

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
федеральное государственное бюджетное учреждение
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ
И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

На правах рукописи

ГРАЧЕВА

Мария Ивановна

**ТАКТИКА ВЕДЕНИЯ БЕРЕМЕННЫХ
С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК**

14.01.01. – акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент **Кан Н.Е.**,

кандидат биологических наук **Красный А.М.**

Москва – 2018

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе преэклампсии	10
1.2. Перспективы диагностики преэклампсии	25
1.3. Роль внеклеточной фетальной ДНК в ранней диагностики осложнений беременности	32
Глава 2. Материал и методы исследования	42
2.1. Материал исследования	42
2.2. Методы исследования	44
2.2.1. Общеклинические методы исследования	44
2.2.2. Специальные методы исследования	45
Глава 3. Клиническая характеристика беременных	53
3.1. Особенности акушерского и соматического анамнеза и оценка состояния здоровья беременных	53
3.2. Анализ перинатальных исходов при оперативном родоразрешении пациенток с преэклампсией	60
Глава 4. Результаты собственных исследований	65
4.1. Исследование свободной внеклеточной ДНК в крови матери	65
4.1.1. Исследование уровней фетальной внеклеточной ДНК и общей внеклеточной ДНК	65
4.1.2. Оценка диагностической ценности уровня свободной и плодовой ДНК для диагностики преэклампсии	67
4.1.3. Подтверждение валидности метода определения фетальной ДНК в крови беременных женщин	68
4.1.4. Взаимосвязь уровня внеклеточной ДНК с перинатальными исходами	69
4.2. Исследование уровня цитокинов	74
Глава 5. Обсуждение полученных результатов	83
Выводы	96
Практические рекомендации	97
Список сокращений	98
Список литературы	100
Приложение	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Преэклампсия является тяжелым гестационным заболеванием, как с локальными внутриматочными, так и с системными нарушениями, приводящими к заболеваемости и смертности матерей и плода. Во всем мире это заболевание затрагивает около 3-7% всех беременностей. ПЭ часто обнаруживается во второй половине беременности, но, скорее всего, заболевание имеет свое начало во время ранней беременности. На сегодняшний день нет надежного специфического, экономически эффективного скринингового теста преэклампсии, и нет эффективных мер по первичной профилактике. Патологические изменения, наблюдаемые в течении преэклампсии, включающие недостаточную инвазию трофобласта, плацентарную ишемию и васкулит, сходны с теми, которые наблюдаются при других осложнениях беременности, включающих задержку роста плода, спонтанные аборт и отслоения плаценты. Эти заболевания имеют общее иммунологическое звено патогенеза, выраженное в местном субклиническом воспалении плацентарной ткани и системном иммунном ответе в материнском кровообращении. Предполагается, что ПЭ развивается в несколько этапов. Сначала возникает чрезмерный материнский воспалительный ответ, вероятно, против чужеродных эмбриональных антигенов, который приводит к нарушению инвазии трофобластов, дефектному ремоделированию спиральной артерии и снижению плацентарной перфузии. В последствие, плацентарная гипоксия и инфаркт приводят к высвобождению воспалительных цитокинов и плацентарных фрагментов в материнскую систему кровообращения. Данные процессы заканчиваются системным нарушением эндотелия сосудов и клиническими проявлениями преэклампсии. При этом страдает не только мать, но и развивающийся плод. Оценка степени неблагополучия плода – важная клиническая задача при ПЭ.

Одним из перспективных маркеров повреждения плода при ПЭ может быть уровень внеклеточной фетальной ДНК в материнской крови. Наличие фетальной

внеклеточной ДНК в плазме и сыворотке крови беременных женщин впервые было описано в 1997 году. Данное открытие стало началом всемирного изучения эмбриональной ДНК в качестве потенциального маркера для неинвазивной пренатальной диагностики. Была выявлена положительная связь между сроком гестации и уровнем фетальной ДНК, выявляемой уже на первых неделях развития плода (на 28й день после зачатия она обнаруживается у 80% беременных женщин).

На сегодняшний день точно не установлены возможные биологические механизмы, отвечающие за выход ДНК плода в сосудистое русло матери. Наиболее вероятной причиной рассматривают гибель клеток трофобласта, в результате которой содержимое клеток (в том числе и генетический материал) оказывается в крови матери. Однако, поскольку в кровотоке матери присутствует ее собственная внеклеточная ДНК, то для идентификации ДНК плодового происхождения необходимо использовать какие-либо маркеры гарантированно имеющиеся у плода и отсутствующие у матери. Первым предложенным способом измерения концентрации ДНК плода в крови матери стал метод обнаружения гена SRY, локализованного в Y-хромосоме, при помощи количественной ПЦР. Основываясь на этой методике, в 1999 году было показано почти 5-кратное повышение внеклеточной ДНК плода в кровотоке матери при преэклампсии по сравнению с группой сравнения женщин с физиологически протекающей беременностью. В дальнейшем при изучении данного феномена у беременных с преэклампсией выявлены не только рост концентрации ДНК плода, но и значительное повышение ДНК матери, причём увеличение обоих показателей соответствовало степени тяжести заболевания. Также, было продемонстрировано, что концентрация ДНК плода возрастает задолго до появления первых клинических симптомов.

Такой метод был применим только для женщин, вынашивающих плод мужского пола. Позже, для того, чтобы сделать возможным оценку уровня фетальной внеклеточной ДНК при беременности плодом женского пола, был предложен способ разделения материнской и фетальной ДНК по степени

метилирования определённых генов. В качестве маркера был предложен ген опухолевого супрессора RASSF1A (Ras association domain family 1A), который гиперметилирован в клетках плода, но не матери. При помощи специфических ферментов рестриктаз, чувствительных к метилированию, возможно избирательно расщепить те фрагменты ДНК, которые не метилированы. Следовательно, после обработки рестриктазами ДНК, выделенной из крови матери, материнский ген RASSF1A будет полностью разрушен, в то время как эмбриональный будет представлен. После такой обработки производится измерение количества фетального гена RASSF1A методом количественной ПЦР, результат которой и будет коррелировать с общим количеством эмбриональной ДНК в крови женщины. В случае беременности плодом мужского пола, была продемонстрирована корреляция между количеством метилированного гена RASSF1A и гена SRY, что говорит о достоверности использования гена RASSF1A в пренатальной диагностике (Zejskova et al., 2010). Таким образом, анализ содержания гена RASSF1A в сыворотке крови матери, как маркера эмбриональной ДНК, может быть ценным методом для оценки уровня эмбриональной ДНК вне зависимости от пола плода. Результаты последних исследований подтвердили, что при преэклампсии уровень содержания RASSF1A в сыворотке крови матери увеличивается (Manokhina et al., 2014; Zhao et al., 2010).

Следовательно, дальнейшая работа по количественному определению нуклеиновых кислот плода в крови матери, а также выявление причин их появления является актуальным направлением в поиске маркеров для неинвазивной пренатальной диагностики патологических состояний плода и матери на раннем этапе их возникновения и последующего лечения этих заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время осуществляется немало попыток обобщения накопленного в мировой практике опыта применения внеклеточной ДНК в диагностике и предикции ПЭ. Несмотря на это, задача до настоящего времени

остается нерешенной. Значение внеклеточной фетальной ДНК (cffDNA) в плазме крови матери в качестве индикатора ПЭ впервые обсуждалось в отчете Lo et al. [Lo et al., 1999]. В настоящее время выполнено несколько многоцентровых исследований для подтверждения прогностического значения cffDNA для прогнозирования и мониторинга ПЭ в сочетании с другими потенциальными маркерами (например, P-селектин, PAPP-A, PP-13, sFlt-1, sEng и PlGF) [Grill, S., 2009; Martin A., 2014]. RASSF1A – это ген – супрессор опухолевого роста, который часто инактивируется повышенным уровнем метилирования промотора фактора при различных опухолях. Поскольку плацента является единственной доброкачественной тканью, демонстрирующей высоко метилированный профиль RASSF1A, количественное определение гиперметилированного RASSF1A может использоваться в качестве эпигенетического маркера по cffDNA [Papantoniou N., 2013]. Количественное определение внеклеточной фетальной ДНК является перспективным маркером прогнозирования ПЭ.

Однако в связи с неоднородностью в опубликованных исследованиях нельзя сделать точного заключения о статистической и клинической значимости данного потенциального маркера ПЭ.

Цель исследования

Оптимизация ведения беременных с преэклампсией путем определения внеклеточной ДНК для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Задачи исследования

1. Выделить клиничко-anamнестические особенности пациенток с преэклампсией.
2. Определить уровень внеклеточной общей и фетальной ДНК в крови беременных при преэклампсии с оценкой степени тяжести.
3. Изучить взаимосвязь изменений уровней про- и противовоспалительных цитокинов при преэклампсии.

4. Оценить диагностическую и прогностическую значимость фетальной ДНК и цитокинов для оценки тяжести преэклампсии и прогнозирования перинатальных осложнений.
5. Оптимизировать алгоритм ведения пациенток с преэклампсией на основании использования молекулярных маркеров.

Научная новизна

На основании сравнения диагностических и прогностических возможностей уровней общей и фетальной внеклеточной ДНК в крови матери при преэклампсии доказана высокая диагностическая ценность обоих маркеров. Показано, что уровень общей внеклеточной ДНК обладает более высокой диагностической ценностью.

Впервые проведено изучение изменения уровня внеклеточной ДНК в крови матери в процессе лечения преэклампсии для оценки ее эффективности, и доказана большая прогностическая значимость оценки изменения ее уровней в отличие абсолютных значений.

Обнаружена взаимосвязь между уровнем внеклеточной ДНК и уровнем цитокинов, имеющих, моноцитарное происхождение в крови матери, отражающими развитие системного воспалительного ответа при преэклампсии.

Практическая значимость

Показано, что уровень общей внеклеточной ДНК обладает высокой диагностической и прогностической ценностью и его оценка может быть с успехом использована в клинической практике.

Применение современных методов диагностики преэклампсии, основанное на определении свободной внеклеточной ДНК в крови матери, позволяет снизить частоту осложнений беременности и перинатальных осложнений.

Оценка общей внеклеточной ДНК обладает более высокими диагностическими характеристиками и технологически более проста и надежна

по сравнению с оценкой внеклеточной ДНК фетального происхождения, что позволяет рекомендовать для практического применения определения именно общей внеклеточной ДНК в крови матери.

Предложен алгоритм ведения беременных с ПЭ с учетом уровня свободной внеклеточной ДНК в крови матери. Внедрение этого алгоритма в практику акушерских стационаров и перинатальных центров позволит снизить частоту осложнений беременности, перинатальной заболеваемости и смертности.

Методология и методы исследования

В работе использованы общеклинические и молекулярно - генетические методы исследования. Статистическую обработку проводили с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Office Excel 2007 и пакета MedCalc12 для Windows 7.

Положения, выносимые на защиту

1. К наиболее значимым факторам риска развития ПЭ следует относить заболевания сердечно – сосудистой системы, метаболические нарушения и отягощенный семейный анамнез. Течение беременности при преэклампсии достоверно чаще осложняется ранним токсикозом, угрозой прерывания с формированием ретрохориальной гематомы в первом триместре, угрозой преждевременных родов, задержкой роста плода во втором и третьем триместрах , и неблагоприятными перинатальными исходами.

2. Развитие преэклампсии ассоциировано с увеличением уровней общей и фетальной внеклеточной ДНК, при этом уровень общей внеклеточной ДНК обладает лучшими диагностическими характеристиками для верификации ее тяжести.

3. Нарастание уровня общей внеклеточной ДНК в процессе лечения преэклампсии является неблагоприятным прогностическим критерием и связано с высоким риском перинатальных осложнений.

4. Разработанный алгоритм ведения беременных с использованием неинвазивных молекулярных маркеров позволит снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Личный вклад автора

Автором проведена систематизация литературных данных по теме диссертации, лично разработана анкета для сбора анамнеза, проведен анализ клинико-анамнестических данных и результатов обследования 181 женщины в проспективном исследовании, удовлетворяющем критериям включения в исследования. Автор лично участвовал в ведении беременности и родоразрешении женщин, включенных в исследование. Автором осуществлялись: забор, подготовка, хранение биологического материала на преаналитическом этапе, участие в молекулярно - генетических исследованиях. Анализ, статистическая обработка полученных данных проведены автором самостоятельно в соответствии с правилами и обеспечивают достоверность результатов и сформулированных выводов. Написание и публикация результатов выполнены автором лично.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе преэклампсии

Преэклампсия (ПЭ) является полиорганным нарушением, возникающим на ранних стадиях беременности и ведущим к большому числу случаев материнской заболеваемости и смертности [59, 180, 199]. Хотя до сих пор имеется много неразрешенных вопросов, патофизиология ПЭ, вероятно, связана как с материнским, так и с фетальным/плацентарным факторами.

Аномалия в развитии сосудистой системы плаценты на ранней стадии беременности считается основной причиной недостаточного плацентарного кровоснабжения/гипоксии/ишемии, которые затем приводят к высвобождению различных факторов в систему кровообращения матери, что изменяет ее системную функцию эндотелия и вызывает гипертензию и другие проявления заболевания. Хотя считается, что ключевую роль в данном процессе играет аномальное ремоделирование спиральных артерий, лежащие в основе этого клеточные и молекулярные механизмы остаются неясными [197].

ПЭ можно подразделить на два вида: с ранним и поздним началом. Широко признано, что данные виды ПЭ представляют собой разные формы заболевания. Ранняя ПЭ, при которой заболевание развивается до 34 недели беременности, обычно связана с внутриутробной задержкой роста плода (IUGR), неблагоприятными исходами для матери и новорожденного. И наоборот, поздняя ПЭ, развивающаяся на 34 неделе или позднее, в основном связана с умеренной формой заболевания матери и низкой степенью вовлеченности плода. Перинатальные исходы при поздней ПЭ обычно благоприятны [8, 89, 202, 207].

