%, and was 172.53 ng/ml for MMP-8 (sensitivity 80% and specificity of 87%), while TNF-α was 21.17 pg/ml (sensitivity 88%, specificity 84%) and suPAR was 30.08 mcg/ml (sensitivity

63%, specificity 85%). Of all the critical values calculated, IL-6 and TNF- $\alpha$  had the highest sensitivity and MMP-8 the highest specificity (Table 8).

**Table 8.** Predictive significance of the critical values of immunological markers in a foetus in the diagnosis of histological chorioamnionitis

Critical value	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	PPV, % (95% CI)	NPV, % (95% CI)
<b>IL-6 (pg/ml)</b>				
4195.68	17 (9–28)	96 (89–99)	73 (45–92)	62 (53–70)
3427.52	37 (25–50)	90 (82–95)	73 (54–87)	67 (58–75)
2844.43	57 (44–69)	85 (76–91)	73 (58–84)	73 (64–81)
<b>1389.82</b>	<b>88 (77–94)</b>	<b>70 (60–79)</b>	<b>67 (56–77)</b>	<b>89 (79–95)</b>
<b>MMP-8 (ng/ml)</b>				
413.67	63 (50–75)	96 (89–99)	91 (79–98)	78 (70–86)
294.36	65 (52–76)	90 (82–95)	82 (69–92)	78 (69–86)
<b>172.53</b>	<b>80 (68–89)</b>	<b>87 (78–93)</b>	<b>81 (70–90)</b>	<b>86 (77–92)</b>
124.5	83 (72–91)	81 (72–89)	76 (64–85)	87 (78–93)
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>				
70.77	72 (60–83)	95 (88–98)	90 (79–97)	83 (74–89)
50.39	78 (67–88)	89 (81–95)	84 (72–92)	85 (77–92)
24.56	86 (75–93)	85 (76–91)	80 (69–89)	90 (81–95)
<b>21.17</b>	<b>88 (77–95)</b>	<b>84 (74–90)</b>	<b>79 (68–88)</b>	<b>90 (82–96)</b>
<b>suPAR(mkg/ml)</b>				
62.84	32 (21–45)	96 (89–99)	84 (64–95)	66 (58–74)
43.2	40 (28–53)	90 (82–95)	74 (57–88)	68 (59–76)
<b>30.08</b>	<b>63 (50–75)</b>	<b>85 (76–91)</b>	<b>75 (61–85)</b>	<b>76 (67–84)</b>
28.19	65 (52–76)	81 (72–89)	71 (58–82)	76 (67–84)

Optimal cut-off values for the markers are indicated in bold.

Abbreviations: CI – confidence interval, PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, IL-6 – interleukin 6, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, suPAR – soluble urokinase-like plasminogen activator receptor.

#### 4.3. Part III. Comparison of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid in predicting histological chorioamnionitis.

In Part III of the biomedical study, which aimed to compare the values of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid for the prediction of histological chorioamnionitis, 134 women who had been

admitted to the Centre of Obstetrics and Gynaecology, VUH SK, due to a premature rupture of the amniotic fluid were enrolled, with a gestational age of 22<sup>+0</sup> to 34<sup>+6</sup> weeks, and who fulfilled the eligibility criteria for both of the two previously described parts. Group I included 52 women, while Group II included 82 women and their neonates.

The general demographic and clinical characteristics of the subjects are shown in Table 9.

**Table 9.** Comparative characteristics of the subject groups

Characteristics	Group I (n = 52)	Group II (n = 82)	p-value
Mother's age (years), $\bar{x} \pm SD$	30.8 $\pm$ 5.8	31 $\pm$ 5.2	0.9
First pregnancy, n (%)	26 (50)	42 ()	0.89
Repeat pregnancy, n (%)	26 (50)	40 ()	0.89
First birth, n (%)	29 (55.8)	44 ()	0.99
Repeat birth, n (%)	23 (44.2)	35 ()	0.99
Gestational age at delivery (weeks), Md (IQR)	32 <sup>+3</sup> (27 <sup>+3</sup> –34 <sup>+0</sup> )	33 <sup>+3</sup> (29 <sup>+0</sup> –34 <sup>+2</sup> )	0.06
Clinical chorioamnionitis, n (%)	6 (7.7)	1 ()	0.09
Rupture to delivery interval (in hours), Md (IQR)	148.3 (91.1–246.5)	105.2 (80.6–210.4)	0.007
Group B $\beta$ hemolytic streptococci colonisation in the vagina, n (%)	20 (38.5)	13 ()	0.03
Gestational diabetes, n (%)	8 (15.4)	15 ()	0.66
Hypertensive conditions, n (%)	7 (13.5)	11 ()	0.99
Foetal birth weight (g), Md (IQR)	1,810.5 $\pm$ 690.3	1,980 $\pm$ 665.5	0.44
Apgar score after 5 min. < 7, n (%)	6 (11.5)	1 (1.2)	0.09
Umbilical cord arterial pH, Md (IQR)	7.32 $\pm$ 0.08	7.35 $\pm$ 0.07	0.004

Group I – women diagnosed with histological chorioamnionitis; Group II – women not diagnosed with histological chorioamnionitis.

Abbreviations:  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation, Md – median, IQR – interquartile range, n – sample size.

Like in the first two parts of the study, the age, number of pregnancies, number of births, gestational age, incidence of gestational diabetes, hypertensive conditions and birth weight were not statistically significantly different between the groups. In Group I, there was a statistically significant increase in the incidence of group B  $\beta$  hemolytic streptococcus colonisation in the vagina (p-value 0.03) and in the incidence of clinical chorioamnionitis

(*p*-value 0.09). The rupture to delivery interval was statistically significantly longer (*p*-value 0.007), while the umbilical cord arterial pH (*p*-value 0.004) and the assessment of the condition of the neonate according to the Apgar score after 5 min were statistically significantly lower (*p*-value 0.09) in Group I than in Group II (Table 9).

