

На правах рукописи

ГАНИЧКИНА
Мария Борисовна

**ДИАГНОСТИКА ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА
НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ
РЕГУЛИРУЮЩИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС МИКРОРНК И
МАРКЕРОВ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ**

Специальность: 14.01.01 – акушерство и гинекология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
кандидат медицинских наук

Кан Наталья Енкиновна
Гусар Владислава Анатольевна

Официальные оппоненты:

Панова Ирина Александровна – доктор медицинских наук, доцент, ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России, отдел акушерства и гинекологии, заведующая

Мурашко Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра акушерства и гинекологии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, профессор кафедры

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита состоится «26» января 2021 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте:

<http://www.science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Ganichkina%20M.B.-%20disser.pdf>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Задержка роста плода (ЗРП) – актуальная проблема современного акушерства, занимающая одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости и смертности [Долгушина Н.В. и соавт., 2016; Игнатко И. В. и соавт., 2017; Сухих Г.Т. и соавт., 2018; Lees C.C. et al., 2020]. ЗРП оказывает влияние не только на внутриутробное состояние плода, но и на последующее развитие ребёнка, определяя уровень его здоровья на протяжении жизни [Стрижаков А.Н. и соавт., 2016; Crispi F. et al., 2018; Priante E. et al., 2019].

Ранняя форма ЗРП, встречающаяся в 20-30% случаев, характеризуется наиболее неблагоприятными перинатальными исходами [Ходжаева З.С. и соавт., 2018; Tay J. et al., 2018]. При этом ряд авторов отмечают, что при поздней форме ЗРП, составляющей 70-80% наблюдений, сохраняется высокий риск антенатальной гибели плода [Долгушина В.Ф. и соавт., 2020; Figueras F. et al., 2018; Caradeux J. et al., 2019; Seravalli V. et al., 2019].

Известно, что в 75% случаев задержка роста плода остается невыявленной вплоть до родоразрешения и данный диагноз ставится постнатально [Дегтярева Е.А. и соавт., 2018; Burton G.J. et al., 2018; Diksha P. et al., 2018; Giabicanì E. et al., 2018]. Принимая во внимание взаимосвязь состояния новорожденных со сроком манифестации ЗРП определение ее формы имеет немаловажное значение в прогнозе неблагоприятных перинатальных исходов [Кан Н.Е. и соавт., 2019; Nawathe A. et al., 2017; Veksac M.S. et al., 2019; Inácio Q.A.S. et al., 2019]. В настоящее время не существует надежных диагностических маркеров ЗРП, что связано с полиэтиологичностью данного осложнения беременности. Учитывая недостаточную предиктивную ценность клинических и инструментальных методов исследования перспективным является поиск молекулярно-генетических и биохимических маркеров ЗРП.

В основе больших акушерских синдромов, в том числе ЗРП, лежит нарушение баланса про- и антиоксидантной систем, приводящее к формированию неконтролируемого окислительного стресса [Высоких М.Ю. и соавт., 2017; Cuffe J.S. et al., 2017; Schoots M.H. et al., 2018]. Регуляция последнего находится под контролем эпигенетических механизмов – метилирования ДНК, модификации гистонов и малых некодирующих молекул микроРНК (мкРНК) [Дворецкая Ю.Д. и соавт., 2018; Береснева О.Н. и соавт., 2019; Awamleh Z. et al., 2019]. Ряд исследователей указывают на роль последних в патогенезе ЗРП и формировании неблагоприятных перинатальных исходов [Забанова Е.А. и соавт., 2019; Hu X-Q. et al., 2019; Gusar V. et al., 2020]. Однако данные по изучению мкРНК-зависимой модуляции экспрессии генов, отвечающих за работу окислительно-восстановительного гомеостаза при данном осложнении беременности немногочисленны [Мурашко А.В. и соавт., 2018; Östling H. et al., 2019; Meng M. et al., 2020]. В связи с чем актуальным представляется изучение роли окислительного стресса и связанных с ним мкРНК в реализации ЗРП, что позволит выделить новые диагностические маркеры данной патологии.

Степень разработанности темы исследования

Этиопатогенетические механизмы развития ЗРП остаются до конца не изученными. Окислительный стресс запускает целый каскад реакций, регуляция которых осуществляется на генетическом и эпигенетическом уровнях. Роль мкРНК как модуляторов значительного числа биологических процессов, связанных, в том числе с регуляцией нормального развития плаценты и ее дисфункцией, активно изучается в последнее время [Пакин В.С. и соавт., 2017; Nayder H. et al., 2018; Cai M. et al., 2019; Addo K.A. et al., 2020]. Определены классы функционально специфичных мкРНК, в частности, трофо- и гипоксамиры, мкРНК, ассоциированные с окислительным стрессом [Sadovsky Y. et al., 2015; Bertero T. et al., 2017; Engedal N. et al., 2018]. Однако исследования паттернов экспрессии последних проведены в основном на экспериментальных моделях

[Рождественский Л.М. и соавт., 2018; Meruvu S. et al., 2016; Tai L. et al., 2017; Cheng Ye. et al., 2019; Xiaorong H. et al., 2019]. На сегодняшний день не разработано ни одного теста для верификации ЗРП с достаточной чувствительностью и специфичностью, что обосновывает поиск специфичных маркеров, позволяющих улучшить качество диагностики данного осложнения беременности [Игнатко И.В. и соавт., 2016; Радзинский В.Е. и соавт., 2018; Caradeux J. et al., 2018; Morano D. et al., 2018].

Вышеизложенное послужило основой для проведения поиска маркеров, позволяющих улучшить качество пренатальной диагностики ЗРП.

Цель исследования

Оптимизация диагностики задержки роста плода на основе исследования маркеров функционального состояния про- и антиоксидантной систем и профилей экспрессии регулирующих их мкРНК.

Задачи исследования

1. Провести анализ клинико-anamnestических данных, результатов лабораторных и функциональных методов исследования у беременных с задержкой роста плода для выделения факторов риска.
2. Определить особенности течения беременности, родов, послеродового периода, состояния новорожденных при задержке роста плода.
3. Оценить уровень белковых маркеров окислительного стресса и уровень антиоксидантной защиты в плазме крови беременной, пуповинной крови, плаценте при задержке роста плода.
4. Исследовать профили экспрессии регулирующих окислительный стресс мкРНК в плазме пуповинной крови и плаценте при задержке роста плода.
5. Установить взаимосвязь между уровнем экспрессии значимых мкРНК, маркерами функционального состояния про- и антиоксидантной систем, клиническими и функциональными показателями.

6. Разработать алгоритм диагностики задержки роста плода с учетом ее патогенетических форм.

Научная новизна

Доказана роль клинических (хроническая артериальная гипертензия, миопия, варикозное расширение вен нижних конечностей) и анамнестических (медицинские аборт и преждевременные роды) факторов в риске формирования задержки роста плода.

Установлены различия в функциональном состоянии про- и антиоксидантной систем: при ранней задержке роста плода отмечается усиление окислительного стресса, при поздней форме – его снижение.