Ранее выявление ПЭ позволяет планировать надлежащий уровень контроля и ведения пациента при ранней идентификации осложнений. Различные подходы к профилактическим мероприятиям в отношении ПЭ, начиная с середины беременности, не оправдали свою эффективность. Однако прогнозирование ПЭ на ранних сроках беременности может обеспечить более эффективные ранние профилактические стратегии [5, 19, 189].

За последние тридцать лет многие группы исследователей изучили значение приема аспирина в низкой дозировке в качестве профилактического средства. Недавние метаанализы позволили предположить, что при условии начала лечения на ранней стадии беременности (< 16 недель) риск наступления ранней ПЭ значительно снижается, и это связано с последующим уменьшением числа случаев перинатальной смертности и заболеваемости [36, 157, 158, 159]. Различные национальные и международные организации в настоящее время рекомендуют предлагать женщинам в категории высокого риска развития ПЭ лечение аспирином [169, 200, 203]. Это усиливает необходимость ранней идентификации женщин группы высокого риска с целью внедрения целевых вмешательств для обеспечения более благоприятного исхода для матери и ребенка.

Ни один анализ не продемонстрировал достаточно надежного для клинического использования прогностического значения по ПЭ [209]. Напротив, данные анализы наиболее полезны в сочетании с другими параметрами. В связи с гетерогенной природой ПЭ сочетание двух или более независимых биомаркеров, при том, что каждый отражает различные патофизиологические процессы, должно потенциально увеличивать вероятность получения подходящих прогностических алгоритмов. Исследователи все еще продолжают поиск такого сочетания анализов, которое будет работать лучше, чем УЗ доплерометрия маточных артерий для поддержания высокого уровня чувствительности и улучшения специфичности [77].

Наиболее перспективные стратегии прогнозирования ПЭ включают многоуровневые подходы, в которых разные индивидуальные параметры применяются вместе (например, как при скрининге анеуплоидии в первом триместре). Сочетание материнских факторов риска, пульсационного индекса (PI) маточной артерии при УЗИ, среднего артериального давления и сывороточного ассоциированного с беременностью белка плазмы А (РАРР-А) матери, плацентарного фактора роста (PIGF), PP13 и уровней гемоглобина плода на 11–13 неделе беременности можно использовать для идентификации значительной доли

беременностей с высокой степенью риска ранней ПЭ [23, 29, 30, 31, 56, 128].

Обзор содержит набор потенциальных биомаркеров, выработанных современными исследователями, в качестве попытки улучшения прогностических характеристик существующих моделей прогнозирования ПЭ.

Факторами риска являются ПЭ в анамнезе, антифосфолипидный синдром, наличие ПЭ у членов семьи, хроническое заболевание почек, инсулин – зависимый диабет, многоплодная беременность, существующая гипертензия и бесплодие в анамнезе [200].

Во многих руководствах по акушерской практике в настоящее время рекомендуется предлагать лечение аспирином в низкой дозировке женщинам в группе с высоким фактором риска развития ПЭ в ходе беременности [114, 162, 200, 203]. Несмотря на предложенные скрининговые стратегии ранней диагностики и последующего предотвращения ПЭ, а также на то, что ранее перенесенная матерью ПЭ отдельно является ограничением в прогнозировании ПЭ, в отчете Американской коллегии акушеров и гинекологов «Рабочая группа по гипертензии при беременности» в настоящее время рекомендуется прием ежедневного приема аспирина в низких дозах (60–80 мг), начиная с конца первого триместра, только когда женщина в прошлом перенесла раннюю ПЭ и преждевременные роды на сроке до 34 недель беременности или ПЭ в ходе более чем одной предыдущей беременности [162]. Однако эффективность скрининговых стратегий, в которых для выявления ПЭ используются только материнские факторы риска и ее история болезни, находится на среднем уровне.

Скрининг с применением данных факторов согласно данным Национального института охраны здоровья и совершенствования медицинской помощи позволяет получить 64,1% ложноположительных результатов с показателем обнаружения на уровне 89,2%, 93,0% и 85,0% в отношении ранней, поздней ПЭ и гипертензии при беременности, соответственно. В проспективном скрининговом исследовании Национального института охраны здоровья и совершенствования медицинской помощи, когда те же самые факторы были объединены в алгоритм, полученный в ходе многомерного анализа, на выходе

были получены лучшие результаты с диагностическим показателем на уровне 37%, 29% и 21%, соответственно, при наличии 5% ложноположительных результатов. Хотя только материнские факторы риска и история болезни обладают ограничениями в прогнозировании ПЭ, они могут быть потенциально полезными в случае применения разных алгоритмов [148]. Ограничения использования только материнских факторов риска для прогнозирования ПЭ у женщин с первой беременностью были показаны в многоцентровом проспективном исследовании «Скрининг исходов беременности», которое определило, что 9% нерожавших женщин требуется направление к специалисту, и в 21% случаев среди них разовьется ПЭ [130].

Совокупность различных факторов обеспечивает лучшие результаты при прогнозировании ранней ПЭ (перенесенная ПЭ в прошлом, принадлежность к негроидной расе, имеющаяся гипертензия и использование ранее стимуляторов овуляции), чем поздней ПЭ (наличие ранее ПЭ у матери или члена семьи, принадлежность к негроидной расе, индекс массы тела и возраст матери). При таком подходе к скринингу воздействие переменных выражается как отношение вероятности ранней, поздней или общей ПЭ. Это привело к появлению точки зрения о том, что ранняя и поздняя ПЭ могут быть разными заболеваниями. Существующая бессимптомная эндотелиальная дисфункция у матери, вероятно, может привести к большей вероятности нарушений процессов плацентации и последующей плацентарной дисфункции [41].

Считается, что развитие ПЭ включает патологическую плацентацию. Поэтому стоит выполнять оценку резистентности кровотока маточных артерий, помимо оценки материнских факторов риска. В ряде недавних отчетов показано, что в случае подобной оценки риска, основанной на сочетании истории болезни матери, кровяного давления и УЗ доплерометрии маточных артерий, показатели обнаружения ранней ПЭ выше, чем при использовании только истории болезни матери [136, 148].

Во время нормальной беременности клетки цитотрофобласта фетального происхождения ремоделируют материнские спиральные артерии, приводя к их

расширению. Данный процесс ремоделирования приводит к увеличению кровообращения матери и плода, что требуется для адекватного плацентарного кровотока. Однако замедление процессов плацентации при нарушенном ремоделировании спиральных артерий связано с развитием ПЭ, ЗРП и другими осложнениями [78, 85, 94].

Многие исследования показали, что повышенное сопротивление кровотока в маточных артериях связано с развитием ПЭ, и результаты УЗ доплерометрии во время первого и второго триместра сопоставимы с результатами гистопатологических исследований плаценты при ПЭ [116, 133, 138, 143]. Состояние высокой резистентности маточно-плацентарного кровообращения может быть измерено неинвазивным путем при помощи доплеровского исследования маточных артерий [147]. Доплеровский скрининг является полезной скрининговой программой для прогнозирования ПЭ. Цветовое доплеровское картирование используется для идентификации сосудов, либо трансабдоминально на видимом перекрестии с внешней подвздошной артерией, либо трансвагинально, с боковой стороны шейки матки на уровне ее внутреннего зева [116]. Затем используется импульсно-волновая доплерография. После получения сходных последовательных колебательных сигналов измеряется PI, и рассчитывается среднее значение PI по левой и правой артерии. Пиковая систолическая скорость должна быть выше 60 см/сек для точного выбора маточной артерии, а не дугообразной артерии [143]. В самых ранних исследованиях использовалась доплерометрия маточной артерии, проводимая во втором триместре [178]. Однако растущее число исследований показало эффективность использования доплеровских исследований в первом триместре для прогнозирования ПЭ и ЗРП [116]. Метаанализ 74 исследований ПЭ (всего 79547 одноплодных беременностей) показал, что доплерография обладает лучшими характеристиками во втором триместре по сравнению с первым и используется для идентификации ПЭ в тяжелой форме или ранней ПЭ. Среди женщин из группы низкого риска повышенный PI маточной артерии во втором триместре обладает чувствительностью 78% и специфичностью 95% в отношении

обнаружения тяжелой формы ПЭ (положительное отношение вероятности: 15,6; отрицательное отношение вероятности: 0,23). В частности, повышенный PI с диастолической выемкой во втором триместре является наилучшим прогностическим маркером при работе с пациентами групп низкого и высокого риска [50].

В более поздних 11 исследованиях (43122 женщин) оценивалась роль доплерометрии маточной артерии в отношении прогнозирования ПЭ. В отчетах данных исследований сообщалось, что доплерометрия патологической маточной артерии в первом триместре обладает высокой специфичностью и низкой чувствительностью в отношении прогнозирования ранней ПЭ. Общая чувствительность и специфичность доплерометрии маточной артерии в первом триместре составляла 0,26 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,24, 0,29) и 0,91 (95% ДИ 0,91, 0,91), соответственно [193]. На PI маточной артерии в первом триместре влияет гестационный возраст при скрининге, вес матери, раса и наличие сахарного диабета. Поэтому данный индекс должен быть выражен в виде отклонения от среднего значения (MoM) после отрегулирования данных факторов.

Значение MoM PI маточной артерии значительно повышается на 11–13 неделе беременности у женщин, у которых развивается ранняя ПЭ, и имеется существенная отрицательная линейная корреляция между MoM PI маточной артерии и гестационным возрастом при родах [204]. Сочетание PI маточной артерии в первом триместре и материнских факторов риска может улучшить показатель обнаружения с 36% до 59% и с 33% до 40% с количеством ложноположительных результатов на уровне 5%, и с 51% до 75% и с 43% до 55% с количеством ложноположительных результатов на уровне 10% в отношении ПЭ с необходимостью родов до 34 и 37 недели беременности, соответственно. В конечном итоге мониторинг маточной артерии в первом триместре позволит врачам определить женщин в группе риска развития ранней ПЭ, а также ограничения в росте плода, и начать применять профилактические методы, такие

как лечение аспирином и регулярный мониторинг плода для минимизации неблагоприятного исхода [150].

Трехмерное звуковое исследование (3D) может обеспечить получение улучшенного изображения анатомии плода по сравнению с традиционным ультразвуком 2D. Новая оценка методом ультразвукового исследования 3D (по сравнению с ультразвуком 2D) особенно хорошо применима в отношении плаценты, включая получение изображения поверхности и измерение объема. С учетом последних достижений в области энергетической доплеросонографии 3D обеспечивается более эффективная оценка васкуляризации и кровообращения плаценты [132]. В нескольких небольших исследованиях было выдвинуто предположение, что по ряду параметров, полученных при энергетической доплеросонографии 3D по плаценте в первом триместре, можно прогнозировать результаты беременности, включая ПЭ и задержку внутриутробного развития [131]. В недавнем проспективном неинтервенционном исследовании 308 женщин на сроках от 11 до 13 + 6 недель беременности у 17 женщин с ПЭ имелся значительно пониженный индекс васкуляризации при доплеровском исследовании 3D. Однако индекс кровообращения у женщин с ПЭ не отличался. Плацентарный объем недостаточен для раннего прогнозирования ПЭ и задержки внутриутробного развития [51]. В будущем требуется проведение большего числа широкомасштабных испытаний с целью определения потенциала ультразвуковых исследований 3D для прогнозирования ПЭ.

Небольшие изменения в кровяном давлении являются маркером риска развития ПЭ [41]. У женщин с последующим развитием ПЭ наблюдается повышенный уровень систолического кровяного давления и MAP перед клиническим проявлением заболевания [78]. MAP рассчитывается путем деления суммы систолического и двойного диастолического кровяного давления на три, и т.о. данный показатель легко измерим. Метаанализ 2008 г., включающий более 60000 женщин с 3300 случаями ПЭ, показал, что MAP был более прогнозируемым показателем ПЭ среди женщин из группы низкого риска в первом или втором

триместре, чем считывание только систолических или диастолических данных [145].

Для женщин в группе высокого риска диастолическое кровяное давление, измеряемое между 13 и 20 неделями беременности, является наиболее надежным прогностическим параметром в отношении ПЭ (положительное отношение вероятности: 2,8). Проспективное исследование 5590 женщин с одноплодной беременностью показало, что комбинация материнских факторов риска и MAP, измеренным между 11 и 13 + 6 недель беременности была более прогностичной в отношении ПЭ (область под кривой зависимости концентрации от времени (AUC): 0,852), чем что-либо из указанного в отдельности (значения AUC: 0,801 и 0,734, соответственно) [66]. Другое исследование материнских характеристик и MAP-1 (11–13 недели) с ложноположительными результатами на уровне 10% показало, что показатели обнаружения 74,3%, 62,9% и 49,3% при ранней ПЭ, ПЭ преждевременного срока и любого срока гестации, соответственно [178]. При скрининге MAP-1 и MAP-2 (20–24 недели беременности) при ложноположительных результатах на уровне 10% показатели обнаружения составляли 84,3%, 65,7% и 52,5%, соответственно. Характеристики скрининга на ПЭ при применении MAP были наилучшими, если измерения проводились на 11–13 и 20–24 неделе беременности, чем в случае только одного из данных гестационных диапазонов [129].

На основании данных вышеуказанных исследований была предложена двухэтапная стратегия идентификации беременности при риске ПЭ [24]. Целью первого этапа, на 11–13 неделе, является прогнозирование ПЭ преждевременного срока, поскольку число случаев данного явления может быть значительно сокращено за счет профилактического приема аспирина в низкой дозировке до 16 недели беременности [36, 66, 99, 157, 204]. Второй этап, на 30–33 неделе, сфокусирован на эффективном прогнозировании ПЭ, при котором роды должны произойти на 34 неделе беременности или позднее. Это связано с тем, что тщательное отслеживание ранних клинических признаков ПЭ могло потенциально улучшить перинатальные результаты за счет какого-либо

вмешательства, например, за счет приема лекарственных препаратов, снижающих кровяное давление [185].