The inflammatory markers in the maternal blood (NLR and CRP) and amniotic fluid (TNF- $\alpha$  and MMP-8) with the best prognostic values were included in the comparison between the inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid for histological chorioamnionitis. To assess the relative risk of these markers in predicting histological chorioamnionitis, a pooled multivariate logistic regression analysis of the data was performed (Table 10).

NLR showed the highest relative risk in the multivariate analysis (OR = 2.51; 95% CI: 1.53–4.14; *p*-value = 0.001). TNF- $\alpha$  increased several dozen times and MMP-8 increased several hundred times during inflammation, resulting in an increase in TNF- $\alpha$  (OR = 1.02; 95 % CI: 1.009–1.04; *p*-value = 0.021) and MMP-8 (OR = 1.003; 95% CI: 1.009–1.04; *p*-value = 0.02), while the relative risk in the multivariate analysis was lower than in the NLR. CRP was a statistically insignificant marker in this analysis: OR = 1.01; 95 % CI: 0.98–1.06; *p*-value = 0.42).

**Table 10.** Influence of immunological markers in the maternal blood and amniotic fluid on the diagnosis of histological chorioamnionitis

Inflammatory markers	Bivariate analysis		
	OR	95% CI	<i>p</i> -value
C-reactive protein	1.01	0.98–1.06	0.42
Neutrophil-to-lymphocyte ratio	2.51	1.53–4.14	<b>&lt; 0.001</b>
TNF- $\alpha$	1.02	1.009–1.04	0.02
MMP-8	1.003	1.0002–1.005	0.02

*P*-values < 0.05 are indicated in bold.

Abbreviations: TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, OR – odds ratio, CI – confidence interval.

A comparison of the ROC curves of inflammatory markers in the blood and amniotic fluid showed a statistically significant difference between the AUC values of CRP and TNF- $\alpha$  (0.81 and 0.91, *p*-value = 0.05). No statistically significant difference was observed when comparing CRP, IL-6 and MMP-8 with each other and when comparing TNF- $\alpha$  with IL-6 and MMP (Table 11 and Figure 18).

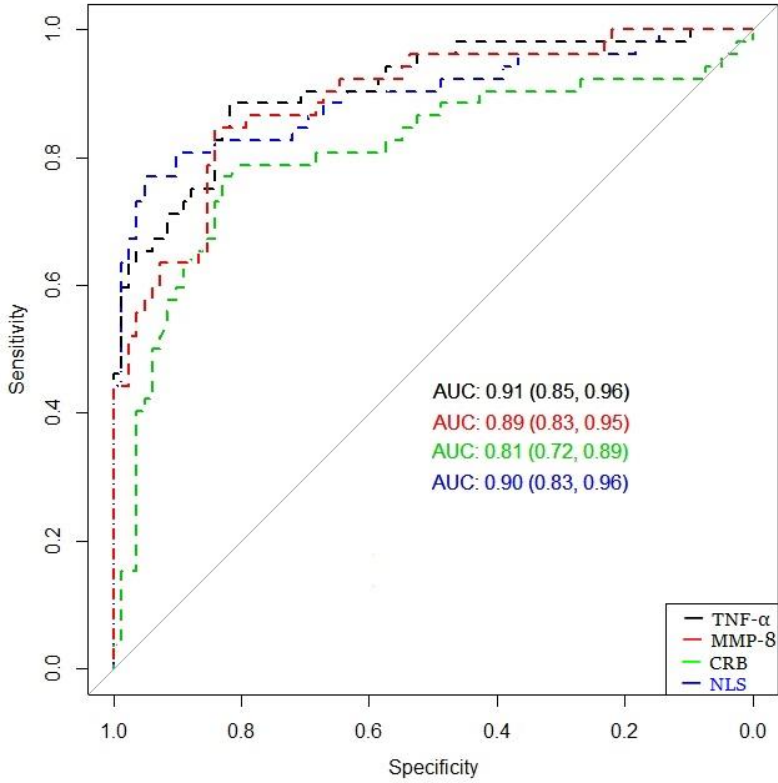
4 separate models were developed, assessing inflammatory markers in the blood together with inflammatory markers in the amniotic fluid: CRP + TNF- $\alpha$ , CRP + MMP-8, NLR + CRP and NLR + MMP-8. The models of inflammatory markers in the blood and amniotic fluid showed higher predictive values than for single markers: the AUC for CRP + TNF- $\alpha$  was 0.88, for CRP + MMP-8 it was 0.89, for NLR + TNF- $\alpha$  it was 0.91, and for NLR + MMP-8 it was 0.93 (Table 15, Figures 35 and 36). All the models showed statistically significantly higher predictive values than the single CRP score, but only one model (NLR + MMP-8) showed statistically significantly higher predictive values than the single NLR score. All of the newly developed models were not statistically significantly different from each other (Table 11, Figures 19 and 20).