Выявлено разнонаправленное изменение уровня экспрессии miR-125b-5p, miR-221-3p, miR-574-3p, miR-451a в плаценте при задержке роста плода. Впервые показана связь повышенной экспрессии miR-125b-5p с усилением окислительного стресса, а сниженной экспрессии miR-221-3p – с ослаблением антиоксидантной защиты в плаценте при ранней задержке роста плода.

Сниженная экспрессия miR-451a при ранней форме ассоциирована с ослаблением антиоксидантной защиты, а при поздней – с повышением активности антиоксидантных ферментов. Повышенная экспрессия miR-574-3p – с усилением процессов окислительного повреждения при ранней и их ослаблением – при поздней задержке роста плода.

При поздней форме задержки роста плода повышенная экспрессия miR-451a в плазме пуповинной крови ассоциирована со снижением уровня окислительного стресса, что может указывать на ее протективную роль.

Теоретическая и практическая значимость

Обосновано определение клиничко-анамнестических факторов (хроническая артериальная гипертензия, миопия, варикозное расширение вен нижних конечностей; медицинские аборт и преждевременные роды в анамнезе) для выделения группы риска формирования задержки роста плода.

Дифференциальную диагностику ранней и поздней форм задержки роста плода целесообразно проводить с определением уровней малонового диальдегида (МДА), 4-гидроксиноненаля (4-ГН), глутатиона общего, окисленного, соотношения $\text{Глут}_{\text{восст.}}/\text{Глут}_{\text{ок.}}$, а также активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в плазме крови беременных.

Для оценки риска развития внутрижелудочкового кровоизлияния у новорожденных при ранней форме задержки роста плода показано определение в плазме пуповинной крови уровня экспрессии miR-125b-5p, при поздней форме – уровня экспрессии miR-125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p.

Разработанный алгоритм диагностики задержки роста плода с учетом ее патогенетических форм позволяет снизить неонатальные осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Положения, выносимые на защиту

1. К клиничко-анамнестическим факторам риска задержки роста плода относятся: хроническая артериальная гипертензия, миопия, варикозное расширение вен нижних конечностей, медицинские аборт и преждевременные роды. Задержка роста плода диагностируется антенатально в 80,5% случаев. Нарушение функционального состояния плода при ранней форме задержки роста выявляется в 3 раза чаще, чем при поздней.

2. Ранняя форма задержки роста плода сопровождается значимым повышением маркеров окислительного стресса на фоне снижения активности антиоксидантной системы, а поздняя – снижением уровня окислительного стресса. Модель логистической регрессии, включающая определение показателей функционального состояния про- и антиоксидантной систем в плазме крови беременной, позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью дифференцировать раннюю и позднюю формы задержки роста плода.

3. Ранняя и поздняя формы задержки роста плода характеризуются разнонаправленным изменением экспрессии регулирующих окислительный

стресс мкРНК. Модели логистической регрессии с высокой чувствительностью и специфичностью позволяют прогнозировать риск развития внутрижелудочкового кровоизлияния у новорожденных на основе определения в плазме пуповинной крови экспрессии miR-125b-5p – при ранней форме и miR-125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p – при поздней форме задержки роста плода.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы и дизайна исследования, обобщении литературных данных, посвященных проблеме задержки роста плода, анализе клинико-лабораторных данных пациенток, включенных в исследование, в ведении беременности, родоразрешении, сборе и обработке биологического материала.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2 и 4 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация результатов

Материалы исследования представлены на XIX Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2018» и VI Съезде акушеров-гинекологов России (Москва, 2018), XX Юбилейном Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2019» (Москва, 2019), 2nd World Congress on Gynecology and Obstetrics (Токио, 2019).

Работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (15 июня 2020 года, протокол № 21).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный алгоритм диагностики задержки роста плода с учетом ее патогенетических форм применяется в практической деятельности

акушерских отделений ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 212 страницах и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, приложения. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 32 таблицами. В список литературы входит 322 источника, 52 из которых – на русском, 270 – на иностранном языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Проведено ретроспективное исследование случай-контроль, в которое было включено 109 пациенток, родоразрешенных в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России за период с 2015 г. по 2018 г. В соответствии с критериями включения и невключения в исследование была отобрана 41 пациентка с ЗРП и 41 беременная – без ЗРП. Основная группа была разделена на 2 подгруппы. Подгруппу Ia составили 20 беременных с ранней формой ЗРП (до 34 недель беременности), подгруппу Ib – 21 пациентка с поздней ЗРП (после 34 недель).

Критериями включения в исследование явились: возраст 18-45 лет; одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле, в сроке 26-40 недель, наличие добровольного информированного согласия на участие в исследовании; для основной группы – беременность, осложнившаяся ЗРП, для группы сравнения – беременность без ЗРП.

Критериями невключения для обеих групп явились: тяжелая экстрагенитальная патология; беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий; преэклампсия; многоплодная

беременность; пороки развития плода; генетические и острые инфекционные заболевания матери.

Все пациентки были обследованы согласно приказу Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 01 ноября 2012 года №572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)».

В работе использованы общеклинические, лабораторные, инструментальные и специальные методы исследования. Для определения уровня экспрессии изучаемых мкРНК (miR-16-5p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-30b-5p, miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-182-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p, miR-451a, miR-574-3p) в ткани плаценты и плазме пуповинной крови проводили выделение суммарной РНК, включающей фракцию мкРНК, ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Для определения маркеров про- (МДА, 4-ГН) и антиоксидантной (глутатион, каталаза, СОД, ГП) систем в ткани плаценты, плазме крови беременной и пуповинной крови использовали полярографию, спектрофотометрию, электрофорез в полиакриламидном геле с вестерн-блоттингом. Результаты обследования вносились в специально разработанную тематическую карту и в электронные таблицы MS Excel. Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R, и программу RStudio, а также Microsoft Office Excel 2016 и пакеты прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoft Inc. (США).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Все беременные, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и массо-ростовым показателям. Анализ соматической заболеваемости не выявил статистически значимых отличий в исследуемых группах. Однако следует отметить преобладание хронической артериальной гипертензии (ХАГ) – 40,0% (OR=0,2; CI=0,1-0,7), миопии – 55,0% (OR=0,2;

CI=0,1-0,8) и варикозного расширения вен нижних конечностей – 25,0% в подгруппе с ранней ЗРП ($p \leq 0,05$).

При изучении акушерского анамнеза установлено, что у пациенток основной группы статистически значимо чаще отмечались искусственное прерывание беременности – 24,4% (OR=6,3; CI=1,3-30,8) и преждевременные роды – 14,6% ($p \leq 0,05$) в анамнезе. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые указывают на роль отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза в развитии ЗРП [Серов В.Н., 2005; Орлов А.В. и соавт., 2016; Малышкина А.И. и соавт., 2019; Unterscheider J. et al., 2014; Manandhar T. et al., 2018; Mohammad N. et al., 2019].