В исследовании 35215 случаев беременности на 11–13 неделе беременности применялась модель времени выживания для прогнозирования ПЭ. В отчете данного исследования сообщалось, что при комбинированном скрининге с вовлечением материнских факторов риска (PI маточной артерии и MAP) при ложноположительных результатах на уровне 5% приблизительно 80% пациенток с ПЭ рожали до наступления 34 недели беременности и 40% - на 34–37 неделе беременности [99]. В недавнем проспективном исследовании в отношении ПЭ на 30–33 неделе беременности комбинированный скрининг с учетом материнских факторов риска по PI маточной артерии и MAP идентифицировал 90% беременностей с ПЭ с необходимостью родов в течение последующих четырех недель. Авторы заключили, что характеристики комбинированного скрининга на 30–33 неделе беременности по ПЭ с родами на 34–37 неделе лучше характеристик скрининга на 11–13 неделе беременности [191].

Имеется существенная связь между PI маточной артерии и MAP и беременностями без каких-либо воздействий. При комбинировании PI маточной артерии и MAP при расчете специфического риска развития ПЭ должны приниматься во внимание факторы корреляции во избежание пере- или недооценки воздействия каждого маркера на точную оценку риска развития ПЭ. Приблизительные показатели обнаружения ПЭ с необходимостью родов до наступления 34, 37 и 42 недели беременности при скрининге с применением материнских факторов риска составляют 80%, 55% и 35%, соответственно, при количестве ложноположительных результатов на уровне 5% и 90%, 72% и 57%, соответственно, с ложноположительными результатами на уровне 10% [150].

Фактор роста эндотелия сосудов и плацентарный фактор роста (PlGF)

Ангиогенез требует комплексного взаимодействия между проангиогенными факторами - фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и PlGF, с их родственными рецепторами VEGF-рецептор 1 (VEGFR-1, иначе называемый fms-подобная тирозинкиназа-1 (Flt-1)) и VEGFR-2 [192].

Медианный уровень сывороточного PlGF демонстрирует криволинейную зависимость от гестационного возраста с увеличением в первом и втором триместре. Уровни PlGF достигают максимума приблизительно на 30 неделе беременности, а затем понижаются [93]. PlGF входит в состав семейства фактора роста эндотелия сосудов и вовлечен в ангиогенез и трофобластную инвазию материнских спиральных артерий [5]. Уровни PlGF в сыворотке крови матери на 11–13 неделе беременности понижаются в случае беременности с фетальной анеуплоидией и замедленным образованием плаценты, в результате чего формируется ПЭ, и рождается ребенок с низкой массой для данного гестационного возраста. Сывороточные уровни PlGF также понижаются во втором и третьем триместре при беременности с развитием ПЭ или у женщин, у которых рождаются дети с низкой массой для данного гестационного возраста [93]. Растворимый Flt-1 (sFlt-1) представляет собой усеченный сплайс-вариант мембраносвязанного Flt-1. Данный сплайс-вариант свободно циркулирует в сыворотке, где он связывается и нейтрализует VEGF и PlGF. Несколько исследований продемонстрировали связь между повышенными уровнями sFlt-1 и ПЭ [13, 18, 104]. Уровни sFlt-1 начинают расти на пятой неделе до появления ПЭ и остаются повышенными по сравнению с уровнями у женщин без заболевания [117]. Через десять лет с момента, когда авторы Maunard *et al.* [210] выпустили отчет о том, что чрезмерное плацентарное образование sFlt-1 (антагонист VEGF и PlGF) влияет на патогенез ПЭ, было опубликовано обширное исследование, демонстрирующее практическую значимость ангиогенных маркеров в диагностике и последующем прогнозировании и ведении ПЭ, а также в отношении нарушений, связанных с плацентой. PlGF циркулирует свободно или в комплексе с sFlt-1. Механистическая роль PlGF в патогенезе ПЭ была впервые описана авторами Zhou *et al.* [154] в 2002 г. Клиническая ценность PlGF при скрининге на ПЭ ограничивается ранней стадией заболевания [25, 125, 140]. Дефектное раннее образование плаценты с ослабленной инвазией трофобласта и ограниченным ремоделированием спиральных артерий является центральным фактором патогенеза ранней ПЭ, в результате чего сокращается маточно-

плацентарный кровоток. Сочетание отношения sFlt-1/PlGF второго и третьего триместра позволяет получить показатель обнаружения на уровне 87,5% при фиксированном значении ложноположительных результатов на уровне 10% в отношении раннего прогнозирования ПЭ у населения в группе низкой степени риска [123]. Растворимый эндоглин (sEng) представляет собой процессированную форму рецептора по трансформирующему фактору роста (TGF)- β 1 и TGF- β 2. Данный рецептор является потенциальным антиангиогенным фактором, препятствующего связыванию фактора TGF- β 1 с его рецептором, и потому воздействует на образование оксида азота, вазодилатацию и образование капилляров эндотелиоцитами *in vitro* [106]. У животных моделей sEng (другой антиангиогенный белок) действует совместно с sFlt-1 для индуцирования ПЭ-образного заболевания в тяжелой форме [102].

PAPP-A – это крупный высокогликозилированный белок, образованный путем выработки трофобластных клеток. Было продемонстрировано, что PAPP-A является полученным из синцитиотрофобласта инсулиноподобным фактором роста, при помощи которого строится белковая протеаза [58]. Считается, что система инсулиноподобного фактора роста играет важную роль в плацентарном росте и развитии. Поэтому неудивительно, что низкие уровни сывороточного PAPP-A связаны с большим количеством случаев заболеваемости ПЭ. Повышенные уровни PAPP-A в сыворотке крови матери наблюдаются при установленной ПЭ [16, 33, 34, 176]. Многоцентровое исследование 8839 женщин продемонстрировало значительную взаимосвязь между PAPP-A на уровне пятого перцентиля или ниже и преждевременными родами при задержке внутриутробного развития, ПЭ и мертворождением [124].

Прогностические модели оценки индивидуального риска поздней ПЭ основаны на сочетании уровней PAPP-A первого триместра и отношением sFlt-1/PlGF второго триместра (показатель обнаружения: 87,5% при фиксированном отношении ложноположительных результатов: 5%) [123]. При беременностях с развитием ПЭ концентрация PlGF и PAPP-A в сыворотке крови матери понижается. Данные белки вырабатываются трофобластами, и их пониженная

концентрация в сыворотке крови матери предположительно отражает замедленное образование плаценты [147].

Ингибин-А и активин-А являются гликопротеинами и частью семейства TGF- β . Оба гликопротеина обильно высвобождаются плодоплацентарной единицей во время беременности. Ингибин-А, играющий важную эндокринную роль в отрицательной обратной связи гонадотропинов и активина-А, вовлечен в различную биологическую активность [70]. Концентрация ингибина-А и активина-А, которые также вырабатываются трофобластами, повышается у женщин с ПЭ, что может отражать плацентарный компенсаторный механизм для продвижения трофобластной инвазии в случаях, когда данный процесс ослаблен [124]. Ингибин-А в качестве прогностического фактора ПЭ показал противоречивые результаты. Хотя повышенный уровень ингибина-А в сыворотке в значительной степени связан с последующей ПЭ, уровни ингибина-А обладают слабой чувствительностью в отношении прогнозирования ПЭ [92, 170]. В отчетах других исследований указано, что уровни ингибина-А второго триместра являются наилучшими прогностическими факторами ПЭ, наряду с несколькими маркерами по скринингу на синдром Дауна [135, 156].

Разница в уровнях активина-А выше при поздней ПЭ, чем при ранней ПЭ, хотя в случае других маркеров (PIGF, плацентарный протеин-13 (PP-13), ингибин-А, sEng, пентраксин-3 и Р-селектин) ситуация противоположна (50). Ингибин-А и активин-А повышены до 14 недель при беременностях с ПЭ [163, 186].

PP-13 является частью суперсемейства галектинов (определяется как галектин 13), семейства карбогидрат-связывающих белков, так называемых β -галактозид-специфичных лектинов в синцитиальном слое трофобластов [86, 187]. Сывороточный PP13 постепенно повышается в два-три раза перед родами при нормальном течении беременности [87]. Начиная с 5–7 недели беременности уровень сывороточного PP13 при ПЭ существенно понижается по сравнению с уровнем при нормальной беременности [42, 69]. Повышенное отделение субклеточных омертвевших микрочастиц является наиболее вероятным источником высокой концентрации PP13 в крови матери по мере развития ПЭ.

Степень тяжести признаков ПЭ пропорциональна повышению PP13, начиная с первого и до третьего семестра [42, 69]. Сочетание PP13 с дополнительными маркерами при прогнозировании ПЭ увеличивало показатель обнаружения [23, 56, 128]. Когда PP-13 был выражен в виде нескольких зависимых от возраста медиан, обусловленных беременностью, у пациенток в группе сравнения, значение МоМ было на уровне 0,2 в отношении ПЭ, а соответствующая чувствительность составляла 79% со специфичностью 90% [121]. Недавно авторы Gonen et al. вывели в отчетах, что комбинирование PP13 с демографическими характеристиками и историей болезни пациентов, а также с показателем MAP улучшало прогностические характеристики, достигая показателя обнаружения 92% при 12% ложноположительных результатов [168].

Дизинтегрин и металлопротеаза 12 (ADAM12) – это протеаза белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста. Низкие уровни ADAM12 отражают повышенную концентрацию инсулиноподобного фактора роста в связанном состоянии, что препятствует плацентарному росту и развитию [112, 179]. В недавних исследованиях оценивалась связь между низким уровнем ADAM12 и ПЭ, однако были получены противоречивые результаты [68, 101, 146]. Авторы Spencer et al. продемонстрировали всего лишь умеренную прогностическую эффективность ADAM12 в отношении ПЭ при показателе AUC на уровне 0,694 только по ADAM12 и AUC 0,714 при комбинировании ADAM12 и PAPP-A [146]. Авторы Katherine et al. указали в отчетах, что медианные уровни ADAM12 были значительно ниже у пациенток с ПЭ по сравнению с теми, у кого данное заболевание отсутствовало (0,81 по сравнению с 1,01 МоМ; $p < 0,04$), но ADAM12 не обладал достаточной прогностичностью в отношении ПЭ с получаемым в результате показателем AUC на уровне 0,58 (95% ДИ: 0,50, 0,67) [72].

Цистатин С является установленным маркером почечной функции, концентрация которого увеличивается по мере уменьшения скорости клубочковой фильтрации [100]. Плацентарная экспрессия цистатина С повышается в соответствии с уровнями матричной РНК и белка при ПЭ, что позволяет

предположить усиленный синтез и секрецию белка цистатина С. Это может влиять на повышенный уровень цистатина С в плазме крови матери, наблюдаемый при ПЭ [188]. Средняя концентрация цистатина С в первом триместре беременности значительно выше у женщин, у которых в дальнейшем развивается ПЭ (средняя величина, 0,65 мг/л), по сравнению с теми, у кого беременность протекает нормально (средняя величина, 0,57 мг/л, $p = 0,0001$) [177].

Пентраксин 3 (ген, стимулированный фактором некроза опухолей-14) принадлежит к тому же семейству, что и С-реактивный белок и сывороточный амилоидный Р-компонент. Пентраксин 3 состоит из 381 аминокислоты [40]. Воспалительная реакция в организме матери с выявленной ПЭ при повышенном уровне пентраксина 3 является маркером воспаления из того же класса молекул, к которому принадлежит С-реактивный белок [32].

Р-селектин является членом семейства селектинов адгезивных молекул клеточной поверхности. После активации Р-селектин экспрессируется тромбоцитами и эндотелиальными клетками. Данная адгезивная молекула клеточной поверхности играет ключевую роль в реакции на воспаление за счет поддержки пополнения и активации циркулирующих лейкоцитов, а также в коагуляции за счет образования «переносимого кровью» тканевого фактора, получаемого из лейкоцитов [60, 144]. Р-селектин быстро распространяется с клеточной мембраны активированных тромбоцитов, и считается, что данное высвобождение влияет на большинство растворимых изоформ молекул, обнаруживаемых в плазме крови [81]. ПЭ связана с повышенной активацией тромбоцитов [35, 98, 206]. Микрочастицы с прокоагулянтной активностью, воздействующие на Р-селектин, высвобождаются из активированных тромбоцитов и обнаруживаются в периферической крови женщин с ПЭ [26, 113]. Кроме того, растворимый Р-селектин периодически, хотя не постоянно, наблюдался в повышенной концентрации в сыворотке или плазме крови пациенток с ПЭ [43, 75, 79, 127]. Однако в отчете недавнего исследования указано, что уровни Р-селектина, каталазы и супероксид – дисмутаза не

отличались существенно у пациенток с ПЭ (группа случаев с неблагоприятным исходом) и беременных женщин с нормальным артериальным давлением (группа сравнения) ($p > 0,05$) [134]. Поскольку в предыдущих исследованиях были продемонстрированы противоречивые результаты, должно быть проведено более глубокое исследование, прежде чем можно будет принять P-селектин в качестве прогностического маркера ПЭ.