**Table 11.** Comparison of the predictive values of inflammatory markers in the blood and amniotic fluid in the diagnosis of chorioamnionitis

Inflammatory markers (AUC)	CRP (0.81)	NLR (0.9)	MMP-8 (0.89)	TNF- $\alpha$ (0.91)	CRP + TNF- $\alpha$	CRP + MMP-8	NLR + TNF- $\alpha$ (0.91)	NLR + MMP-8 (0.93)
CRP (0.81)	—	0.08	0.11	0.05	0.02	0.01	0.02	0.02
NLR (0.9)	0.08	—	0.89	0.79	0.74	0.87	0.1	0.04
MMP-8 (0.89)	0.11	0.89	—	0.58	0.82	0.98	0.3	0.53
TNF- $\alpha$ (0.91)	0.05	0.79	0.58	—	0.49	0.63	0.53	0.85
CRP+TNF- $\alpha$ (0.88)	0.02	0.74	0.82	0.49	—	0.73	0.22	0.42
CRP+MMP-8 (0.89)	0.01	0.87	0.98	0.63	0.73	—	0.3	0.47
NLR+TNF- $\alpha$ (0.91)	0.02	0.1	0.3	0.53	0.22	0.3	—	0.3
NLR+MMP-8 (0.93)	0.02	0.04	0.53	0.85	0.42	0.47	0.3	—

Abbreviations: CRP – C-reactive protein, NLR – neutrophil-to-lymphocyte ratio, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ , AUC – area under the curve.



**AUC comparison (p-values):**

***CRP and TNF- $\alpha$ : 0.05***

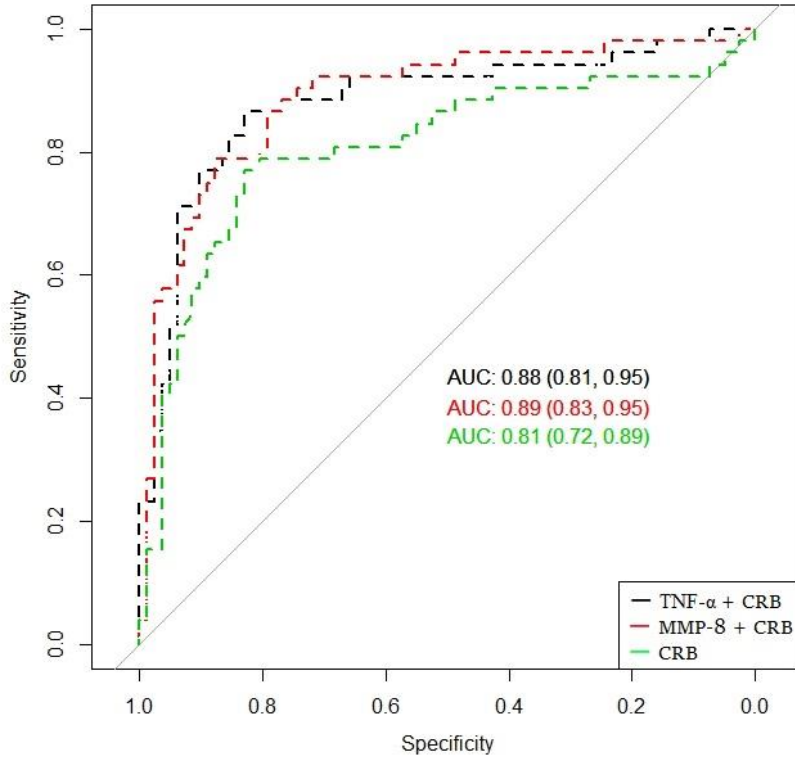
***CRP and MMP-8: 0.11***

***NLR and TNF- $\alpha$ : 0.79***

***NLR and MMP-8: 0.89***

**Figure 18.** Comparison of the ROC curves of inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid

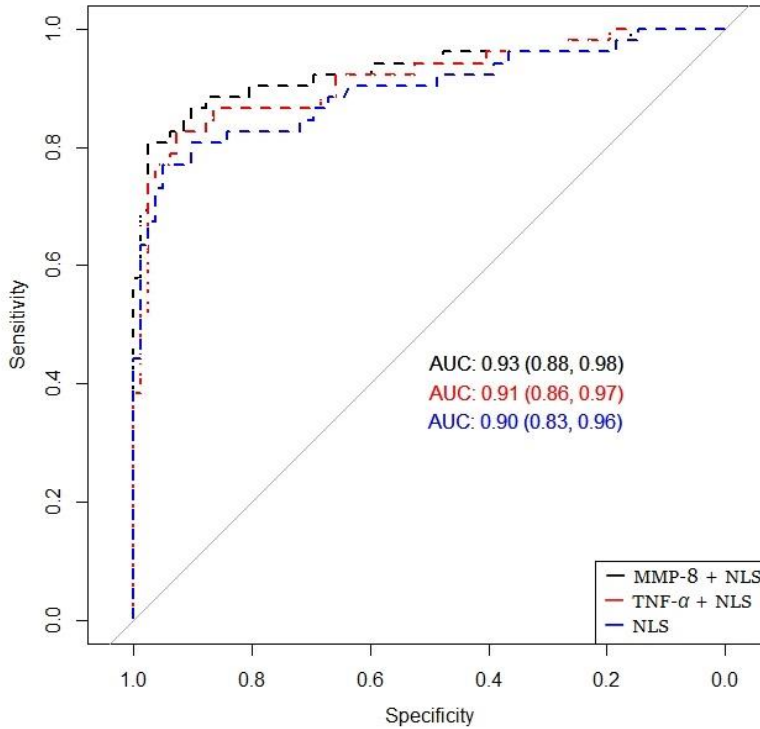
Abbreviations: NLR – neutrophil-to-lymphocyte ratio, CRP – C-reactive protein, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .



**AUC comparison (p-values):**  
**CRP and CRP+TNF- $\alpha$ : 0.02**  
**CRP and CRP+MMP-8: 0.01**  
**CRP+TNF- $\alpha$  and CRP+MMP-8: 0.73**

**Figure 19:** Comparison of the ROC curves between the single CRP and CRP models with MMP-8 and TNF- $\alpha$

Abbreviations: CRP – C-reactive protein, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .



**AUC comparison (p-values):**  
***NLR and NLR+TNF- $\alpha$ : 0.1***  
***NLR and NLR+MMP-8: 0.04***  
***NLR+ TNF- $\alpha$  and NLR+MMP-8: 0.3***

**Figure 20:** Comparison of the ROC curves for the single NRS and NLR models with MMP-8 and TNF- $\alpha$ .

Abbreviations: NLR – neutrophil-to-lymphocyte ratio, MMP-8 – matrix metalloproteinase 8, TNF- $\alpha$  – tumour necrosis factor  $\alpha$ .

## 5. DISCUSSION

The rapid and accurate diagnosis of chorioamnionitis is one of the most important challenges in relation to preterm premature rupturing of the membranes. Currently, clinical Gibbs criteria are the most commonly used to diagnose chorioamnionitis, with a specificity of 98% but a sensitivity of only 15%. Most of the current studies have focused on detecting biochemical changes, which could lead to a more accurate and faster diagnosis of chorioamnionitis.

In our study, we evaluated the inflammatory changes in routinely performed maternal blood tests and the biochemical changes in non-invasively collected amniotic fluid. In the maternal blood test, we assessed changes in the leukocyte count, CRP and NLR. NLR is widely used in the diagnosis of various infections, but the assessment of this relationship is not routinely accepted in obstetrics, and there are only a few scientific papers analysing the role of the NLR in the diagnosis of chorioamnionitis. The leukocyte count, which is so far the most commonly used assessment and the one included in the clinical criteria, had lower diagnostic values than the NLR when assessing inflammatory changes in the maternal blood in our study: the relative risk of the leukocyte count in a multivariate logistic regression analysis for inflammatory markers in the blood was 1.38 (95% CI: 1.19–1.6), the AUC was 0.81 and the relative risk of the NLR was 5.24 (95% CI: 1.89–14.52) and of AUC was 0.89. The difference between the leukocyte count and the NLR diagnostic values was close to an acceptable statistically significant difference ( $p$ -value = 0.053). NLR is considered in the scientific literature to be a more accurate indicator of infection than the assessment of individual leukocyte types, as it combines 2 inflammatory markers simultaneously. In our study, we set the optimal cut-off value for the NLR at 5.97, with a sensitivity of 77% and a specificity of 98%. Kim et al. also evaluated the superiority of the NLR over a leukocyte count assessment in their 2014 study. Their calculated NLR cut-off value was similar to our cut-off value of 6.48, with a sensitivity of 71.4% and a specificity of 77.9%. In that study, a statistically significant difference between the NLR and CRP diagnostic values was also observed, which we did not observe in our study. The different findings could be due to the fact that Kim et al. included all pregnant women diagnosed with a preterm birth between 24 and 37 weeks of gestation, whereas our study included only those women diagnosed with preterm premature rupture of the membranes between 22 and 34 weeks of gestation.

The assessment of NLR is limited by the fact that corticosteroid use causes leukocytosis with a leftward deviation of the formula and a relative

lymphopenia lasting 24 to 48 hours. All pregnant women with preterm premature rupture of the membranes before 33<sup>+6</sup> weeks of gestational age shall be administered corticosteroid for the purpose of foetal lung maturation. Therefore, the assessment of the NLS at the time of corticosteroid administration and up to 48 hours after the last dose was not accurate. The leukocyte formula may also be altered by the administration of magnesium sulphate for foetal neuroprotection and diseases such as hypertensive conditions in pregnancy, gestational diabetes or intrahepatic cholestasis of pregnancy. It is therefore recommended to assess the NLR in the context of the current clinical situation.

We chose to assess cytokines of a high diagnostic value in non-invasively collected amniotic fluid, the high diagnostic value of which was proved in the amniotic fluid collected by amniocentesis (IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8, sTLR-2, sTLR-4,  $\alpha$ -defensins) and the suPAR marker with a high diagnostic value determined in various infections. The statistically significant markers observed in our study were IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8 and suPAR, while the sTLR-2, sTLR4 and  $\alpha$ -defensins were not statistically significantly different between the women with histological chorioamnionitis and the control group.

TNF- $\alpha$  and MMP-8 showed the highest diagnostic values of all the immunological markers that were tested. The relative risk of TNF- $\alpha$  in the multivariate analysis was 1.02 (95% CI: 1.01–1.06), o MMP-8 – 1.03 (95% CI: 1.01–1.04). The AUC values for TNF- $\alpha$  and MMP-8 (0.91 and 0.89) were statistically significantly higher than for all other markers, but were not statistically significantly different from each other. In our study, the optimal cutoff value for TNF- $\alpha$  was 21.17 pg/ml, with a sensitivity of 88% and a specificity of 84%, and the optimal cutoff value for MMP-8 was 172.53 ng/ml, with a sensitivity of 80% and a specificity of 87%. Thomakos et al. studied the amniotic fluid collected by amniocentesis in 2001 and found that TNF- $\alpha$  > 6.3 pg/ml (sensitivity 7.8%, specificity 70.1%) was associated with a positive amniotic fluid culture. Meanwhile, Kayem et al. evaluated TNF- $\alpha$  in non-invasively collected amniotic fluid and found a sensitivity of 47% and a specificity of 81% in predicting clinical chorioamnionitis for TNF- $\alpha$  concentration > 50  $\mu$ g/l.

In their 2001 study, Park et al. set the optimal cutoff value for MMP-8 in amniotic fluid samples collected by amniocentesis at 23 ng/ml, with a sensitivity of 90% and a specificity of 78%. Mynti et al. found a slightly higher optimal value for MMP-8 in 2016 (41.5 mg/ml), with a sensitivity up to 100% but a specificity of 69%. However, Holmström et al. presented contradictory data: their study showed that there was no difference in MMP-8 concentrations in the amniotic fluid between women with and without intra-

amniotic infections. Nonetheless, only 25 women diagnosed with PPRM were included in that study, and only 10 of those cases were diagnosed with an intra-amniotic infection.