При изучении течения беременности было выявлено преобладание в основной группе гестационной артериальной гипертензии – 39,0% (OR=0,1; CI=0,01-0,6) и маловодия – 63,4% (OR=5,1; CI=2-13,1) в III триместре ($p \leq 0,05$). В нашем исследовании диагноз задержки роста плода антенатально при УЗИ был установлен в 80,5% случаев, что согласуется с результатами других исследований [Маркин Л.Б. и соавт., 2018; Ярыгина Т.А. и соавт., 2020 г.; Milner J. et al., 2018; Green V. et al., 2020; Warrander L.K. et al., 2020]. В связи с вышеизложенным особое внимание было уделено оценке показателей доплерометрии как одному из достоверных методов оценки состояния фетоплацентарного комплекса. В основной группе наблюдались нарушения маточно-плацентарного кровотока (МПК) в 17,1% случаев, фетоплацентарного кровотока (ФПК) – в 14,6% и их сочетание – в 51,2% ($p \leq 0,05$). При ранней ЗРП в 80,0% случаев отмечены сочетанные изменения МПК и ФПК, в 20,0% – нарушения ФПК. В то время как при поздней форме сочетанные нарушения выявлены в 23,9%, изолированные – МПК в 33,3%, ФПК – в 9,5% ($p \leq 0,05$). В 33,3% наблюдений изменений при доплерометрии выявлено не было.

Большинство пациенток основной группы были родоразрешены путем операции кесарева сечения – 90,2% (OR=0,2; CI=0,1-0,7; $p \leq 0,05$). При этом

превалирующим показанием явилось ухудшение состояния плода по данным функциональных методов обследования – 74,5%.

Особый интерес представляло изучение особенностей течения раннего неонатального периода. У новорожденных с задержкой роста отмечена более высокая частота экстремально низкой массы тела (ЭНМТ) при рождении – 26,8% (OR=0,1; CI=0,01-1,0); врожденной пневмонии – 56,1% (OR=0,3; CI=0,1-0,8), некротизирующего энтероколита (НЭК) – 17,1%, ДВС-синдрома – 19,5% (OR=0,1; CI=0,01-0,9) и внутрижелудочкового кровоизлияния (ВЖК) – 39,0% (OR=0,1; CI=0,02-0,4) ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что при ранней задержке роста плода наиболее часто встречались – ДВС-синдром – 35,0% (OR=0,1; CI=0,01-0,9), ВЖК – 65,0% (OR=0,1; CI=0,01-0,3) и НЭК – 30,0%, а при поздней – врожденная пневмония – 23,8% ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования выявили ряд особенностей клиничко-анамнестических данных, течения беременности, родов и неонатального периода при ЗРП. В связи с чем для уточнения их вклада и взаимосвязи с формированием данного осложнения был проведен статистический анализ с использованием критериев Пирсона (χ^2) и Крамера (V). Анамнестическими факторами риска развития ЗРП являются: медицинские аборт ($V=0,2$; $p \leq 0,05$) и преждевременные роды ($V=0,2$; $p \leq 0,05$). К клиническим факторам риска относятся: хроническая артериальная гипертензия ($V=0,3$; $p \leq 0,05$), миопия ($V=0,3$; $p \leq 0,05$), варикозное расширение вен нижних конечностей ($V=0,3$; $p=0,05$). Выделенные факторы риска позволяют сформировать группу пациенток, угрожаемых по развитию ЗРП. Однако, принимая во внимание их недостаточную предиктивную способность, перспективным представляется изучение молекулярно-генетических механизмов формирования данного осложнения беременности.

Учитывая роль окислительного стресса, лежащего в основе больших акушерских синдромов, в том числе ЗРП, для оценки степени его выраженности было изучено функциональное состояние про- и

антиоксидантной систем матери и плода. Принимая во внимание различный патогенез ранней и поздней ЗРП, оценка проводилась с учетом ее форм.

При ранней ЗРП отмечается выраженный окислительный стресс при сниженной антиоксидантной активности в плаценте, плазме крови беременной и пуповинной крови. При поздней ЗРП выявлен низкий уровень окислительного стресса на фоне повышенной активности антиоксидантных ферментов в плацентарной ткани, а также усиление антиоксидантной защиты в плазме пуповинной крови, что может указывать на меньшую подверженность риску окислительных повреждений у новорожденных с ЗРП, родившихся после 34 недели, ввиду адекватного антиоксидантного ответа и лучшей неонатальной адаптации. В плазме крови пациенток показатели окислительного стресса и антиоксидантной защиты были ниже порогового уровня, что, вероятно, свидетельствует о сниженном общем защитном потенциале беременной (рис. 1).

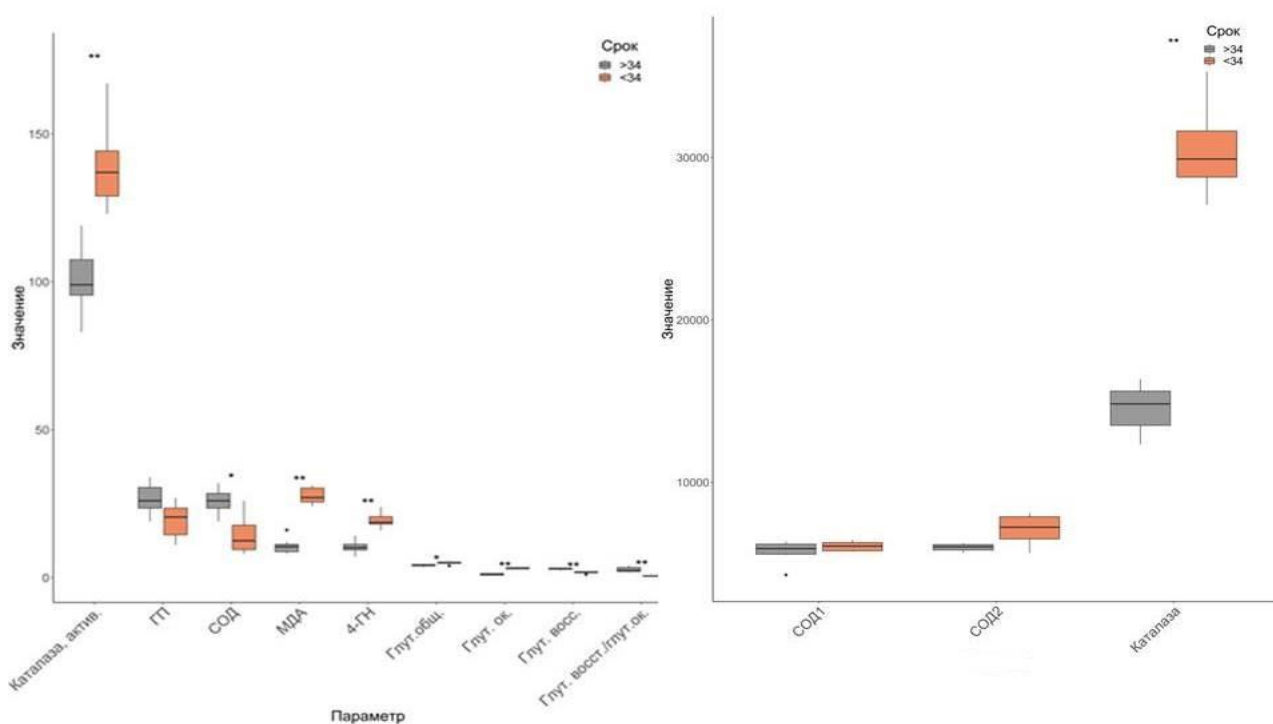


Рисунок 1. Бокс-диаграмма уровней маркеров окислительного стресса, активности и содержания антиоксидантов в плазме крови беременных в группе с ранней и поздней ЗРП.