Внеклеточный HbF (фетальный гемоглобин) в недавнее время был предложен в качестве нового прогностического биомаркера ПЭ [9]. Гипотетически данный маркер также является этиологическим фактором данного состояния [39, 76]. Авторы Centlow et al. обнаружили повышенную регуляцию генов HbF и накопление внеклеточного HbF в плацентарных сосудах при ПЭ [64]. Более того, поглотитель гема и антиоксидантный альфа(1)-микроглобулин (A1M) повышается параллельно с фетальным гемоглобином [76]. После необъясненной плацентарной гипоксии повышенная регуляция плацентарных генов HbF и белков вызывает образование активных форм кислорода, окислительного повреждения и недостаточность плацентарного барьера при ПЭ [76]. Дефектный плацентарный гематопоз приводит к недостаточности плацентарного барьера, результатом чего становится эндотелиальная дисфункция, гипертензия и протеинурия, каждая из которых является отличительной чертой ПЭ [76]. При изучении недавних исследований, в которых фетальный гемоглобин был идентифицирован в качестве прогностического биохимического маркера ПЭ в первом и втором триместре, авторы Anderson et al. обнаружили существенно повышенные уровни HbF и A1M в группе пациенток с ПЭ [29, 30, 31].

Способ наследования предрасположенности к ПЭ, вероятно, является полигенным, и находится под влиянием различных патогенов. Гены-«кандидаты» различных биологических путей, включая иммунную систему, контроль сосудистого сопротивления, свертывание крови, а также вовлеченные в пути сигнальной системы клетки и метаболические процессы являются объектом многих исследований генетических связей в силу того, что гипотетически они служат причиной развития ПЭ и связанных с ней осложнений [37]. В ряде

систематических обзоров и метаанализов оценена связь между материнскими генами-«кандидатами» и ПЭ [20].

В «Обзоре эпидемиологии человеческого генома (HuGE)» метаанализ показал более высокий риск развития тяжелой формы ПЭ при полиморфизме rs6025 (отношение шансов = 1,90, 95% доверительный интервал: 1,42, 2,54; 23 исследования, I² = 29%) гена V фактора свертываемости крови (проакцелерин, лабильный фактор) (F5), мутации гена (F2) фактора свертываемости крови II (тромбин) G20210A (rs1799963) (отношение шансов = 2,01, 95% доверительный интервал: 1,14, 3,55, 9 исследований, I² = 0%), полиморфизме гена лептинового рецептора (LEPR) rs1137100 (отношение шансов = 1,75, 95% доверительный интервал: 1,15, 2,65; 2 исследования, I² = 0%) и тромбофилической группе генов (отношение шансов = 1,87, 95% доверительный интервал: 1,43, 2,45, I² = 27%) [37].

В 2012 г. было обнаружено, что с ПЭ связаны семь генетических вариантов. Генетические варианты в ACE (ангиотензин-преобразующий фермент) или рядом с ACE, CTLA4 (цитотоксический белок-4, ассоциированный с Т-лимфоцитами), F2 (фактор 2), FV (фактор V, два варианта), LPL (липопротеин-липаза) и SERPIN1 (ингибитор серпин-пептидазы) 1 были связаны с ПЭ. Результаты данного метаанализа позволяют предположить, что следующие системы могут играть роль в патогенезе ПЭ: ренин-ангиотензиновая система, свертывание крови и фибринолиз, липидный метаболизм и воспаление [90]. В будущих полногеномных исследованиях (GWAS) обязательно будут изучаться однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), идентифицированные в качестве факторов генетического риска ПЭ.

1.2. Перспективы диагностики преэклампсии.

Иммуностимулирующие свойства бесклеточной ДНК известны уже более 50 лет [165]. Человеческая фетальная ДНК запускает *in vitro активацию* NF-κB, в результате чего образуется провоспалительный IL-6 в линии В-клеток человека и

в мононуклеарных клетках периферической крови беременных и небеременных женщин [53]. Ввод человеческой фетальной ДНК (но не ДНК взрослого) беременным мышам линии BALB/c приводил к резорбции фетальной жидкости с повышенным уровнем фактора некроза опухолей- α и IL-6, а также инфильтрации воспалительными клетками в области плацентарной площадки [53]. Фетальная ДНК из плаценты и молекул плацентарно – специфической матричной РНК также легко выявляется в плазме крови матери. Кроме того, между появлением фетальной ДНК и риском развития ПЭ имеется иммунный ответ разной интенсивности [120] и, следовательно, самые высокие уровни - у женщин с синдромом HELLP [110, 190]. Повышение скрытой ДНК при ПЭ отражает повышенный уровень гибели гипоксических клеток. Концентрация ДНК, высвобожденной в супернатант из плацентарного эксплантата, повышается при ослабленной оксигенации [110]. Таким образом, плацентарная ДНК, высвобожденная в кровоток матери, может быть связывающим фактором при системной воспалительной реакции ПЭ. Значение бесклеточной фетальной ДНК (cffDNA) в плазме крови матери в качестве индикатора ПЭ впервые обсуждалось в отчете по небольшому исследованию такими авторами, как Lo et al. [71]. Они обнаружили, что среди 20 женщин с ПЭ и 20 членов группы сравнения соответствующего гестационного возраста в третьем триместре плазменный уровень cffDNA был повышен приблизительно в пять раз у женщин с ПЭ. В настоящее время выполнено несколько многоцентровых исследований для подтверждения прогностического значения cffDNA для прогнозирования и мониторинга ПЭ в сочетании с другими потенциальными маркерами (например, Р-селектин, PAPP-A, PP-13, sFlt-1, sEng и PlGF) [115]. В недавнем обзоре статей на основе стандартизованного анализа указано, что в 11 из 13 исследований продемонстрировано повышение уровня cffDNA у беременных женщин с развившейся впоследствии ПЭ. Кроме того, во всех четырех исследованиях, где изучалась ранняя ПЭ или ПЭ в тяжелой форме, показаны значительно увеличенные уровни cffDNA до наступления заболевания [22].

RASSF1A – это ген – супрессор опухолевого роста, который часто инактивируется повышенным уровнем метилирования промотора фактора при различных опухолях [47]. Поскольку плацента является единственной доброкачественной тканью, демонстрирующей высоко метилированный профиль RASSF1A, количественное определение гиперметилированного RASSF1A может использоваться в качестве эпигенического маркера по cfDNA [139]. Авторы Parantoniou et al. измеряли уровни бесклеточной ДНК (cfDNA) и cffDNA в образцах крови на 11–13 неделе беременности. Данные уровни значительно повышались у женщин с ПЭ по сравнению с женщинами с неосложненной беременностью (средняя величина cfDNA: 9402 по сравнению с 2698 gEq/mL; средняя величина cffDNA: 934,5 по сравнению с 62 gEq/mL, соответственно). В соответствии с анализом кривой рабочих характеристик были выбраны предельные значения 7486 gEq/mL по cfDNA и 512 gEq/mL по cffDNA. Это обеспечивало чувствительность на уровне 75% и 100%, а также специфичность на уровне 98% и 100%, соответственно, для идентификации женщин с риском развития ПЭ [28].

Количественное определение бесклеточной фетальной ДНК является перспективным маркером прогнозирования ПЭ. Однако в связи с неоднородностью в опубликованных исследованиях нельзя сделать точного заключения о статистической и клинической значимости данного потенциального маркера.

МикроРНК (miRNA) представляет собой некодирующие матрицы РНК, обеспечивающие критическое посттранскрипционное регулирование экспрессии генов у здоровых и больных лиц за счет специфичного по последовательности связывания с 3'-нетранслируемой областью целевых транскриптов матричной РНК (mRNA) [61]. В недавних исследованиях идентифицирован избыток miRNA в здоровой плаценте, развивающейся в соответствующие сроки [49, 118, 196], и изменения в miRNA в случае ПН, что подчеркивает роль подачи сигналов miRNA при развитии ПЭ [49, 118, 122, 142, 196, 211]. С применением количественной ПЦР в режиме реального времени авторы Murphy et al. идентифицировали

повышение экспрессии семи miRNA в материнской плазме крови (miR-98, miR-222, miR-210, miR-155, miR-296, miR-181a и miR-29b) у пациенток с тяжелой формой ПЭ [82]. Они также продемонстрировали, что дифференциальная экспрессия данных видов miRNA во время беременности и ПЭ в большинстве случаев прекращалась в течение года после родов, исчезая в кровотоке матери [82]. Недавние исследования плацентоспецифичных miRNA в кровотоке матери [46, 54, 83, 137] подчеркнули их значение в качестве прогностических маркеров ПН.

PAPP-A и PIGF в сыворотке крови матери являются двумя биохимическими маркерами, которые были широко исследованы и показали обнадеживающие результаты по раннему прогнозированию ПЭ [33, 34, 99, 93, 123, 124, 147, 176 205]. При скрининге по толщине воротникового пространства плода (NT), частоте сердечных сокращений плода, свободному β человеческому хорионическому гонадотропину (β -hCG) и PAPP-A (с использованием специальных алгоритмов по трисомии 21, 18 и 13 при предельном уровне риска 1:100) ориентировочный показатель обнаружения составляет 87,0% по трисомии 21 и 91,8% по трисомии 18 и 13 (при показателе ложноположительных результатов на уровне 2,2% [95]). Добавление PIGF, α -фетопротеина и PI венозного протока для вен повышает показатель обнаружения до 93,3% по трисомии 21 и 95,4% по трисомии 18 и 13, а также сокращает показатель ложноположительных результатов до 1,3%. PAPP-A и PIGF полезны при скрининге на анеуплодию в сочетании с возрастом матери, фетальным NT и материнским сывороточным β -hCG на 11–13 неделе беременности [95]. Так как сывороточные маркеры, изученные в данном исследовании [95], подтверждают свое прогностическое значение в отношении ПЭ, за исключением скрининга на синдром Дауна, скрининг ПЭ и синдрома Дауна могут быть проведены вместе в одно и то же время в первом триместре.

В отчетах трех исследований, проведенных на базе проспективного скрининга в первом триместре в отношении неблагоприятных родовспомогательных результатов в Великобритании Фондом медицины плода, указано преимущество наличия нескольких биомаркеров в прогнозировании ПЭ.

В первой работе в ходе исследований методом случай – контроль было получено сочетание материнских характеристик и ее истории болезни, включая PI маточной артерии и MAP, а также сывороточные уровни PAPP-A, PlGF, PP-13, ингибин-A, активин-A, sEng, пентраксин-3 и P-селектин. Алгоритмы, объединяющие материнские характеристики, а также биофизические и биохимические анализы на 11–13 неделе беременности могли потенциально идентифицировать приблизительно 90%, 80% и 60% случаев беременности, в ходе которой развивается ранняя (< 34 недель), промежуточная (34–36 недель) и поздняя (≥ 37 недель) ПЭ, соответственно, при показателе ложноположительных результатов на уровне 5% [99].

В двух других исследованиях использовались модели сравнения рисков новым методом по Байесу, объединяющим предыдущую информацию о материнских характеристиках и истории болезни, такую как PI маточной артерии и MAP, а также материнские сывороточные PAPP-A и PlGF на 11–13 неделе беременности. Данный метод может идентифицировать высокую пропорцию беременностей с высоким риском ранней ПЭ [140, 204]. Во втором исследовании скрининг по материнским характеристикам с применением PI маточной артерии и MAP позволял выявить 90% случаев ПЭ с необходимостью родов до 34 недели беременности и 57% всех случаев ПЭ при фиксированном показателе ложноположительных результатов на уровне 10% [204]. В третьем исследовании при скрининге на ПЭ с необходимостью родов до наступления 34 недели беременности показатель обнаружения при уровне ложноположительных результатов на уровне 10% составлял приблизительно 50% по материнским характеристикам и повышался приблизительно до 90% при добавлении биофизических маркеров и примерно до 75% при добавлении биохимических маркеров [140]. Данный показатель обнаружения повышался до уровня свыше 95% при использовании алгоритма, сочетающего материнские факторы, биофизические и биохимические маркеры (PAPP-A и PlGF).

Исследование «Скрининг исходов беременности» представило серию моделей, в которых комбинируются биомаркеры, а также клинические и

ультразвуковые данные, прогнозирующие риск ПЭ и ее различных подфенотипов в международной группе беременных нерожавших женщин с низкой степенью риска (количество = 5623) [160]. Авторы выполнили однофакторный анализ 47 биомаркеров, и были построены прогностические модели по ПЭ, ПЭ с беременностью при родах на сроке ≥ 37 недель, ПЭ с беременностью при родах на сроке < 37 недель и ранней ПЭ (беременность при родах на сроке < 34 недель). Финальная модель по прогнозированию ПЭ включала PIGF, MAP и индекс массы тела на 14-16 неделе беременности, а также употребление трех или более порций фруктов в день и среднее значение индекса резистентности маточной артерии при помощи многопараметрического моделирования. Ни одна из моделей не включала показатель PAPP-A, который, как сообщалось в отчетах ранее, позволял достаточно хорошо спрогнозировать ПЭ у женщин с различным количеством родов в прошлом и с разной степенью риска. У нерожавших женщин комбинирование нескольких биомаркеров и клинических данных обеспечивало прогнозирование ПЭ на умеренном уровне [160].

Были разработаны прогностические модели логистической регрессии по ранней и поздней ПЭ у испанской проспективной типологической группы из 9462 беременностей с прохождением скрининга первого триместра. Наилучшая модель по ранней ПЭ (количество = 57, 0,6%) включала априорный риск, MAP, PI маточной артерии, PIGF и sFlt-1. По ранней ПЭ данная модель позволяла достичь показателя обнаружения на уровне 87,7% и 91,2% и числа ложноположительных результатов на уровне 5% и 10%, соответственно. По поздней ПЭ (количество = 246, 2,6%) наилучшая модель включала априорный риск, MAP, PI маточной артерии, PIGF и sFlt-1. Данная модель позволяла достигнуть показателя обнаружения на уровне 68,3% и 76,4% при количестве ложноположительных результатов на уровне 5% и 10% [205]. В данном исследовании ангиогенные факторы повышали показатель обнаружения на 11% по ранней ПЭ и на 20% по поздней ПЭ при количестве ложноположительных результатов на уровне 10%. Результаты по ранней ПЭ в данном исследовании [95] сходны с результатами предыдущих исследований [99, 140], но наблюдается заметное улучшение в

прогнозировании поздней ПЭ по сравнению с показателями предыдущих исследований [99, 140].