In our study, IL-6 was also a statistically significant marker in the diagnosis of histological chorioamnionitis, but with lower prognostic values than TNF- $\alpha$  or MMP-8. IL-6 increases from dozens to hundreds of times during inflammation, so a 1 unit change in the IL-6 concentration does not significantly change the risk of chorioamnionitis. The relative risk of IL-6 was found to be 1.0001 (95% CI: 1.0002–1.002), with an AUC of 0.81, which is statistically significantly lower than for TNF- $\alpha$  and MMP-8. The optimal cut-off value was set at 1,389.82 pg/ml with a sensitivity of 88% and a specificity of 70%. Chaiyasit et al. reported, just as we did in our study, that MMP-8 has a better prognostic value than IL-6 in diagnosing chorioamnionitis. In their study, Kacerovsky et al. evaluated the IL-6 concentration in non-invasively collected amniotic fluid and found an optimal cut-off value for the diagnosis of chorioamnionitis of 2,500 pg/ml, with a sensitivity and a specificity of 91%. However, this study differed from our study because cases with PPRM between 34 and 37 weeks of gestational age were included. Another study, which was the most similar in structure to ours, was conducted by Kunze et al. in 2016 and included women diagnosed with PPRM between 23 and 33 weeks of gestational age. The optimal cut-off value for IL-6 in their study was set at 1,000 pg/ml. In this case, the methodology of the study varied from ours because amniotic fluid was collected using sanitary packets and the amniotic fluid was squeezed out with a garlic press.

In our study, we also observed statistically significant diagnostic values for non-invasively collected amniotic fluid suPAR in the diagnosis of histological chorioamnionitis. The calculated AUC was 0.78 was statistically significantly lower than TNF- $\alpha$  and MMP-8, but was similar to IL-6. No studies analysing the levels of this marker in amniotic fluid have been published, but Cekmez et al. found in their 2013 study that the sensitivity and specificity of the serum uPAR assay for the diagnosis of histological chorioamnionitis was similar to that of IL-6.

Soluble TLR-2 and TLR-4 did not show statistically significant results in the diagnosis of histological chorioamnionitis in our study. Kacerovsky et al. analysed the levels of sTLR-2 in cervical and vaginal secretions in another study, and their findings also showed that sTLR-2 had no statistically significant prognostic value in the diagnosis of histological chorioamnionitis. No other studies have been published examining the sTLR-4 levels in non-invasively collected amniotic fluid or vaginal secretions. In the amniotic fluid collected during amniocentesis, sTLR-2 and sTLR-4 showed statistically

significant results in the diagnosis of histological chorioamnionitis. The optimal cutoff value for sTLR-2 was 222.7 ng/ml with a sensitivity of 63% and a specificity of 98%.

The  $\alpha$ -defensins also had no statistically significant results in the histological diagnosis of chorioamnionitis in our study. Controversial data was reported by Lucovnik et al., who also analysed the levels of defensins in non-invasively collected amniotic fluid, but only 42 pregnant women (29 of whom were diagnosed with histological chorioamnionitis) with preterm premature rupture of the membranes by 32 weeks of gestation were included in that study. In their study, the defensin levels were also statistically significantly higher in the histological chorioamnionitis group than in the group without infection. When assessing the prognostic value of  $\alpha$ -defensins in the amniotic fluid collected by amniocentesis, the estimated sensitivity of  $\alpha$ -defensins for the diagnosis of histological chorioamnionitis was 86.4%, while the specificity ranged from 70.6 to 88.2%.

Some factors that may account for the different results of the inflammatory markers in amniotic fluid in different studies are as follow:

1. Different techniques for the amniotic fluid collection. In North America, it is routine to use amniocentesis to collect amniotic fluid when chorioamnionitis is suspected. Amniocentesis does not contaminate the vaginal flora, so the levels of inflammatory markers in the amniotic fluid are lower than during the vaginal collection of amniotic fluid. Researchers in European countries are performing more tests by a non-invasive collection of amniotic fluid, but there are still different methods of collecting the amniotic fluid: some researchers collect the amniotic fluid vaginally using tampons or sanitary pads, while others collect the amniotic fluid using a sterile vaginal speculum or a special collector (e.g. the *Yoon* Amniotic Fluid Collector).
2. Different techniques for the amniotic fluid collection. Some investigators collected amniotic fluid daily but, in order to improve the correlation between the histological examination of the placenta and the results of the analysis of the amniotic fluid, only the samples taken closest to the time of delivery were included in the analysis. Other authors have analysed the amniotic fluid several times a week and included the last amniotic fluid sample in the analysis, regardless of the length of time before delivery. Therefore, in different studies, the rupture to delivery interval between the collection of amniotic fluid and the delivery varies from a few hours to dozens of hours. In cases where the period from the collection of amniotic fluid to the



delivery is longer than 48 hours, the correlation between inflammatory markers in the amniotic fluid and histological chorioamnionitis may be misinterpreted. When amniotic fluid is collected at the time of the first birth, the concentration of inflammatory markers may be elevated as a result of the birth process itself.