* – p-value < 0,05; ** – p-value < 0,01; *** – p-value < 0,001.

Важным является определение сроков манифестации ЗРП ввиду различных по степени тяжести перинатальных исходов. Так, по мнению Н.Е. Кан и соавт. (2019), F. Figueras и соавт. (2019), E. Morsing и соавт. (2020) пролонгирование беременности при ранней ЗРП повышает риск неблагоприятных перинатальных исходов. С целью оценки возможности диагностики ранней и поздней форм ЗРП на основе определения показателей функционального состояния про- и антиоксидантной систем в плазме крови беременной была разработана модель логистической регрессии:

$$D = \frac{e^{-66.19+0.4838*MDA+18.62*GO-7.98*GC+8.392*GR-0.369*SOD+1.223*GN+0.0007932*KAT+0.08244*KA}}{1 + e^{-66.19+0.4838*MDA+18.62*GO-7.98*GC+8.392*GR-0.369*SOD+1.223*GN+0.0007932*KAT+0.08244*KA}}$$

где MDA – малоновый диальдегид (нмоль/мл); GO – глутатион окисленный (нмоль/мл); GC – глутатион общий (нмоль/мл); GR – глутатион восстановленный/глутатион окисленный; SOD – активность супероксиддисмутазы (Ед/мл); GN – 4-гидроксиноненаль (нмоль/мл); KAT – содержание каталазы (у.е.); KA – активность каталазы (Ед/мл).

Если $D < 0,5$ – поздняя форма ЗРП (>34); если $D > 0,5$ – ранняя форма ЗРП (<34).

Согласно проведенному ROC-анализу, данная модель, обладающая высокой чувствительностью и специфичностью, может быть использована для дифференциальной диагностики ранней и поздней форм ЗРП.

Принимая во внимание полученные данные о различном характере изменений про- и антиоксидантной систем при ранней и поздней ЗРП, на следующем этапе были исследованы профили экспрессии мкРНК, ассоциированные с окислительным стрессом и эндотелиальной дисфункцией. Выявлено достоверное разнонаправленное изменение экспрессии мкРНК в плаценте: при ранней ЗРП – снижение экспрессии miR-221-3p и miR-451a, повышение экспрессии miR-125b-5p и miR-574-3p; при поздней ЗРП – снижение уровня экспрессии miR-451a и повышение miR-574-3p.

В плазме пуповинной крови при ранней ЗРП статистически значимых различий в уровнях экспрессии исследуемых мкРНК выявлено не было. При

поздней ЗРП уровень экспрессии miR-451a был достоверно выше ($p < 0,001$) (рис. 2).

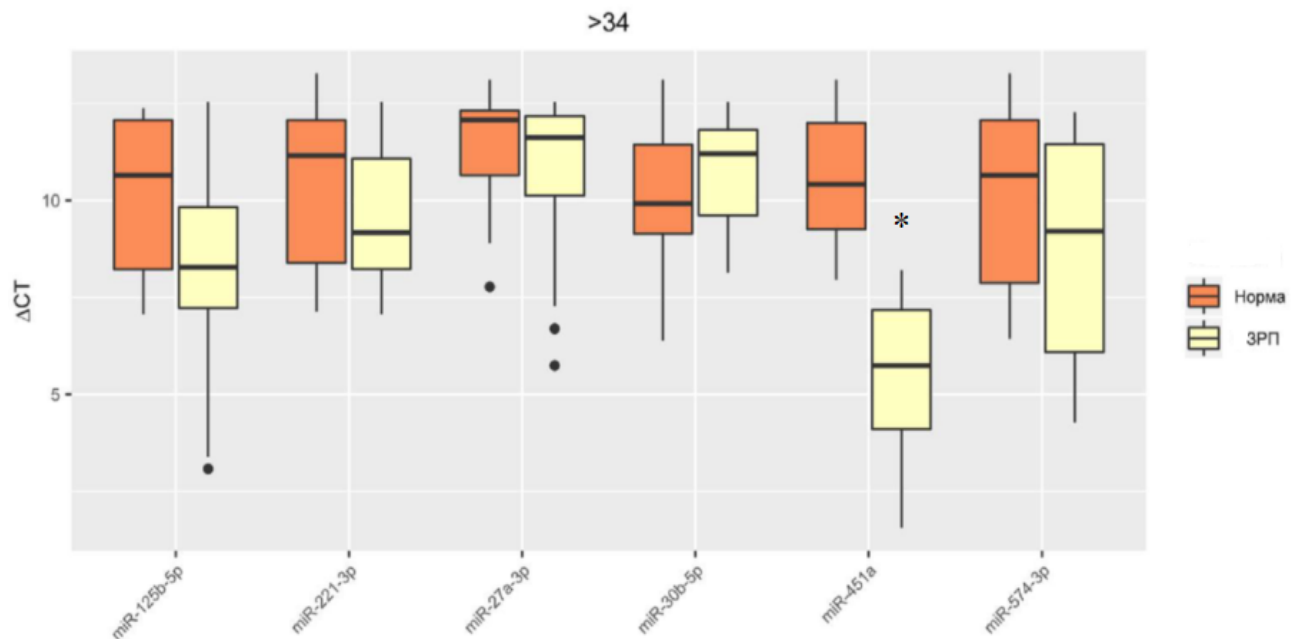


Рисунок 2. Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-125b-5p, miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-30b-5p, miR-451a и miR-574-3p в плазме пуповинной крови при поздней ЗРП.

* – уровень значимости $p \leq 0,05$ при сопоставлении с группой сравнения соответствующего срока гестации.

Был проведен корреляционный анализ для определения взаимосвязи между уровнем экспрессии значимых мкРНК и показателями функционального состояния про- и антиоксидантной систем. При ранней ЗРП увеличение экспрессии miR-125b-5p сопровождалось ростом уровня МДА ($r = -0,67$, $p < 0,01$), СОД2 ($r = -0,58$, $p < 0,04$) и каталазы ($r = -0,6$, $p < 0,03$), что может приводить к усилению окислительного стресса в плаценте. При увеличении содержания вышеуказанных ферментов, снижается их активность, а, следовательно, и уровень антиоксидантной защиты. Как было показано ранее, увеличение экспрессии miR-125b-5p приводит к сдвигу баланса между антиоксидантами и системами генерации свободных радикалов в сторону последних, посредством подавления указанной мкРНК экспрессии потенциальных генов-мишеней, в частности, транскрипционного

фактора NRF2 – инициатора транскрипции генов антиоксидантных белков [Высоких М.Ю. и соавт., 2019; Chen Y.F. et al., 2019].

Установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии miR-221-3p и содержанием СОД2 ($r=0,59$, $p<0,03$), окисленного глутатиона ($r=0,58$, $p<0,04$) и ГП ($r=-0,6$, $p<0,01$), то есть со снижением ее экспрессии в плацентарной ткани уровень антиоксидантной защиты также снижается. При исследовании механизмов развития атерогенеза X. Zhuang и соавт. (2018) было доказано, что окисленные липопротеины низкой плотности (ox-LDL) подавляют экспрессию miR-221-3p в клеточной линии, а воздействие иммитатора miR-221, напротив, ее повышает, что значительно снижает образование пенистых клеток из макрофагов, индуцированное ox-LDL. То есть, увеличение экспрессии miR-221-3p может обуславливать снижение окислительного стресса, что предполагает ее протективную функцию.

С уровнем экспрессии miR-451a достоверно коррелировали значения окисленной ($r=0,58$, $p<0,04$) и восстановленной формы ($r=-0,58$, $p<0,04$) неферментного антиоксиданта – глутатиона, а также соотношение $\text{Глут}_{\text{восст.}}/\text{Глут}_{\text{ок.}}$ ($r=-0,56$, $p<0,05$). При ранней ЗРП мы наблюдали снижение экспрессии miR-451a в плаценте, что свидетельствует об ослаблении антиоксидантной защиты. Согласно данным Q. Liu и соавт. (2018) увеличение экспрессии miR-451a индуцирует активность антиоксидантных ферментов, в том числе СОД, и снижает уровни АФК и МДА в нейронах путем таргетирования CELF2. D. Yu и соавт. (2010) описали протективное влияние miR-451a по отношению к предшественникам эритроцитов в условиях окислительного стресса, реализуемое путем супрессии белка 14-3-3 ζ , являющегося ингибитором транскрипционного фактора FoxO3, который, в свою очередь, регулирует гены антиоксидантных ферментов, каталазы и ГП.

При ранней ЗРП установлена связь между уровнем экспрессии miR-574-3p и 4-ГН ($r=-0,57$, $p<0,04$), содержанием каталазы ($r=-0,62$, $p<0,02$), глутатиона окисленного ($r=-0,68$, $p<0,01$) и соотношением $\text{Глут}_{\text{восст.}}/\text{Глут}_{\text{ок.}}$ ($r=0,68$, $p<0,01$) в плаценте. Корреляционный анализ установил, что уровень

4-ГН, окисленной формы глутатиона и содержание каталазы могут увеличиваться с повышением экспрессии miR-574-3p, а соотношение $\text{Глут}_{\text{восст.}}/\text{Глут}_{\text{ок.}}$ снижаться, что отражает усиление окислительного стресса и снижение антиоксидантной защиты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение экспрессии miR-574-3p может способствовать усилению процессов окислительного повреждения.

При поздней ЗРП уровень экспрессии miR-451a значимо коррелировал с уровнем 4-ГН ($r=-0,6$, $p<0,006$), содержанием СОД1 ($r=-0,51$, $p<0,02$), СОД2 ($r=-0,63$, $p<0,004$), каталазы ($r=-0,68$, $p<0,001$), а также с активностью каталазы ($r=0,62$, $p<0,005$) и СОД ($r=0,48$, $p<0,03$), в то время как значения экспрессии miR-574-3p положительно коррелировали со снижением уровня 4-ГН ($r=0,54$, $p<0,01$), содержания СОД1 ($r=0,48$, $p<0,04$), СОД2 ($r=0,48$, $p<0,04$) и каталазы ($r=0,52$, $p<0,02$). Установленные корреляции свидетельствуют о снижении маркеров окислительных повреждений и повышении активности антиоксидантов. Следует отметить, что при ранней ЗРП сниженная экспрессия miR-451a ассоциирована с ослаблением антиоксидантной защиты, а при поздней, наоборот, с ее усилением. А повышенная экспрессия miR-574-3p – с повышением уровня окислительного стресса при ранней ЗРП и его ослаблением при поздней форме. Известно, что эффекты мкРНК зависят от регуляции ими потенциальных генов-мишеней [Ouyang Y. et al., 2014]. В связи с чем разнонаправленность эффектов экспрессии одной мкРНК может быть обусловлена только путем тонко настроенной регуляции разных групп генов в контексте сигнальных путей, запускаемых при ранней и поздней ЗРП. Следовательно, в зависимости от их вовлеченности в определенный каскад, они могут выполнять либо протективную, либо триггерную роль (рис. 3).

Вышеуказанное подтверждается наличием положительной корреляции между повышенным уровнем экспрессии miR-451a, содержанием СОД1 ($r=0,62$, $p<0,002$) и СОД2 ($r=0,79$, $p<0,001$) в плазме пуповинной крови при поздней ЗРП, что указывает на ее протективную антиоксидантную роль.

Выявленные взаимосвязи уровня экспрессии мкРНК в пуповинной крови с особенностями течения раннего неонатального периода служат основой для поиска маркеров, обладающих прогностическим и диагностическим потенциалом. При этом наибольший интерес представляют установленные корреляции между значением ΔCt miR-125b-5p и наличием ВЖК новорожденных при ранней ЗРП ($r=-0,78$, $p=0,02$), а также ΔCt miR-451a и ВЖК ($r=0,52$, $p<0,04$) – при поздней ЗРП. Вовлеченность miR-125b-5p в гипоксически-ишемическое повреждение головного мозга была показана на модели окклюзии средней мозговой артерии: повышенная экспрессия miR-125b-5p подавляет в головном мозге образование H_2S , протективное действие которого при гипоксическом повреждении коррелирует с уменьшением количества АФК и повышением уровня антиоксидантов [Shen Y. et al., 2018].