В соответствии с имеющимся пониманием патофизиологии ПЭ предполагается, что данное заболевание может быть совокупностью синдромов с различными провоцирующими факторами и исходами [181]. Гетерогенный синдром ПЭ с его комплексным патогенезом [52] является ограничением для использования одного клинического фактора риска или биомаркера при беременности на раннем сроке для выявления женщин, у которых впоследствии гарантированно разовьется ПЭ. Прогнозирование ПЭ повсеместно основывается на многопараметрических подходах, поскольку ни один скрининговый анализ не обеспечивает надлежащей оценки риска [84]. Имеется несколько подходящих маркеров ПЭ, и, благодаря тому, что данные маркеры позволяют получить достоверные данные, врачи могут с уверенностью прогнозировать ПЭ в первом триместре. Открытие такого исследования, как анализ фвДНК в материнской плазме, позволит революционным образом изменить имеющиеся подходы к скринингу анеуплодии [108]. Уровни фвДНК заметно повышаются перед проявлением клинических симптомов осложнений, связанных с беременностью, таких как ПЭ, задержка внутриутробного развития, преждевременные роды, предлежание плаценты [111]. Недавние исследования [46, 54, 82, 83, 137] подчеркнули роль плацентоспецифических miRNA в качестве эффективных прогностических маркеров при синдроме плацентарной недостаточности. Требуется последующее более интенсивное исследование для установления генетических маркеров прогнозирования ПЭ на раннем сроке беременности. Требуется проведение широкомасштабных многоцентровых полиэтнических проспективных испытаний с учетом разных рисков развития ПЭ у женщин, чтобы предложить идеальное сочетание маркеров для рутинного скрининга.

1.3. Роль внеклеточной фетальной ДНК в ранней диагностике осложнений беременности

На сегодняшний день стало очевидным, что теория, созданная в начале 1850-х годов и гласящая о плаценте, как непреодолимом барьере для большинства белков и химических веществ между плодом и матерью, неверна. Известно, что генетическая информация плода может представлять собой способ идентификации и верификации генетических аномалий, а также выделения определенных патологий, связанных с матерью. С этой целью применение методов молекулярной биологии в неинвазивной диагностике осложнений беременности оказалось ценным инструментом в генетическом скрининге и при оценке патологических состояний, в отличие от инвазивных методов, которые обладают высокой стоимостью и связаны с большими рисками.

Внеклеточная ДНК плода (далее – фвДНК) является молекулярным биомаркером, который полностью изменил неинвазивную пренатальную диагностику, или скрининг [15]. Он был открыт в 1997 году Lo и соавт., которые доказали наличие последовательности ДНК плода в материнской плазме и сыворотке [108]. Последующие исследования показали наличие более высоких уровней ДНК плода в плазме беременных женщин по сравнению с ДНК плода, выделенной из материнской крови [111]. Основываясь на данных выводах, в качестве метода обнаружения фвДНК стали использовать количественную ПЦР, при этом дальнейшие исследования сфокусировались на клиническом применении данного маркера с определенным акцентом на прогнозировании осложнений беременности, а также пренатальной диагностике и скрининге генетических нарушений плода [74, 173]. Последний подход заслужил значительного внимания, т.к. он имеет ряд преимуществ по сравнению с методом выделения исходных клеток плода, такие как скорость, надежность, низкая стоимость и меньшее количество трудоемких протоколов [74].

Точное происхождение фвДНК неизвестно. Предполагают, что фвДНК главным образом происходит из плаценты, о чем свидетельствует быстрое

выведение ДНК плода из крови матери после родов, в отличие от большинства клеток плода, сохраняющихся в крови матери спустя недели после родов [74].

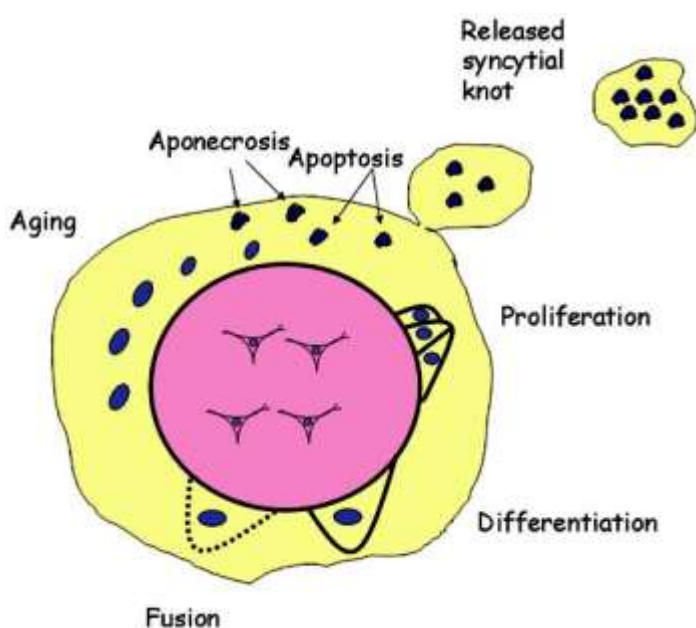


Рисунок 1. Механизм перемещения трофобласта в материнский кровоток.

Цитотрофобласт пролиферирует и дифференцируется во время развития плода. Затем он соединяется с синцитиотрофобластом, они созревают и образуют апоптотические тельца, которые перемещаются в материнский кровоток в форме синцитиальных узелков. Если апоптотический механизм не срабатывает, происходит некроз и некротический материал попадает в материнский кровоток. Sifakis S. et al 2015 [173].

(Подписи к рисунку (по часовой стрелке): Созревание, Апопекроз, Апоптоз, Синцитиальный узелок, Пролиферация, Дифференцировка, Слияние).

В дополнение к этим доказательствам, отсутствие циркулирующей ДНК плода в случае плацентарного мозаицизма подтверждает происхождение фвДНК из плаценты, а не самого плода [74, 173]. Более поздние исследования показали, что основным источником фвДНК являются клетки трофобластического происхождения, которые высвобождаются из синцитиотрофобласта в виде

синцитиальных узелков. Эти клетки претерпевают апоптоз, и нуклеиновые кислоты, содержащиеся внутри, в том числе ДНК и РНК, высвобождаются в материнский кровоток (рис. 1) [173]. В дополнение к апоптотическим механизмам, происходящим в результате нормального старения синцитиотрофобласта, случайная поломка или некроз также могут быть одной из причин высвобождения бесклеточных нуклеиновых кислот. Идея о том, что апоптотические или некротические пути деградации синцитиотрофобласта могут изменять количество ДНК плода, представляет значительный интерес [107].

В последнее время определение уровня фвДНК начинает использоваться в пренатальном скрининге эмбриональных анеуплоидий, в частности синдрома Дауна [172]. В данном обзоре мы в большей степени остановимся на связи фвДНКи таких патофизиологических изменений во время беременности, как преэклампсия (ПЭ), внутриутробная задержка роста (ЗРП) и преждевременные роды (ПР), нежели на применении данного биомаркера в неинвазивной диагностике.

ПЭ представляет собой патологическое состояние, которое возникает во время беременности, характеризуется гипертензией, протеинурией и отеками и наступает во второй половине беременности. ПЭ развивается в результате неправильного развития плаценты вследствие нарушения дифференцировки трофобласта. Это состояние является основной причиной гибели плода с относительно высоким процентом возникновения в развитых странах мира. На сегодняшний день нет ни одного достоверного параметра, который можно использовать для прогнозирования развития ПЭ, и, таким образом, большое количество исследований сосредоточено на разработке новых методов в этой области. В различных исследованиях сравнивались уровни фвДНКпри беременностях, в дальнейшем осложненных ПЭ. Исследователи пытались сделать выводы о степени причастности фвДНКк развитию осложнений. Спустя два года после открытия фвДНК Lo и соавт. в 1997 в небольшой группе из 20 женщин с ПЭ те же исследователи показали, что уровни фвДНКбыли увеличены в 5 раз по сравнению с группой контроля [109]. Эти результаты были подтверждены более

поздними исследованиями, в том числе Leung и соавт. [103] и Zhong и соавт. [208], в которых было примерно одинаковое увеличение фвДНК у женщин с ПЭ [103, 105, 198, 208]. Также стоит отметить, что уровень cff-DNA, по-видимому, увеличивался до появления клинических симптомов. Levine и соавт., опираясь на эти выводы, провел широкое исследование, включившее группу из 120 беременных женщин с ПЭ и такого же числа в группе контроля, и наблюдал двух- и пятикратное увеличение уровня фвДНК у женщин с данным осложнением [105]. Кроме того, было отмечено двухфазное повышение уровня фвДНК в сыворотке крови у женщин с ПЭ, которых наблюдали между 17 и 28 неделями беременности, а также за 3 недели до появления клинических симптомов [105]. Повышенные уровни фвДНК у женщин с ПЭ были проверены с использованием второй методики обнаружения, основанной на количественной оценке последовательности DYS14 вместо таргетного гена SRY [212]. Было показано увеличение уровней фвДНК до 10 раз по сравнению с группой сравнения [212]. Изначально считалось, что сочетание усиленного выделения ДНК из патологически развивающейся плаценты и сниженного клиренса фвДНК вследствие нарушения функции печени и почек связано с повышением уровня фвДНК [105, 198].

В отличие от данных вышеупомянутых исследований, в 2007 года Crowley и соавт. продемонстрировали фактическое отсутствие разницы в уровнях фвДНК в группах с ПЭ и группой контроля, измеряя количество гена SRY [55]. Эти результаты были подтверждены другими исследованиями, демонстрирующими, что уровень фвДНК значительно не отличался при нормально протекающей беременности и беременности, осложненной ПЭ [149, 182].

Предыдущее исследование показало, что уровень фвДНК в сыворотке был выше у женщин с ПЭ по сравнению с группой контроля в промежутке от 17 до 20 недели беременности; однако эти уровни существенно не отличались от контроля на ранних сроках беременности (13-16 недель) [105]. Sifakis и соавт. [171] показали, что уровень фвДНК увеличивался в раннем гестационном периоде (11-13 недель) у беременных женщин, которые затем страдали тяжелой ПЭ на более

поздних сроках; в частности, у женщин с поздней (мягкой) ПЭ, уровень фвДНК был аналогичен уровню у женщин с нормально протекающей беременностью [171]. Кроме того, повышение уровня фвДНК не было столь велико, как отмечалось в других исследованиях [103, 105, 198, 208], так как авторы использовали более чувствительный метод количественной оценки последовательности DYS14. Разница в результатах в последнем исследовании могла произойти из-за нарушений перфузии плаценты, что вызывает оксидативный стресс и апоптоз на ранней стадии до появления клинических симптомов. В противоположность этому, Levine и соавт. предположили, что апоптоз трофобласта происходит вторично в ответ на гипоксию, которая требуется для дифференцировки плаценты в первом триместре, а уровень фвДНК остается стабильным на ранних сроках беременности при ПЭ [105]. В дополнение к этому, недавний отчет пролил свет на предполагаемые патофизиологические механизмы, которые объясняют зависимость ПЭ от уровня фвДНК. Scharfe-Nugent и соавт. предположили, что фвДНК имеет провоспалительное действие, а быстрое возрастание его уровня во время беременности может играть роль сигнала об опасности для матери о том, что клетки плода гибнут [165]. Это было продемонстрировано на BALB/c мышах путем измерения уровня интерлейкина-6 (ИЛ)-6, которое проводили после внутрибрюшинного введения фвДНК. Кроме того, этот эффект оказался зависимым от Toll-подобного рецептора-9 (TLR-9)-, так как было показано, что TLR-9(-/-) мыши были защищены от резорбции плода и развития воспаления [165].

Таким образом, данные о роли повышения уровня фвДНК при ПЭ противоречивы [105, 171]. Тем не менее, сформировано общее мнение, подтвержденное большим количеством экспериментальных результатов, что уровень фвДНК увеличивается до развития симптомов патологического состояния и может быть использован в качестве прогностического маркера при преэклампсии, по крайней мере, при тяжелой ПЭ и ее раннем начале. Механизмы

оказались более сложными, чем предполагалось ранее, и включают в себя сочетание путей апоптоза, гипоксии и воспаления.

ЗРП является осложнением беременности различной этиологии. Данное состояние характеризуется нарушением внутриутробного роста плода и ассоциировано с перинатальной заболеваемостью и смертностью так же, как сердечно – сосудистые заболевания у взрослых людей [70]. Хотя считается, что ряд различных механизмов приводят к развитию ЗРП, плацентарная недостаточность является одной из лидирующих причин. Исследований, в которых изучали зависимость возникновения ЗРП и уровня фвДНК, меньше, чем посвященных ПЭ. В исследовании 2003 года Sekizawa и соавт. был рассмотрен вопрос об уровне фвДНК при беременностях, осложненных ЗРП. Было обнаружено, что уровни фвДНК при беременности, осложненной ЗРП, были равны уровню в группе контроля, хотя исследование включало только 9 случаев ЗРП и 20 случаев в группе контроля [167]. В более позднем исследовании в 2006 году Smid и соавт. продемонстрировали повышенный уровень фвДНК у плода с ЗРП [175]. Эти выводы были подтверждены еще более поздними исследованиями Albergu и соавт. [27] и Аль Nakib и соавт. [126], которые рассматривали большие выборки по сравнению с Sekizawa и соавт. в 2003 году [167]. Уровень фвДНК был значительно выше при беременностях, осложненных ЗРП, чем при нормально протекающих [27, 126], что частично было обусловлено плацентарной недостаточностью [126].

Преждевременными считаются роды, произошедшие до 37 недели беременности. Это связано с преждевременным созреванием шейки и разрывом плодных оболочек. Данное состояние является главной причиной смерти в неонатальном периоде и дальнейшей инвалидности [174]. Предполагают участие нескольких этиологических факторов в развитии данного состояния, в том числе недостаточное кровоснабжение трофобласта [63, 80, 88].