3. Different methods for preparing and storing the amniotic fluid. It is recommended to centrifuge the amniotic fluid before running the ELISA assay. However, there is no generally accepted methodology for the preparation of amniotic fluid, so the centrifugal force may vary. Similarly, some researchers analyse freshly-collected amniotic fluid, while others freeze it and analyse the amniotic fluid only after they form a relevant group of samples. Different methods of preparation and storage of the amniotic fluid may lead to different values of the immunological markers in individual studies.
4. Different gestational age. The groups of subjects are often formed by selecting women with different gestational ages. Most commonly, women with preterm pregnancies from 22<sup>+0</sup> or 23<sup>+0</sup> to 33<sup>+6</sup> weeks are included in the studies, but other authors include all pregnant women up to 36<sup>+6</sup> weeks, or from 34<sup>+0</sup> to 36<sup>+6</sup> weeks of gestation. The levels of inflammatory markers can vary depending on the gestational age, so studies involving women with different gestational ages may have different results.
5. Different groups of subjects. Some researchers have included all pregnant women diagnosed with preterm birth, while others have included only preterm births when PPRM is diagnosed. Some researchers apply exclusion criteria to women diagnosed with gestational diabetes, gestational hypertension, foetal malformations or placental abnormalities, while other researchers include all women without applying these exclusion criteria. Similarly, some researchers included only singleton pregnancies, while others included both singleton and multiple pregnancies. Pathologies detected during pregnancy can alter the levels of inflammatory markers in the amniotic fluid, so the findings of the studies with different inclusion and exclusion criteria may differ.
6. Different diagnoses of chorioamnionitis. Some researchers categorised the subjects into groups based on histological or microbiological findings, while others based the groups on biochemical changes in the amniotic fluid found so far. The biochemical markers have been extensively studied, but there is no

single clear cut-off value for any inflammatory marker and no agreed methodology for an amniotic fluid test. A microbiological test is considered to be one of the most accurate tests for the diagnosis of chorioamnionitis in pregnancy, and histological chorioamnionitis is the gold standard for the diagnosis of postpartum intraamniotic infection. Different diagnostic criteria for chorioamnionitis can lead to different groups of subjects with different levels of immunological markers.

7. Immunological marker assays are also carried out using different methods and reagents. The studies usually refer to the use of an ELISA assay for the detection of immunological markers, but the names of the commercial kits are not always included. Furthermore, the sensitivity of different reagents may vary, so when different reagents are used to detect the same immunological marker, the values may be insignificantly different from each other.

In our study, we also evaluated the diagnostic potential of histological chorioamnionitis by assessing inflammatory changes in the maternal blood in conjunction with changes in immunological markers in the amniotic fluid. Two inflammatory markers with the best diagnostic values in the maternal blood (CRP and NLR) and amniotic fluid (TNF- $\alpha$  and MMP-8) were selected. Using these four markers, four models were developed: CRP + TNF- $\alpha$ , CRP + MMP-8, NLR + CRP and NLR + MMP-8. All of the models showed statistically significantly higher predictive values than the single CRP score, but only one model (NLR + MMP-8) showed statistically significantly higher predictive values than the single NLR score. Neither model was statistically significantly different from the individual immunological markers MMP-8 and TNF- $\alpha$  in the amniotic fluid. TNF- $\alpha$  had the highest diagnostic values for the amniotic fluid markers alone, but MMP-8 had higher diagnostic values in the model in combination with inflammatory markers in the maternal blood. This was because TNF- $\alpha$  and inflammatory markers in the blood have a similar sensitivity and specificity for the diagnosis of histological chorioamnionitis, and MMP-8 remains more sensitive than other markers as the specificity decreases.

### 5.1. Advantages of the study

1. Our study is one of the largest of the published studies to analyse the levels of IL-6, MMP-8, TNF- $\alpha$ ,  $\alpha$ -defensins and TLR-2 in non-invasively collected amniotic fluid.

2. This is the first published study to assess the TLR-4 and suPAR concentrations in non-invasively collected amniotic fluid. This is also the first published study to evaluate the value of NLR for the diagnosis of chorioamnionitis in PPRM up to 34 weeks of gestational age.
3. The women were grouped only by a statistical analysis of the data, so the results of the inflammatory markers analysed did not influence the testing and treatment tactics.
4. All immunological tests of the amniotic fluid were performed by one immunologist and pathohistological analysis were performed by one pathologist.

## 5.2. Disadvantages of the study

1. The amniotic fluid collected in this study was centrifuged, fractionated and frozen at -80 °C. Immunological tests were only carried out after an adequate number of samples had been collected to fill the test plates. Kacerovsky et al. have presented data illustrating a strong direct correlation between immunological marker concentrations in freshly-collected and frozen amniotic fluid, but this sample preparation and storage method may have had an impact on the results for the inflammatory markers.
2. In our study, we chose placental and foetal membrane histological examinations to diagnose chorioamnionitis. This method of diagnosing chorioamnionitis is considered the gold standard for the diagnosis of intrauterine infection, but there are studies showing that histological chorioamnionitis is of questionable relevance to neonatal outcomes.

## 6. CONCLUSIONS

1. NLR has higher diagnostic values than the assessment of leukocyte count and CRP in the diagnosis of histological chorioamnionitis, but no statistically significant difference was observed between NLR and CRP.

2. IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-8 and suPAR in non-invasively collected amniotic fluid are statistically significant diagnostic markers of histological chorioamnionitis. sTLR-2, sTLR-4 and  $\alpha$ -defensins - are not statistically significant markers. The best diagnostic value for histological chorioamnionitis have TNF- $\alpha$  and MMP-8.

3. The optimal values of inflammatory markers of maternal blood and amniotic fluid for the diagnosis of chorioamnionitis have been determined:

3.1. Optimal cut-off values of inflammatory markers in the blood in the diagnosis of histological chorioamnionitis:

- NLR – 5.97 (sensitivity 77%, specificity 95%);
- CRP – 8.56 mg/l (sensitivity 77%, specificity 84%);

3.2. Optimal cut-off values of inflammatory markers in the amniotic fluid in the diagnosis of histological chorioamnionitis:

- IL-6 – 1,389.82 pg/ml (sensitivity 88%, specificity 70%);
- TNF- $\alpha$  – 21.17 pg/ml (sensitivity 88%, specificity 84%);
- MMP-8 – 172.53 ng/ml (sensitivity 80%, specificity 87%);
- SuPAR – 30.08 mcg/ml (sensitivity 63%, specificity 85%).