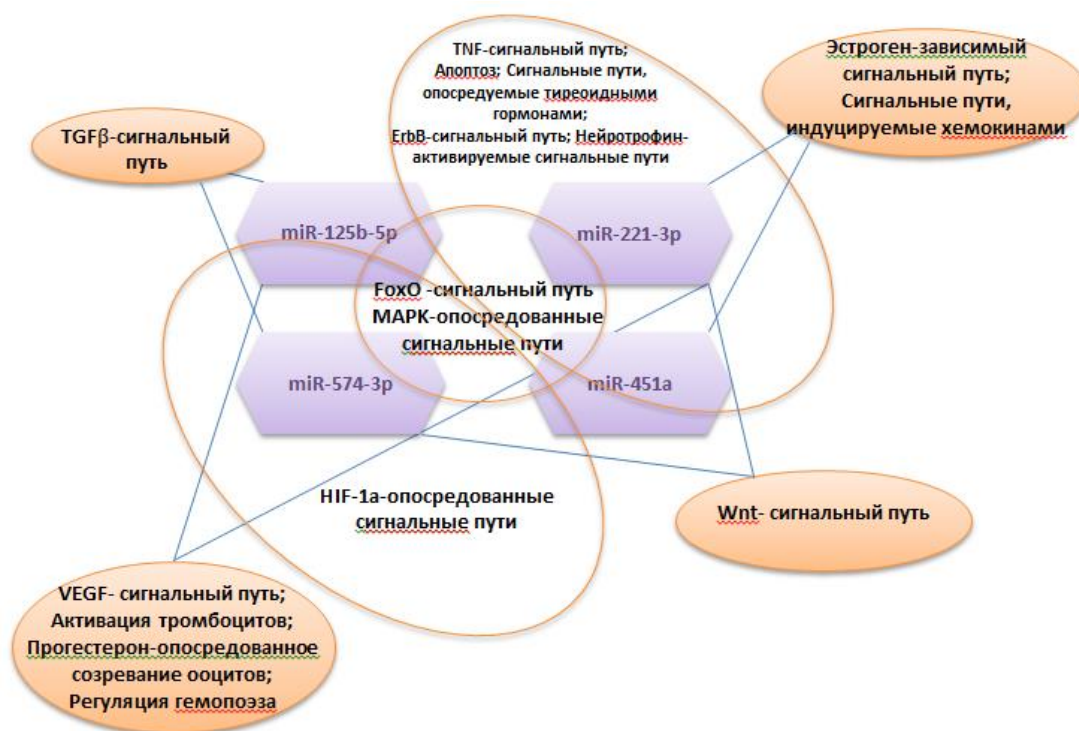


Рисунок 3. Участие исследуемых мкРНК в регуляции сигнальных путей.

Учитывая превалирование ВЖК у новорожденных в основной группе и установленные корреляции значений экспрессии miR-125b-5p и miR-451a с данной патологией мы разработали модели логистической регрессии для оценки риска развития ВЖК у новорожденных с ранней и поздней ЗРП (рис. 4, 5).

$$D = \frac{1}{1 + e^{-i - k_{miR125b} * \Delta Ct_{miR125b}}},$$

где i – свободный член ($i=3,67$),

$k_{miR125b-5p}$ – коэффициент для мкРНК ($k=-0,52$),

$\Delta Ct_{miR125b-5p}$ – ΔCt соответствующей мкРНК.

ΔCt	Пороговое значение (D)	Чувствительность	Специфичность	AUC
mir125b-5p	0,72	0,67	1	0,9

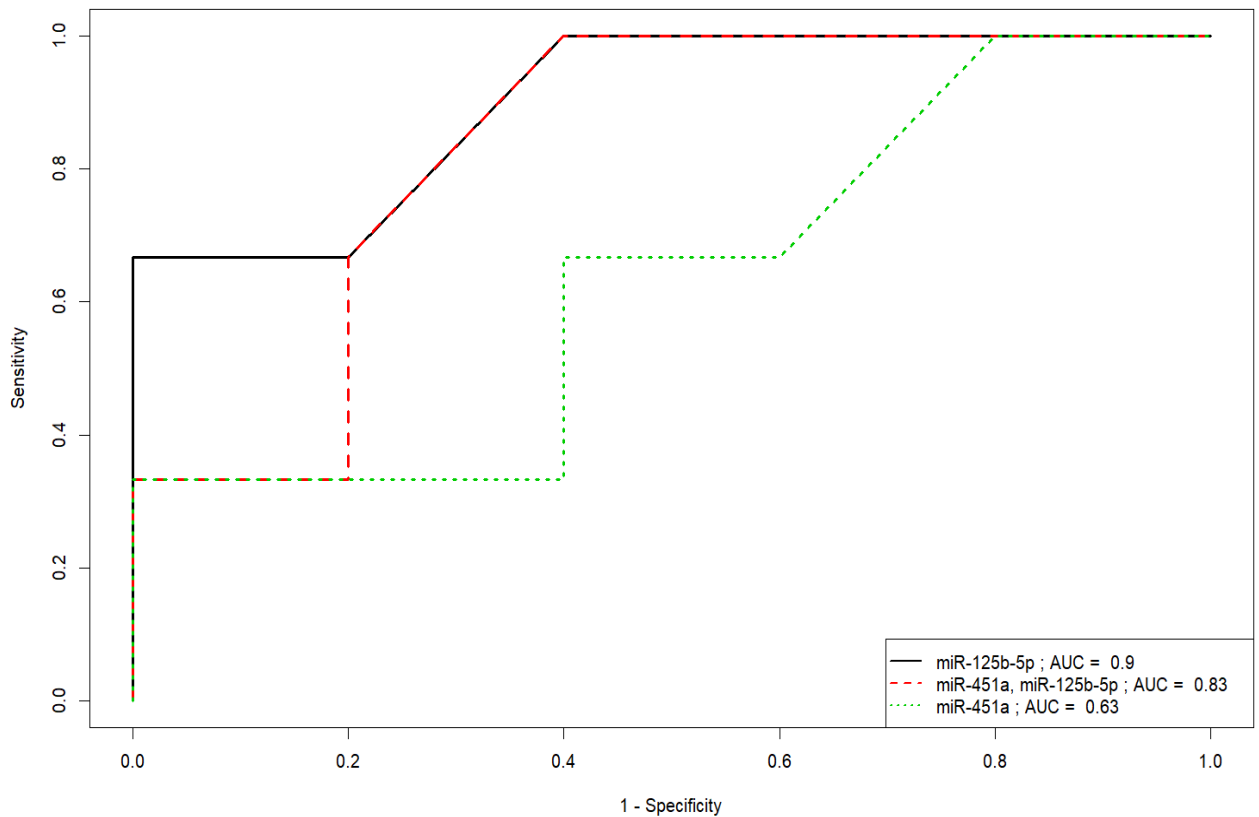


Рисунок 4. ROC-кривая модели логистической регрессии для уровня экспрессии miR-125b-5p в плазме пуповинной крови новорожденных с ранней формой ЗРП.

$$D = \frac{1}{1 + e^{-i - k_{miR125b} * \Delta Ct_{miR125b} - k_{miR451a} * \Delta Ct_{miR451a} - k_{miR30b} * \Delta Ct_{miR30b} - k_{miR27a} * \Delta Ct_{miR27a}}},$$

где i – свободный член ($i=-11318,24$),

k – коэффициент для соответствующей мкРНК: $k_{miR125b-5p}$ ($k=918,98$), $k_{miR-451a}$ ($k=-529,81$), $k_{miR-30b-5p}$ ($k=-958,81$), $k_{miR-27a-3p}$ ($k=-1405,39$),

$\Delta Ct_{miR125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p}$ – ΔCt соответствующей мкРНК.