Попытки использования фвДНК в качестве прогностического биомаркера гипоксии плаценты предпринимались во многих работах последних лет. Предварительное исследование Hoegli и соавт. в 2002 не показало значимой

разницы в числе эритробластов у 47 беременных с преждевременным началом схваток на 20 и 34 неделе беременности и группой контроля [80]. В 2005 Farina и соавт. показали повышение уровня фвДНКв сыворотке матери в группе пациенток с высоким риском спонтанного преждевременного родоразрешения путем самопроизвольных родов или преждевременного разрыва плодных оболочек [63]. С другой стороны, Planes и соавт. продемонстрировали отсутствие существенной зависимости между уровнем фвДНКс 22 по 24 неделю беременности и гестационным возрастом недоношенного ребенка, что подтвердило гипотезу о том, что уровень фвДНКне может предсказать ПР у женщин с укорочением шейки матки [88]. Данные, полученные Farina и соавт., не противоречат результатам недавнего исследования, в котором уровень фвДНКбыл использован в качестве предиктора ПР в общей выборке из 1316 женщин [91]. Статистически значимая разница наблюдалась между уровнем фвДНК выше 95-го центиля, измеренного рутинным генотипированием по RHD на 25 неделе беременности и последующим спонтанным родоразрешением с особенно значимой взаимосвязью при родах на сроке до 34 недель [91]. В меньшей выборке из 60 беременных, в том числе 30 пациенток с угрозой ПР, средние уровни фвДНКбыли примерно в 6 раз выше в группе с наличием патологии гестационного процесса по сравнению с группой сравнения [65]. Кроме того, Quezada и соавт. [153] измеряли фракцию фвДНК в общей сложности у 3169 беременных на 10-19 неделях беременности, среди которых было 103 беременных, родивших на сроке <37 недель, 21 пациентка, родившая на сроке <34 недель и 82, родивших в срок между 34 и 37 неделями. Авторы не обнаружили никаких существенных различий между группой с ПР и группой контроля [153]. Наиболее убедительным является отчет, предполагающий вероятный механизм взаимосвязи между ПР и уровнем cff-DNA, который был представлен в исследовании Scharfe-Nugent и соавт. В этом исследовании авторы предположили, что фвДНКиграет роль провоспалительного фактора и способен активировать ядерный фактор (NF)-кВ через деградацию IкВ, в результате чего производится провоспалительный ИЛ-6 в мононуклеарных клетках периферической крови

человека [165]. ПР были индуцированы у мышей после внутрибрюшинного введения ДНК плода на 10-14 неделях беременности, в то время как у TLR9 (-/-) мышей такой эффект не наблюдался, что позволило выделить TLR9 как потенциальную мишень для терапевтического воздействия при риске преждевременных родов [165].

Принимая во внимание имеющиеся данные, остается спорным вопрос о том, предшествует ли повышение уровня фвДНК в случае ПР клиническому событию и может ли фвДНК использоваться в качестве суррогатного прогностического маркера. Общеизвестно то, что фвДНК высвобождается в результате раннего нарушения плацентарного барьера до начала родовой деятельности [63]. Однако в большинстве случаев повышенный уровень фвДНК является, вероятно, следствием другого процесса, инициирующего начало родовой деятельности, а не предиктивным маркером данной патологии. В соответствии с этим выводом недавнее исследование, проведенное Рооп и соавт., показало, что уровни фвДНК матери и плода изменялись за счет влияния матери, хотя по скорректированным данным в 20 случаях спонтанного преждевременного родоразрешения уровень значительно не отличался от такового у 1805 здоровых беременных [149].

фвДНК был рассмотрен в качестве суррогатного биомаркера при других патологиях течения беременности помимо ПЭ, ЗРП и ПР. Vora и соавт. сообщили о корреляции между индексом массы тела (ИМТ) и уровнем фвДНК у 16 женщин с ожирением и 14 женщин с низкой массой тела, по сравнению с 10 беременностями из группы контроля, предполагая, что это может отражать увеличение некроза адипоцитов и стромы сосудов, встречающегося при ожирении [194]. Это было подтверждено экспериментами *in vitro*, в которых стромальные клетки сосудов показали повышенную экспрессию белка каспазы-9 и каспазы -3, что позволило предположить, что у беременных с ожирением процесс ремоделирования жировой ткани может привести к увеличению фвДНК [73]. Уровень фвДНК также исследовался у беременных с предлежанием плаценты. Полученные результаты показали, что на 15-28 неделях беременности

концентрация гиперметирированного RASSF14A была значительно выше в группе с наличием патологии (n = 14) по сравнению с группой контроля (n = 161) [97]. Кроме того, cff-DNA, по-видимому, играет важную роль при развитии рвоты беременных в качестве прогностического маркера проявления клинических симптомов. Как и в предыдущем исследовании, концентрация фвДНК была значительно выше у 16 женщин, страдающих от данного состояния (диапазон значений 21,6 -311,2 геномные эквиваленты / мл) по сравнению с 23 женщинами с нормально протекающей беременностью (диапазон значений 6,6 -59,6 геномные эквиваленты / мл) [166]. Та же группа исследователей опубликовала краткий отчет через два года, подтверждая вышеупомянутые выводы в большем объеме выборки из 157 пациенток в группе контроля и 45 пациентов в группе с наличием патологии [183]. В этом исследовании было обнаружено, что уровень фвДНК значительно выше (примерно в 2,5 раза) в случаях с тяжелой формой по сравнению с мягкой и умеренной формами данного состояния (1.26- и 1.6-кратное увеличение) [183]. Предполагается, что причиной этого могла стать гиперактивация материнской иммунной системы, которая ответственна за наступление рвоты беременных, в то время как иммунотолерантность матери только формируется. Это, в свою очередь, может привести к врастанию трофобластов из плаценты в миометрий [119, 183].

Открытие эмбриональных клеток и фвДНК совершило революцию в области неинвазивной пренатальной диагностики и открыло новые возможности в области акушерских исследований. Обнаружение фвДНК с текущими познаниями в методике количественной ПЦР проводится легко, быстро и недорого, и таким образом обладает преимуществом перед рядом старых методик, включая выделение клеток плода. Хорошо известно, что повышение уровня фвДНК может быть использовано в качестве прогностического маркера для ранней диагностики патологических состояний, связанных с беременностью, таких как ПЭ, ЗРП, ПР, предлежание плаценты и рвота беременных, хотя существуют противоречивые данные, свидетельствующие о том, что уровень фвДНК может увеличиваться на ранних стадиях патологических изменений, а впоследствии уменьшаться по мере

прогрессирования патологического состояния. Несмотря на это несоответствие, уровень фвДНК совершенно точно увеличивается до начала проявления клинических симптомов осложнений беременности. Механизмом действия, предположительно, является сочетание апоптоза, апонекротических и воспалительных явлений, которые проявляются в ходе развития плаценты.

Таким образом, уровень свободной внеклеточной ДНК может являться перспективным маркером для объективной диагностики и оценки тяжести ПЭ. Современные молекулярные методы позволяют с высокой точностью дифференцировать источник происхождения этой ДНК, однако в литературе отсутствуют однозначные данные о сравнительных диагностических характеристиках свободной внеклеточной ДНК материнского или плодового происхождения, что требует дополнительных исследований. Также открытым остается вопрос о связи иммунологических реакций организма матери с продукцией

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

С 10 октября 2015г. по 01 августа 2017г. проведено исследование «случай – контроль», в которое была включена 181 беременная. В зависимости от исхода беременности и родов, пациентки разбивались на две группы. В I группу вошло 97 беременных с манифестацией ПЭ на сроках от 26 недель до 40 недель 6 дней, во II - 84 условно здоровых беременных без реализации ПЭ. Был выполнен анализ клинических данных, особенностей протекания данной беременности и её исходов для матери, плода и новорожденного. Все пациенты наблюдались в научно-поликлиническом отделении и были родоразрешены в акушерском отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Критерии включения – одноплодная беременность, добровольное информированное согласие на участие в научном исследовании.

Критерии исключения: тяжелая экстрагенитальная патология, многоплодная беременность, пороки развития плода.

Все беременные женщины, включённые в исследование, были обследованы по стандартной утвержденной схеме. Далее, при включении в исследование и накануне родоразрешения, после письменного добровольного согласия на участие в научном исследовании, проводились заборы биологических сред для реализации цели и задач данной работы.

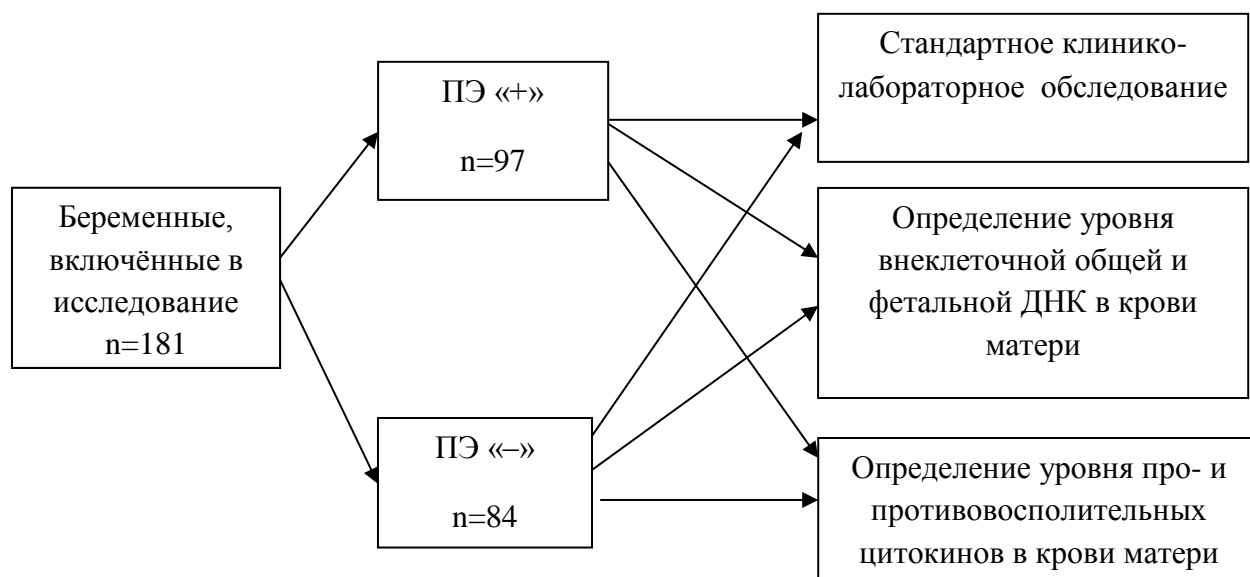


Рисунок 2. Дизайн исследования «случай-контроль».

Диагностика ПЭ основывалась на Международной статистической классификации болезней (МКБ) и соответствовала критериям, разработанным Европейским обществом по изучению АГ – существовавшая ранее; гестационная АГ; преэклампсия; существовавшая ранее АГ с гестационной гипертензией и протеинурией; неподдающаяся классификации АГ.

ПЭ – гипертензия (давление $\geq 140/90$) и протеинурия (содержание белка выше 0,3г в суточной моче). Степень тяжести ПЭ оценивали на основании объективных показателей и клинического состояния пациентки.

В группу пациенток с умеренной ПЭ были включены беременные с артериальным давлением 140-160/90, с протеинурией более 0,3г, но менее 2г/сутки.

В группу пациенток с тяжелой ПЭ включены беременные с артериальным давлением 160/110 и более, с протеинурией более 2г/сутки.

У всей когорты пациенток исследовались венозная кровь.

В процессе выполнения работы были использованы общеклинические, функциональные, молекулярно-генетические, иммунологические и статистические методы исследования.

2.2. Методы исследования

В ходе исследования были использованы современные высокоинформативные методы, с применением реактивов и оборудования ведущих производителей.

2.2.1. Общеклинические методы исследования

Проведено подробное анкетирование и последующий анализ полученных данных, включающих сведения о соматическом и акушерско-гинекологическом анамнезе, наличии прегравидарной подготовки.

На первом этапе проводили наружное акушерское исследование, включающее определение положения, предлежания и позиции плода, размеры окружности живота и высоты стояния дна матки, соответствие полученных размеров сроку гестации. В обязательном порядке выполнялась аускультация с определением частоты сердечных сокращений плода. Все измерения подвергались сравнительному анализу с их нормативными показателями. В случаях доношенной беременности проводилось вычисление предполагаемой массы плода, согласно установленным формулам (Жордания, Джонсона, Ланковича, Якубовой). Всем беременным, включенным в исследование, было выполнено внутреннее акушерское исследование, включающее оценку характера выделений и состояния слизистого и кожного покровов половых губ, промежности, влагалища, шейки матки и паховых лимфатических узлов.

Всем пациенткам, вошедшим в исследование, было выполнено стандартное обследование, которое включало определение группы крови и резус-фактора, клинические и биохимические анализы крови, гемостазиограмму, общий анализ мочи, анализ отделяемого влагалища на флору. АД измерялось ртутным тонометром по методу Н.С. Короткова через 5 мин отдыха пациентки, в положении сидя в удобной позе, рука находилась на столе на уровне сердца. Нижний край стандартной манжеты (ширина 12-13 см, длина 35 см) устанавливался на 2 см выше локтевого сгиба. АД измерялось в состоянии покоя

(после 5 минутного отдыха) 2 раза с интервалом не менее минуты; при разнице равной или более 5 мм рт ст производили одно дополнительное измерение, при этом два последних значения усреднялись. Измерение АД производилось на обеих руках. Показатели АД фиксировались с точностью до 2 мм рт ст.