4. Evaluation of CRP with MMP-8 or TNF- $\alpha$  and NLR with MMP-8 showed a statistically significantly higher diagnostic values than evaluation of CRP or NLR alone.

## 7. PRACTICAL RECOMMENDATIONS

### 1. Clinical diagnosis of chorioamnionitis:

- An additional assessment of the NLR is recommended;
- $\text{NLR} > 5.97$  is recommended to be assessed as an increased risk of chorioamnionitis;
- Assess the NLR no earlier than 48 hours after the last dose of corticosteroids.

### 2. If possible, an immunological analysis of the amniotic fluid should be carried out:

- It is recommended to vaginally collect amniotic fluid in a non-invasive way using a sterile vaginal speculum;
- It is recommended to test the immunological markers MMP-8 and TNF- $\alpha$  in the amniotic fluid;
- MMP-8 levels  $> 172.53$  ng/ml and TNF- $\alpha$  levels  $> 21.17$  pg/ml should be considered as an increased risk of chorioamnionitis.

### 3. To improve the prediction of chorioamnionitis, it is recommended to assess inflammatory markers in the maternal blood and amniotic fluid together.

## 8. LIST OF PUBLICATIONS AND PRESENTATIONS

### 8.1. Articles on the topic of the dissertation

1. Balciuniene G, Kvederaite-Budre G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Neutrophil-lymphocyte ratio for the prediction of chorioamnionitis in cases of preterm premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2021;21:656.

2. Balciuniene G, Kvederaite-Budre G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. A Value of Soluble Toll-Like Receptor 2 and 4 in Vaginally Obtained Amniotic Fluid for the Prediction of Chorioamnionitis. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 2021.

3. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Bartkeviciene D, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Prognostic Markers for Chorioamnionitis: IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-8 in Vaginally Obtained Amniotic Fluid. *Amniotic Fluid. J Clin. Med.* 2021;10:1136.

4. Balčiūnienė G, Kvederaitė-Budrė G, Gulbinienė V, Pilypienė I, Drasutienė GS, Ramašauskaitė D. Antenatalinė chorioamnionito diagnostika. *Lithuanian Obstetrics and Gynaecology*. 2021;3:190-194

5. Balciuniene G, Jakubauskiene L, Drasutiene GS, Meskauskiene A, Ramasauskaite D. The significance of amniotic fluid immunological analysis for the prediction of intrauterine infection. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2020;47:810-813.

### 8.2. Articles other than on the subject of the dissertation

1. Balciuniene G, Balciunas L, Jakubauskiene L, Ramasauskaite D, Serpytis M, Gumbiene L, Dementaviciene J. Massive postpartum pulmonary embolism successfully treated with v-a-v ECMO: a case report. *J Obstet Gynaecol.* 2020;17:1-3.

2. Gricius R, Balciuniene G, Jakubauskiene L, Ramasauskaite D. The Significance of Endometrial Scratching for Clinical Pregnancy Rate in Long Agonist and Antagonist Protocols. *Medicina*: 2019;55:527.

3. Vasilevska D, Balciuniene G, Andreicik J, Semczuk A, Silkunas M, Rudaitis V. Hysterectomies for Benign Pathology: Seven-Year Experience of a Single Tertiary Care Institution. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2018;6:901-904.

4. Kvederaitė-Budrė G, Balčiūnienė G, Gaupšienė A, Meškauskienė A, Ramašauskaitė D. Naujagimio gimimo svorio reikšmė žindymo sėkmei. *Lithuanian Obstetrics and Gynaecology*. 2021;24:17-21.

5. Gulbinienė V, Pilypienė I, Navarackaitė I, Dauengauer-Kirlienė S, Balčiūnienė G, Ramašauskaitė D. Bevandenio laikotarpio trukmės įtaka neišnešiotų naujagimių, gimusių 24–32 gestacijos savaitę, baigtims. *Lithuanian Obstetrics and Gynaecology*. 2020;23:26-32

6. Butkevičiūtė A, Ramašauskaitė D, Matuolytė A, Balčiūnienė G. Sužadinto gimdymo užbaigimo skubia cezario pjūvio operacija prognozės vertinimas. *Lithuanian Obstetrics and Gynaecology*. 2020;23:104-110

### 8.3. Presentations on the topic of the dissertation

1. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Predictive Value of suPAR on Chorioamnionitis Sydney. World Congress 2021. 25-28 October 2021. Sydney, Australia.

2. Gulbiniene V, Balciuniene G, Petroniene J, Viliene R, Dumalakiene I, Pilypiene I, Ramasauskaite D. The Significance of TNF- $\alpha$ , MMP-8 Concentrations in Non-Invasively Obtained Amniotic Fluid Predicting Fetal Inflammatory Response Syndrome. World Congress 2021. 25-28 October 2021. Sydney, Australia.

3. Balciuniene G, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Viliene R, Pilypiene I, Drasutiene GS, Ramasauskaite D. Neutrophil-Lymphocyte Ratio for the Prediction of Chorioamnionitis. 27<sup>th</sup> EBCOG Conference. 2-4 September 2021. Athens, Greece.

4. Gulbiniene V, Balciuniene G, Petroniene J, Viliene R, Dumalakiene I, Pilypiene I, Ramasauskaite D. The Significance of Epidermal Growth Factor Concentrations in Non-Invasively Obtained Amniotic Fluid Predicting Respiratory Outcomes of Preterm Neonates. 27<sup>th</sup> EBCOG Conference. 2-4 September 2021. Athens, Greece.