ΔCt	Пороговое значение (D)	Чувствительность	Специфичность	AUC
miR125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p	0,25	1	0,91	0,98

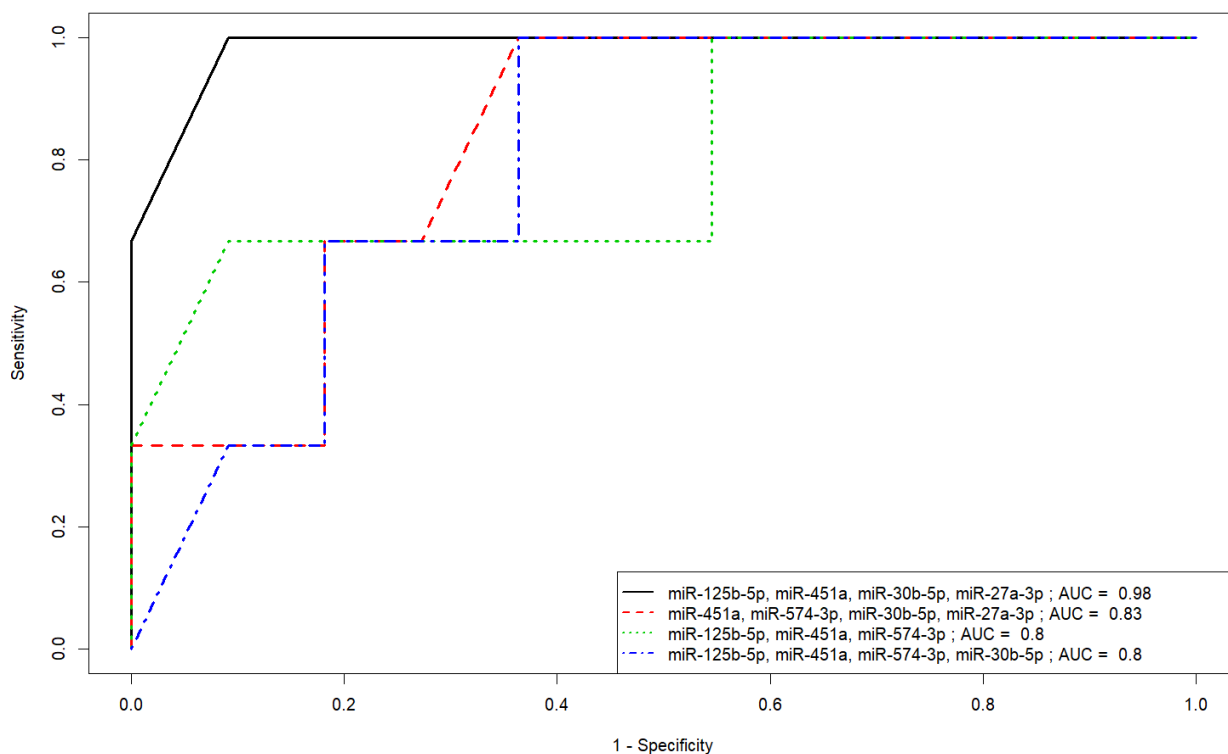


Рисунок 5. ROC-кривая модели логистической регрессии для уровня экспрессии miR-125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p в плазме пуповинной крови новорожденных с поздней формой ЗРП.

Следует отметить, что в модель для поздней ЗРП были включены мкРНК – miR-27a-3p и miR-30b-5p, регулирующие экспрессию антиоксидантных генов. Использование данных моделей позволит с высокой чувствительностью и специфичностью предсказывать вероятность развития ВЖК у новорожденных с ранней и поздней ЗРП на основании определения уровня экспрессии вышеуказанных мкРНК в плазме пуповинной крови.

Исходя из данных, полученных в ходе исследования, был разработан алгоритм диагностики ЗРП с учетом ее патогенетических форм (рис. 6).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены различия в функциональном состоянии про- и антиоксидантной систем при

ранней и поздней ЗРП, обусловленные мкРНК-зависимой регуляцией, которая лежит в основе дифференциальных механизмов их формирования. Установленные неинвазивные молекулярные и биохимические маркеры ранней и поздней ЗРП позволяют улучшить антенатальную диагностику и, как следствие, неонатальные и перинатальные исходы.

Выводы

1. Наиболее значимыми предрасполагающими факторами к формированию задержки роста плода являются: хроническая артериальная гипертензия ($V=0,3$), миопия ($V=0,3$), варикозное расширение вен нижних конечностей ($V=0,3$), медицинские аборт ($V=0,2$) и преждевременные роды в анамнезе ($V=0,2$).

2. Течение беременности при задержке роста плода статистически значимо чаще осложняется в III триместре гестационной артериальной гипертензией – 39,0% и маловодием – 63,4%. Ранний неонатальный период – врожденной пневмонией – 56,1%, некротизирующим энтероколитом – 17,1%, ДВС-синдромом – 19,5% и внутрижелудочковым кровоизлиянием – 39,0% ($p \leq 0,05$).

3. При ранней форме задержки роста плода достоверно чаще отмечаются – ДВС-синдром – 35,0%, внутрижелудочковое кровоизлияние – 65,0%, некротизирующий энтероколит – 30,0%, а при поздней – врожденная пневмония – 23,8% ($p \leq 0,05$).

4. Ранняя форма задержки роста сопровождается значимым повышением уровня маркеров окислительного стресса в плаценте и разнонаправленным изменением экспрессии соответствующих регуляторных микроРНК: на фоне двукратного повышения содержания МДА и 4-ГН и снижения активности антиоксидантной системы уровень экспрессии miR-221-3p и miR-451a снижается, а miR-125b-5p и miR-574-3p – повышается ($p \leq 0,05$).

5. Поздняя форма задержки роста плода характеризуется повышением общего уровня антиоксидантной защиты на фоне низких показателей

окислительного стресса в плаценте, снижения экспрессии miR-451a и повышения экспрессии miR-574-3p, а в плазме пуповинной крови – повышения экспрессии miR-451a ($p \leq 0,05$).

6. Установлена взаимосвязь уровней экспрессии регулирующих окислительный стресс мкРНК с показателями функционального состояния про- и антиоксидантной систем в плаценте. При ранней форме задержки роста плода повышенная экспрессия miR-125b-5p и miR-574-3p сопровождается увеличением уровня продуктов перекисного окисления липидов ($p \leq 0,05$). При поздней форме задержки роста плода установлена корреляция экспрессии miR-451a со снижением уровня 4-ГН, увеличением активности СОД и каталазы, а miR-574-3p – со снижением 4-ГН ($p \leq 0,05$).

7. Применение моделей логистической регрессии позволяет оценить риск развития внутрижелудочкового кровоизлияния у новорожденных с задержкой роста плода: при ранней форме – на основании определения уровня экспрессии miR-125b-5p, при поздней – miR-125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p в плазме пуповинной крови новорожденных.

8. Алгоритм диагностики задержки роста плода с учетом патогенетических форм позволяет снизить риски неблагоприятных перинатальных исходов.

Практические рекомендации

1. Беременных с медицинским абортom и преждевременными родами в анамнезе, а также с наличием хронической артериальной гипертензии, миопии, варикозного расширения вен нижних конечностей следует отнести в группу риска развития задержки роста плода.

2. Для дифференциальной диагностики ранней и поздней формы задержки роста плода целесообразно определение маркеров функционального состояния про- и антиоксидантной систем: МДА, 4-ГН, активности СОД, активности и содержания каталазы, глутатиона, а также соотношения $\text{Глут}_{\text{восст.}}/\text{Глут}_{\text{ок.}}$ в плазме крови беременных с использованием модели логистической регрессии (пороговое значение $> 0,5$).