2.2.2. Специальные методы исследования

Исследование внеклеточной общей и фетальной ДНК в плазме крови матери

Для количественного определения total cfDNA и фвДНК было собрано по пять мл периферической крови беременных женщин в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, и обработаны в течение часа после забора. Плазма была выделена центрифугированием в два этапа при 4 °С: первый - 10 мин, 200 g, второй - 10 мин, 4500 g. Образцы плазмы хранили при температуре -80 °С. В данной работе уровень total cfDNA был оценен количественным ПЦР-анализом путем определения концентрации промотора гена RASSF1A. Оценка уровня фвДНК основана на данных о том, что в геноме плода промотор гена RASSF1A гиперметилирован [44], и, соответственно, концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц фвДНК. Total cfDNA выделяли из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную ДНК переосаждали этанолом с соосаждителем Satellite Red (Евроген, Россия) с предварительной очисткой хлороформом, далее разводили в 13 мкл воды. 10 мкл раствора ДНК использовали в реакции метилчувствительной рестрикции, для выделения гиперметилированного промотора гена RASSF1A. В работе был использован фермент BstUI (NEB, England) 60 Е (единиц активности). Реакцию рестрикции проводили в течение 6 ч при 60°С. После чего ДНК осаждали этанолом, с предварительным удалением рестриктаз с помощью хлороформа. Полученную ДНК растворяли в 10 мкл воды. 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР для контроля рестрикции с праймерами к гену АСТВ. В случае отсутствия ответа оставшийся

раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к RASSF1A. ПЦР-анализ проводили одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, который изготовили из ДНК, выделенной из крови, с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия). Концентрацию стандарта ДНК определили с помощью спектрофотометра (DeNovix, USA). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 (BioRad, USA). Программа ПЦР: 95 °С - 3 мин, 45 циклов: 95 °С 10 с, 60 °С, 30 с 72 °С.

Для подтверждения валидности метода, используемого для определения концентрации фвДНК, была набрана дополнительная группа – 19 женщин без уточненного диагноза на третьем триместре беременности с мужскими плодами и проведено исследование корреляции концентраций гиперметилированной части промотора RASSF 1A и SRY, гена Y хромосомы в плазме крови. Было установлено, что концентрация RASSF1A после обработки рестриктазами коррелирует с концентрацией SRY плазме матери ($r_s = 0.891$; $p < 0,0001$; корреляция Спирмена) (рис.4).

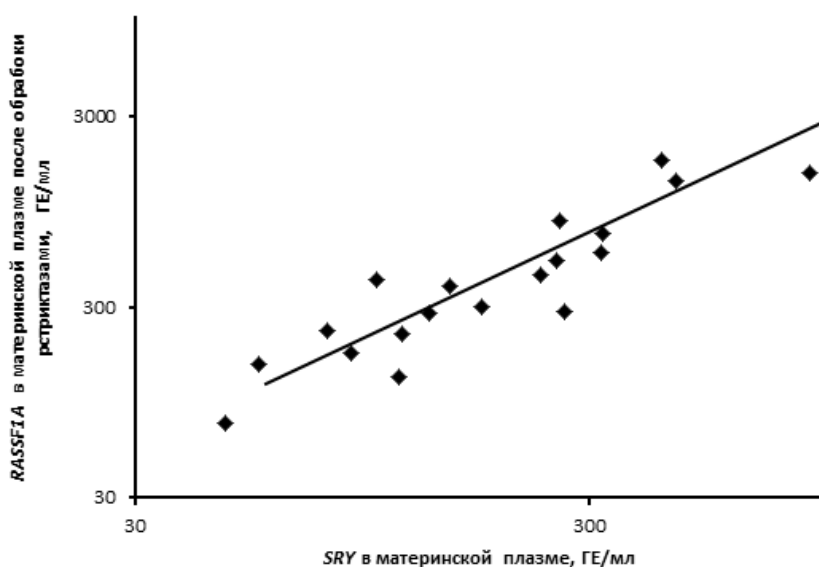


Рисунок 3. Корреляция концентрации RASSF1A и SRY плазмы крови матери ($r_s = 0.891$; $p < 0,0001$; корреляция Спирмена).

Исследование про- и противовоспалительных цитокинов

Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ и TNF α в плазме периферической крови проводили мультиплексным методом с использованием стандартной 8-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США). Содержание интерлейкинов представлено в пг/мл.

Биохимические методы

В работе был использован биохимический анализатор «Ультра» фирмы «КОНЕ» (Финляндия). При помощи данного прибора, было проведено определение в сыворотке крови содержания пяти общих биохимических параметров и печеночных ферментов.

Иммунологические методы

Определение в крови специфических антител к вирусу простого герпеса и цитомегаловирусной инфекции классов IgG и IgM проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА), с последующей обработкой результатов на приборе «Мультискан». Полученные результаты выражали величиной титра антител.

Функциональные методы исследования

Ультразвуковое исследование

Ультразвуковой скрининг беременных осуществлялся при помощи приборов «Aloka SSD-680» и «Toshiba-38A» (Япония). Разработанный протокол включал определение таких показателей, как предполагаемая масса плода, данные

его антропометрических показателей и анализ околоплодных структур (зрелость плаценты, количество околоплодных вод, расположение пуповин относительно плода).

У пациенток с заболеваниями мочевыделительной системы проводился ультразвуковой скрининг с учетом таких показателей, как размеры, структура, состояние почечно-лоханочной системы, наличие конкрементов и др.

Допплерометрическое исследование кровотока

Допплерометрия параметров скорости фето-плацентарного и маточно-плацентарного кровотоков в режиме пульсовой доплеровской волны было выполнено всем беременным, включенным в исследование, при помощи ультразвуковых приборов «Aloka SSD-2000» и «Aloka SSD-680».

Кровоток артерии пуповины измерялся в непосредственной близости от пупочного кольца плода. Определение кривых скоростей кровотока (КСК) производилось в дуговых маточных артериях в области нижнего маточного сегмента. Кровоток в средней мозговой артерии измерялся при горизонтальном сканировании головки плода на уровне перекреста зрительных путей. Вычисление систоло-диастолического соотношения (С/Д) проводилось при оценке КСК. Индекс резистентности (ИР) применялся при идентификации нулевых и отрицательных показателей диастолического компонента кровотока. Плацентарный коэффициент (ПК) рассчитывался для одновременного учета изменений кровотока в маточно- и плодово-плацентарном бассейнах. Параметры относились к патологическим при превышении СДО для маточной артерии и артерии пуповины более чем на два стандартных отклонения. В средней мозговой артерии плода СДО считали нормальным в случае его превышения 4,4.

Аntenатальная кардиотокография

Всем беременным, вошедшим в исследование и достигшим срока гестации 34 недели, проводили оценку внутриутробного состояния плода методом антенатальной кардиотокографии на аппаратах 8030А фирмы «Hewlett Packard» (США) и МТ-801 фирмы «Тоитсу» (Япония). Исследование включало определение

характера variability базального ритма сердечных сокращений плода, количество и амплитуду акцелераций, характер, амплитуду и количество децелераций, с последующим вычислением интегрированного показателя состояния плода (ПСП) по установленной формуле.

$$\text{ПСП} = 155 \cdot 10^{-4} (E_{\text{tcp}}) + 87 \cdot 10^{-7} (E_{\text{hma}})^{-2} - 64 \cdot 10^{-4} (E_{\text{hma}}) + 0.33 / \text{Max}_{\text{hma/cp}} + 0.05,$$

где E_{tcp} - общая продолжительность стабильного ритма; E_{hma} - общая амплитуда медленных акцелераций; $\text{Max}_{\text{hma/cp}}$ - отношение амплитуды максимальных акцелераций к максимальному времени стабильного ритма.

В случае получения величины ПСП $\leq 1,0$ регистрировали отсутствие нарушения состояния плода; $>1,0 - \leq 2,0$ – начальные признаки внутриутробного страдания плода; $>2,0 - \leq 3,0$ – выраженные нарушения и более $3,0$ – тяжелое страдание плода.

Морфологические методы исследования

При морфологическом исследовании был изучен 181 послед (плацента, оболочки, пуповина), полученных от 181 родов.

Были использованы такие методы исследования, как:

1. Макроскопический – визуальный анализ состояния последа;
2. Морфометрический – определение массы и размеров плаценты с последующей макроскопической оценкой изменений, включающую подсчет ворсин с различной степенью васкуляризации.
3. Гистологический – подготовка и окраска парафиновых срезов гематоксилин – эозином с последующим анализом.

Подготовка ткани последа проводилась в три этапа: фиксация в 10% нейтральном формалине с фосфатным буфером; обработка на аппарате гистологической проводки тканей («Pool Scientific Instruments», Швейцария); заливка парафином. Далее готовились серийные парафиновые срезы толщиной 4 – 5 микрон. На предметные стекла, покрытые адгезивом, фиксировали срезы с последующей инкубацией в термостате в течение 12 часов при температуре 37°C .

Далее срезы депарафинировали и обезвоживали и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистохимическое исследование (TUNEL)

Ткань плаценты фиксировали в течение 24 ч в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (PBS) при температуре 40С. Затем без отмывания переносили в 30% сахарозу еще на 24 ч при температуре 40С. После этого ткань замораживали в среде для заключения замороженных образцов O.C.T. Combraund («Sakura Finetek», USA). Срезы готовили на криостате Microm HM 525 («Thermo Scientific», UK) толщиной 12 мкм. Реакцию TUNEL проводили с использованием набора «In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein» («Roche», Germany) по рекомендациям производителя с последующим окрашиванием пропидий иодидом в концентрации 2 мкм на PBS всей ДНК. Срезы исследовали на конфокальном микроскопе «Leica SP5» (Germany).

Статистические методы

Результаты наблюдений и обследования каждой беременной заносили в разработанную индивидуальную карту и в электронную таблицу в программе MS Excel.

На персональном компьютере при помощи программного обеспечения “SPSS Statistics 21 for Windows” выполнялась статистическая обработка полученных данных. На первом этапе определялась статистическая шкала имеющихся переменных: номинальная, порядковая или интервальная. В большинстве случаев были применены методы непараметрической статистики.

Медиана (Me) была выбрана в качестве меры центральной тенденции количественных признаков. В качестве интервальной оценки были использованы верхний (H) и нижний квартили (L). Результаты отображались в виде Me (L-H).

С целью сравнения групп применяли такие непараметрические тесты, как: тест Уайта для малых выборок, U тест Вилкоксона-Манна-Уитни для несвязанных

совокупностей по при сравнении 2-х независимых выборок, ранговый коэффициент корреляции по Спирману.

Вероятность ошибки p рассчитывалась при оценке достоверности определенных различий между средними значениями выборок и достоверности корреляции. Вероятность ошибки $p \leq 0,05$, принималась за значимую; $p \leq 0,01$ – за очень значимую, $p \leq 0,001$ – за максимально значимую. Критерий χ^2 был использован для определения статистической значимости различий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах.

Версия 4.2. программы Haploview использовалась для анализа неравновесности сцепления. Подготовка данных осуществлялась с помощью SNP_tools версии 1.61 для программы MS Excel.

Программа WINPEPI версии 10.7. использовалась для сравнения частот. При малых выборках определение статистической значимости различий проводили при помощи критериев χ^2 и Фишера.

Построение бинарной логистической регрессионной модели осуществлялось обратным методом Вальда. Качество приближения регрессионных моделей при каждом последующем шаге оценивали при помощи отрицательного удвоенного значения логарифма функции подобия (-2LL). Вероятность (P) была вычислена по формуле:

$$P=1/(1+e^{-F}) \quad (1), \quad \text{где}$$

F – классифицирующая функция.

Оценка качества полученных моделей была выполнена при помощи ROC-анализа.

Изучение здоровья новорожденных

Оценка раннего неонатального периода была проведена у 181 новорожденного. После рождения все дети были осмотрены врачом неонатологом с последующей оценкой их состояния по шкале Апгар и измерением массы, роста,

окружности головки и грудной клетки. Оценка физического развития новорожденных проводилась на основании популяционных региональных нормативов, принимая за гармоничное развитие показатели в пределах 10 - 90 перцентилей. При установлении снижения массы тела ниже 10 перцентилей для соответствующего гестационного срока диагностировалась ЗРП.

Оценка перинатальных исходов производилась на основании специальных оценочных индексов массо-ростовых соотношений. Неонатологом оценивалась динамика массы тела новорожденных и течение ранних адаптационных процессов.

ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ

3.1. Особенности акушерского и соматического анамнеза и оценка состояния здоровья беременных.

На первом этапе работы было проведено проспективное обследование 181 беременной в сроках от 28 до 41 недели, вошедших в 2 группы: I группу составили 97 пациенток с преэклампсией (ПЭ), II группу - 84 соматически здоровых пациентки с неотягощенным акушерско - гинекологическим анамнезом и физиологическим течением данной беременности.

Возраст обследованных беременных варьировал в пределах от 20 до 40 лет. Возраст обследованных женщин с ПЭ составил 32,7 (32,7 – 36,0г), в группе сравнения 33,0 (31,0 – 35,3г).

ИМТ в I группе составил $30,55 \pm 4,7$ кг/м², во II группе $26,76 \pm 2,9$ кг/м².

При проведении сравнительного анализа ИМТ в обследованных группах были выявлены статистически значимые различия между I и II группами. Так, обследованные беременные женщины из группы сравнения имели меньший ИМТ, чем женщины с ПЭ ($p < 0,05$).

Нарушение жирового обмена достоверно чаще встречалось в I группе (ПЭ) (13,5%, OR=2,1; CI=1,1-8,3) по сравнению со II группой (сравнения) (3,5% n=3) ($p < 0,01$).

Анализ инфекционного анамнеза исследуемых женщин, показал, что частота инфекционных и воспалительных заболеваний у обследованных женщин соответствует средне - популяционным данным. Статистически значимых различий среди обследованных групп не было выявлено.