5. Balciuniene G, Drasutiene GS, Girkontaite I, Zinkeviciene A, Dumalakiene I, Ramasauskaite D. Significance of Immunological Markers in Vaginally Obtained Amniotic Fluid in Predicting Intrauterine Inflammation. 11<sup>th</sup> World Conference on Gynecology, Obstetrics and Women's Health. 22-23 June 2020. Prague, Czechia.

6. Balciuniene G, Ramasauskaite D, Drasutiene GS, Pilypiene I, Gulbiniene V, Bartkeviciene D, Dumalakiene I. Significance of TNF- $\alpha$  and RANTES Concentration in Vaginally Obtained Amniotic Fluid In Predicting

Fetal Inflammatory Response Syndrome. ECIC Congress. 14-16 March 2019. Turin, Italy.

7. Gulbiniene V, Pilypiene I, Petroniene J, Balciuniene G, Ramasauskaite D, Dumalakiene I. The Association between TNF- $\alpha$  in Non-Invasively Obtained Amniotic Fluid and Major Outcomes in Preterm Infants. 4<sup>th</sup> Baltic Paediatric Congress. 16-18 May 2019. Vilnius, Lithuania

8. Balciuniene G, Drasutiene GS, Pilypiene I, Gulbiniene V, Dumalakiene I, Bartkeviciene D, Ramasauskaite D. The Prognostic Values of Vaginally Obtained Amniotic Fluid IL-6 and TNF- $\alpha$  for Fetal Inflammatory Response Syndrome. BIRTH congress “Clinical Challenges in Labor and Delivery“. 15-17 November 2018. Venice, Italy.

#### 8.4. Presentations other than on the topic of dissertation

1. Balciuniene G, Tutukova V, Ramasauskaite D, Drasutiene G S. Quantative Ultrasound Analysis of Fetal Lung Maturity to Predict Neonatal Respiratory Morbidity. Evolutionary Medicine: Health and Diseases in a Changing Environment. 5-10 June 2018. Vilnius, Lithuania

2. Balciuniene G, Balciunas L, Morozovaite L, Ramasauskaite D, Serpytis M, Gumbiene L. Massive Postpartum Pulmonary Embolism Successfully Treated with v-a ECMO: A Case Report. European Clinical Case Reports Congress. 21-22 April 2018. Vienna, Austria.

#### 8.5. Other publications

1. Balčiūnienė G, Mickevičiūtė D, Praninskienė R, Vingras A, Žilinskaitė V (2020). Pregnancy. Delivery. First Year of Life. Kaunas: Vitae Litera.

### 9. FINANCIAL SUPPORT

The research was supported by the Lithuanian Research Council as a research group project (No. S-MIP-19-57) and the Vilnius University Faculty of Medicine.

For her academic achievements in 2021, Doctoral student Greta Balčiūnienė was awarded a scholarship by the Lithuanian Research Council (Registration No. P-DAP-21-145, Order No. V-472).



## PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti visiems, prisidėjusiems prie šio tyrimo atlikimo.

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovei prof. Gražinai Stanislavai Drąsutienei už pasitikėjimą, padaršinimą ir galimybę artimiau pažinti mokslą.

Iš visos širdies esu dėkinga prof. Dianai Ramašauskaitei už visapusišką pagalbą, nuolatinį konsultavimą, vertingas idėjas, nuoširdumą ir palaikymą. Esu dėkinga už galimybę dirbti kartu su prof. D. Ramašauskaite, kuri yra man ryškus pavyzdys tiek mokslinėje veikloje, tiek gyvenime.

Dėkoju doc. Irenai Dumalakienei už preciziškai atliktus imunologinius vaisiaus vandenų tyrimus, už pagalbą ir bendradarbiavimą. Dėkoju už šiltą bendravimą, vertingas pastabas ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas.

Dėkoju Ritai Vilienei už pagalbą renkant vaisiaus vandenų mėginius bei atliekant imunologinę vaisiaus vandenų analizę. Esu dėkinga už nuoširdumą ir visuomet šiltą šypsena.

Nuoširdžiai dėkoju Naujagimių skyriaus vedėjai doc. Ingridai Pilypienei ir gydytojai Violetai Gulbinienei už bendradarbiavimą, pagalbą formuojant tiriamųjų grupes, rengiant pranešimus ir mokslines publikacijas.

Nuoširdžiai dėkoju visoms tyrime dalyvavusioms moterims, be kurių šis tyrimas nebūtų įvykęs. Jų indėlis į mokslinę veiklą yra labai svarbus ir vertingas.

Ačiū visam Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Akušerijos skyriaus kolektyvui už pagalbą formuojant tiriamųjų grupes ir palaikymą. Esu laiminga ir dėkinga galėdama būti Jūsų kolektyvo dalimi.

Esu dėkinga Lietuvos mokslo tarybai ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetui už finansinę pagalbą atliekant mokslinį tyrimą, publikuojant straipsnius ir pristatant mūsų tyrimą tarptautinėse konferencijose.

Dėkoju recenzentėms Aušrinei Barakauskienei, Daliai Laužikienei, Ginai Opolskienei už skirtą laiką ir vertingas pastabas.

Iš visos širdies dėkoju savo vyrui Lukui Balčiūnui už tikėjimą manimi, besąlygišką palaikymą ir padaršinimą. Esu dėkinga savo vaikams Olivijai Balčiūnaitei ir Pijui Balčiūnui už kantrybę ir galimybę dalį laiko skirti mokslui. Labai Jūsų ašiprašau už kiekvieną akimirką, kuomet negalėjau būti šalia.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 20 egz.