3. Для оценки риска развития внутрижелудочкового кровоизлияния у новорожденных с задержкой роста плода рекомендовано использование моделей логистической регрессии на основе определения уровня экспрессии miR-125b-5p – при ранней форме задержки роста плода (пороговое значение $> 0,72$) и уровней экспрессии miR-125b-5p, miR-451a, miR-30b-5p, miR-27a-3p – при поздней форме задержки роста плода (пороговое значение $> 0,25$) в плазме пуповинной крови.

4. Для диагностики задержки роста плода с учетом ее патогенетических форм целесообразно использование разработанного алгоритма.

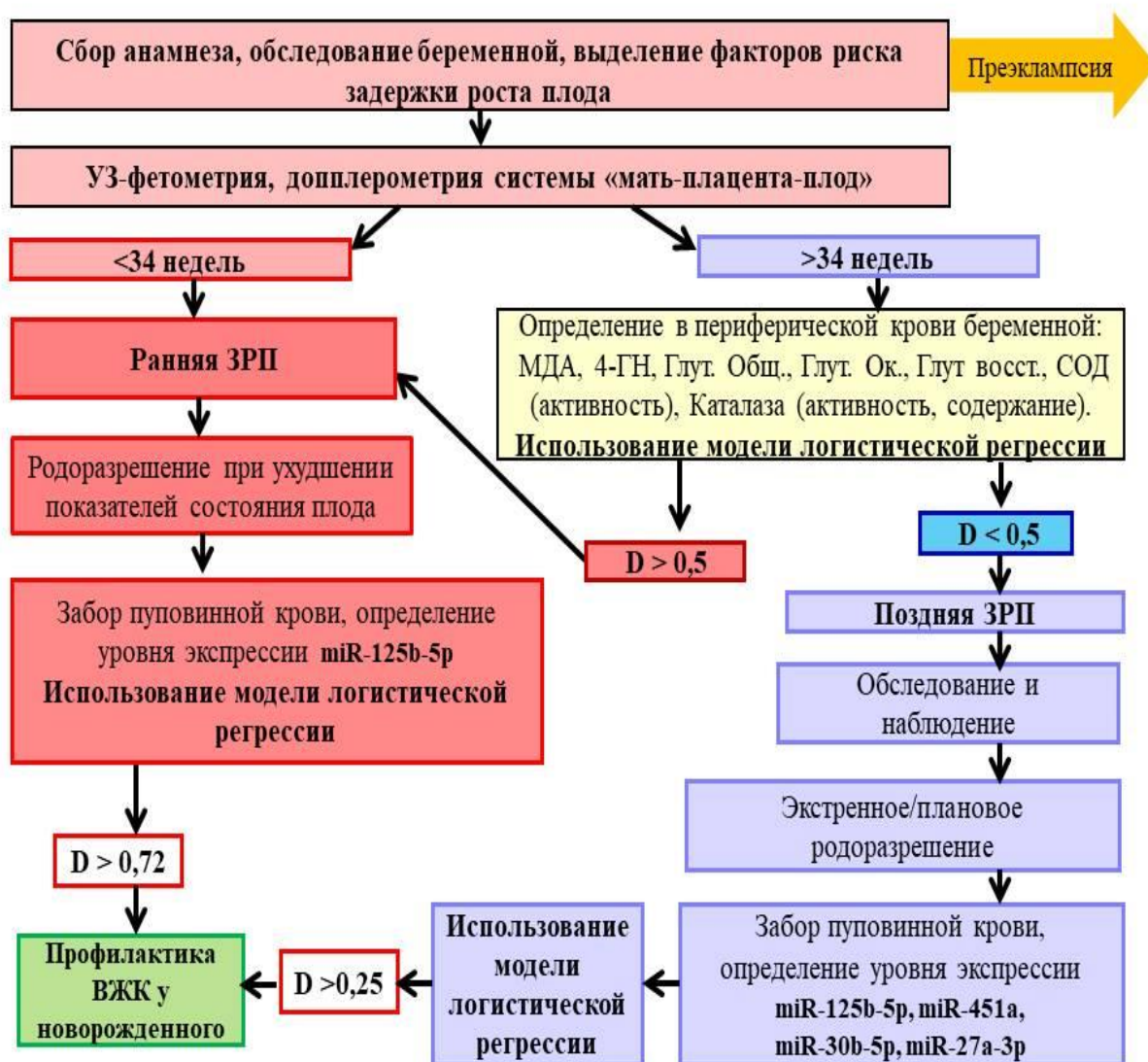


Рисунок 6. Алгоритм диагностики задержки роста плода с учетом ее патогенетических форм.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Синдром задержки роста плода у беременных с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / **Ганичкина М.Б.**, Мантрова Д.А., Арушанова А.Г., Амирасланов Э.Ю., Прозоровская К.Н., Донников А.Е. // Материалы XXII Всероссийского конгресса с международным участием: Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика. – Москва, 4-7 апреля, 2016. – С. 189.
2. Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при задержке роста плода / Ломова Н.А., **Ганичкина М.Б.**, Хачатурян А.А., Мантрова Д.А., Кан Н.Е., Донников А.Е., Тютюнник В.Л. // **Медицинский совет.** – 2016. – № 17. – С. 156-159.
3. Ведение беременности при задержке роста плода / **Ганичкина М.Б.**, Мантрова Д.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Хачатурян А.А., Зиганшина М.М. // **Акушерство и гинекология.** – 2017. – № 10. – С. 5-11.
4. Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при синдроме задержки роста плода / Хачатурян А.А., Хачатрян З.В., Мантрова Д.А., **Ганичкина М.Б.**, Тютюнник В.Л., Кан Н.Е. // Материалы XII международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 16-19 января, 2018. – С. 335-336.
5. Роль Е-кадгерина в формировании задержки роста плода / Красный А.М., Хачатурян А.А., Кан Н.Е., Хачатрян З.В., Тютюнник В.Л., Волгина Н.Е., **Ганичкина М.Б.**, Мантрова Д.А., Садекова А.А. // **Акушерство и гинекология.** – 2018. – № 6. – С. 38-43.
6. Профиль экспрессии плацентарных микроРНК – регуляторов окислительного стресса при синдроме задержки роста плода / Гусар В.А., Тимофеева А.В., Кан Н.Е., Чаговец В.В., **Ганичкина М.Б.**, Франкевич В.Е. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – № 1. – С. 74-80.
7. Дифференциальная диагностика ранней и поздней задержки роста плода на основании маркеров про- и антиоксидантной систем /

Ганичкина М.Б., Высоких М.Ю., Тютюнник В.Л., Чаговец В.В., Кан Н.Е. // *Акушерство и гинекология*. – 2020. – № 9. – С. 66-72.

8. **MiRNAs Regulating Oxidative Stress: A Correlation with Doppler Sonography of Uteroplacental Complex and Clinical State Assessments of Newborns in Fetal Growth Restriction / Gusar V., **Ganichkina M.**, Chagovets V., Kan N., Sukhikh G. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – 9 (10), 32.**