Статистически значимые различия между группами были получены в результате изучения частоты соматической патологии. Среди заболеваний сердечно - сосудистой системы превалировала ВСД по гипертоническому типу, статистически значимо чаще встречаясь в I группе (ПЭ) по сравнению со II группой (сравнения) (14,7%, OR=3,1; CI=2,6-4,3) ($p < 0,01$). В целом заболевания сердечно - сосудистой системы в I группе составили 25,8% (n=25) и не

встречались в группе сравнения. При изучении распределения частоты заболеваний почек среди обследованных групп (хронический пиелонефрит, МКБ, гломерулонефрит и др.) нами не было получено статистически значимых различий. Также нами не были выявлены различия при анализе патологии щитовидной железы, варикозного расширения вен нижних конечностей, заболевания органов дыхания и органов пищеварения.

Следует отметить, соматически отягощенный анамнез чаще регистрировался в группе с ПЭ, причем такие заболевания, как ВСД по гипертоническому типу и метаболические нарушения преобладали в группе с ПЭ.

Данные по распределению соматической патологии в группах представлены на рисунке 4.

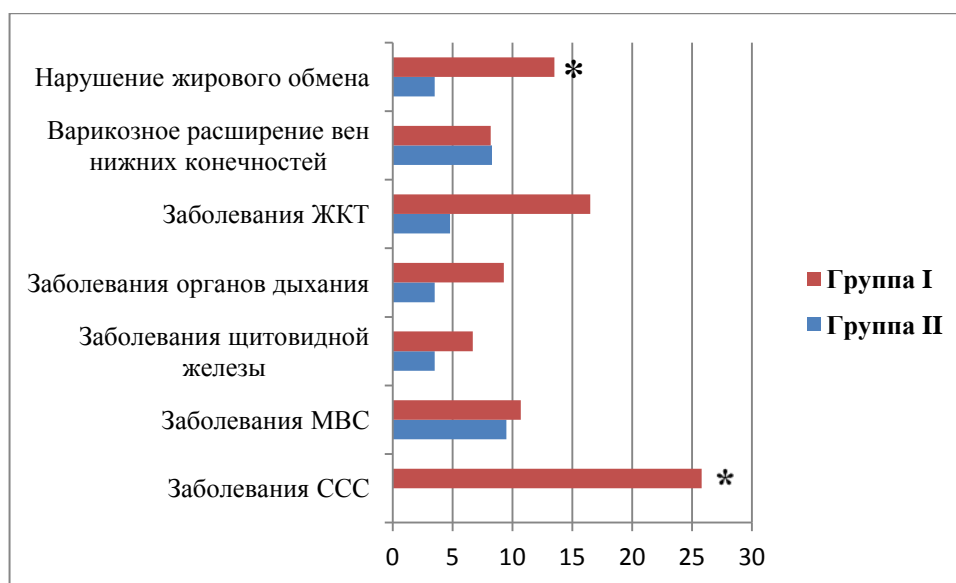


Рисунок 4. Структура соматических заболеваний среди пациенток исследуемых групп. * = $p < 0,01$

При сравнительном анализе частоты гинекологических заболеваний отмечено, что в группе с ПЭ женщины достоверно чаще страдали инфекционно - воспалительными заболеваниями.

В группе с ПЭ было зарегистрировано достоверное увеличение частоты хронического сальпингоофорита (5,5%, OR=3,6; CI=1,8-4,3) и хронического эндометрита (4,8%, OR=1,8; CI=2,1-7,3) по сравнению со II группой (сравнения),

где данные патологии зафиксированы не были ($p < 0,01$). Примерно с одинаковой частотой в группах регистрировались заболевания шейки матки: в I группе – в 16,5% ($n=16$) случаев, во II группе в 22,6% ($n=19$) случаев. СПКЯ и миома матки чаще встречались в группе с ПЭ (16,5%, $n=16$ и 10,3%, $n=10$) по сравнению со II группой, где эти заболевания встретилась лишь в 9,5%, $n=8$ и 7,1%, $n=6$ случаев, статистически значимые различия получены не были. Такие нозологические формы как гиперплазия эндометрия, бесплодие в анамнезе и кисты яичников имели место во всех обследованных группах, и при сравнительном анализе не выявили достоверных различий.

Структура гинекологических заболеваний представлена на рисунке 5.

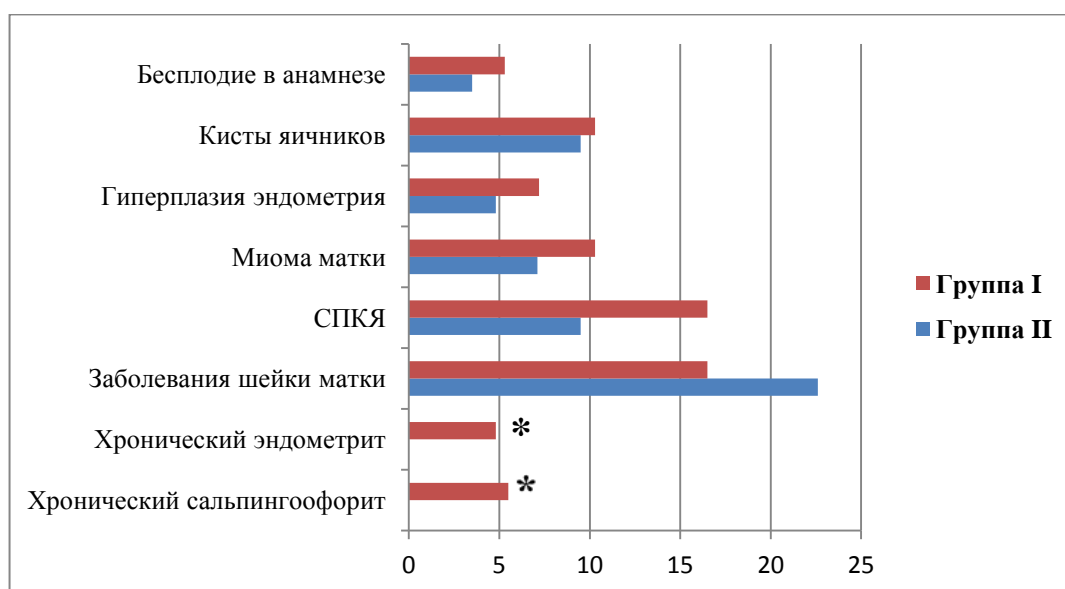


Рисунок 5. Структура гинекологических заболеваний у пациенток в исследуемых группах. * = $p < 0,01$.

Репродуктивный анамнез обследованных женщин показал, что первобеременные первородящие пациентки достоверно чаще встречались в группе с ПЭ, составив (73,3%, $OR=5,2$; $CI=4,1-12,3$) ($p=0,01$), а в группе сравнения в 54,8% $n=46$.

Паритет пациенток, вошедших в исследование, представлен в таблице 1.

Таблица 1. Паритет беременных в исследуемых группах.

Паритет	Группа I % (n=97)	Группа II % (n=84)
Первобеременные	73,2	54,8
Повторнобеременные первородящие	16,5	25
Повторнобеременные повторнородящие	10,3	20,2

При анализе частоты встречаемости таких состояний, как искусственный аборт, самопроизвольный выкидыш, неразвивающаяся и внематочная беременности в анамнезе среди изучаемых групп достоверных различий выявлено не было.

В группе с ПЭ чаще встречался ЗРП в анамнезе по сравнению с группой сравнения (5,2% n=5 и 1,2% n=1 соответственно), однако достоверных различий получено не было. Преждевременные роды в анамнезе регистрировались статистически значимо чаще в группе с ПЭ (18,6% n=18) (OR=3,1; CI=1,5-3,8), по сравнению со II группой (3,5% n=3) (p<0,01).

Структура репродуктивного анамнеза представлена на рисунке 6.

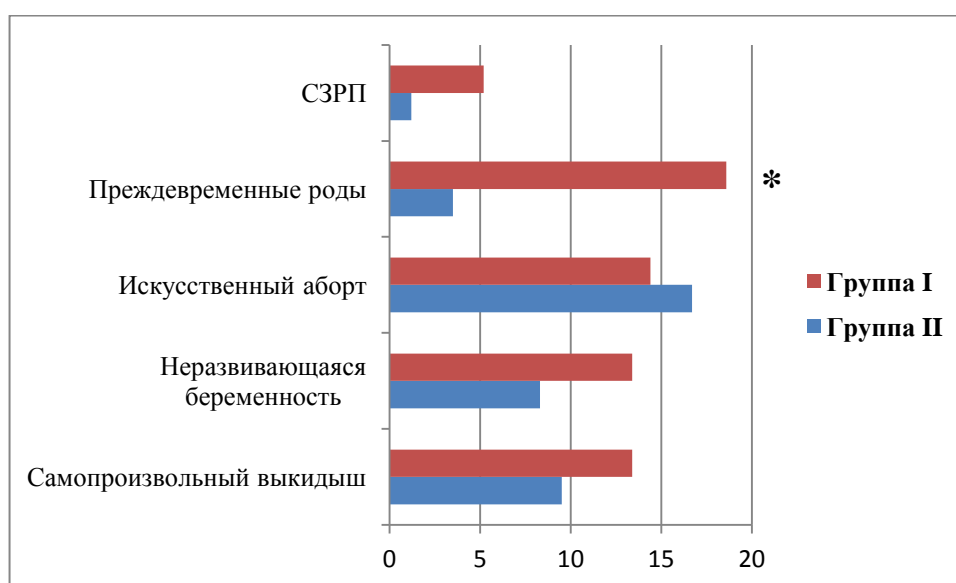


Рисунок 6. Репродуктивный анамнез пациенток в исследуемых группах.
*= $p < 0,01$.

Таким образом, беременные с ПЭ достоверно чаще имели высокую частоту сердечно - сосудистых заболеваний, отягощенный соматический и акушерский анамнез.

На втором этапе нашего исследования было проведено углубленное сравнение течения беременности среди пациенток I группы, образовавших две подгруппы: с тяжелой ПЭ ($n=41$) и умеренной ПЭ ($n=56$), и группой сравнения ($n=84$).

Особый интерес представлял анализ семейного анамнеза преэклампсии в исследуемых подгруппах. Были получены статистически значимые различия в частоте выявленных случаев преэклампсии у родственных пробандов (матерей) пациенток из подгруппы тяжелой преэклампсии (3,5%, OR=3,1; CI=2,1-3,2).

При анализе течения беременности в первом триместре у обследованных женщин отмечено, что ранний токсикоз достоверно чаще встречался в подгруппах с ПЭ. В подгруппах с ПЭ (11,5%, OR=4,3; CI=2,1-6,3) ранний токсикоз регистрировался статистически значимо чаще, чем в группе сравнения (16,7% $n=14$) ($p < 0,01$).

Угроза прерывания беременности была зарегистрирована в подгруппе с тяжелой ПЭ в 36,6% ($n=15$) ($p < 0,01$), и в подгруппе с умеренной ПЭ в 23,2% ($n=13$) ($p < 0,05$), что было достоверно выше, чем в группе сравнения (10,7% $n=9$).

Такое осложнение беременности, как ретрохориальная гематома встречалось статистически значимо чаще в подгруппе с тяжелой ПЭ, чем в группе сравнения (4,5%, OR=3,3; CI=4,2-14,3) ($p < 0,01$).

Анализ результатов гемостазиограммы выявил повышение активации внутрисосудистого свертывания в подгруппах с тяжелой и умеренной ПЭ, составившее 12,2% $n=5$ и 8,9% $n=5$ соответственно, по сравнению со II группой (2,4% $n=2$), не получив статистически значимых различий. Анемия беременных была зарегистрирована в подгруппах с примерно одинаковой частотой.

Повышение АД в первом триместре отмечено в 2,4% (n=1) случаев только в подгруппе с тяжелой ПЭ.

Во втором триместре такие осложнения, как угроза прерывания беременности и ИЦН примерно с одинаковой частотой отмечены во всех подгруппах.

Повышение АД статистически значимо чаще регистрировалось в подгруппах с ПЭ (46,3% OR=11,6; CI=2,1-11,3), по сравнению со II группой, где повышение АД во втором триместре не отмечалось ($p<0,01$). Обращает на себя внимание статистически значимое увеличение количества белка в моче во втором триместре в подгруппе с тяжелой ПЭ (19,5% OR=4,1; CI=2,1-10,3), при этом в подгруппе с умеренной ПЭ и в группе сравнения случаев протеинурии не было зарегистрировано ($p<0,01$). Частота отеков была статистически значимо выше в подгруппах с ПЭ (31,7% OR=9,2; CI=1,5-8,3) по сравнению со II группой, в которой отеки были зафиксированы в 2,4% (n=2) случаев ($p<0,01$).

Отмечается статистически значимая частота ЗРП в подгруппе с тяжелой ПЭ у (22,5%, OR=7,1; CI=3,1-9,3) беременных, по сравнению с подгруппой умеренной ПЭ (5,4% n=3) и II группой (сравнения), где ЗРП не встречался ($p<0,01$).

Важно отметить, что достоверно часто в подгруппе с тяжелой ПЭ встречалось повышение уровня печеночных трансаминаз – у 9,8% (OR=5,1; CI=1,8-7,3) и не было зарегистрировано в подгруппе с умеренной ПЭ и группе сравнения ($p<0,01$).

Таким образом, во втором триместре беременности в подгруппе с тяжелой ПЭ достоверно чаще регистрировались повышение цифр АД, протеинурия, отеки, ЗРП и повышение уровня печеночных трансаминаз.

В третьем триместре беременности, наряду с равной частотой артериальной гипертензии и значимой протеинурии, в 100% случаев, отмечалась статистически значимо более высокая частота нарушений кровотока по данным УЗ - доплерометрии плода в подгруппе с тяжелой ПЭ у 46,3% OR=11,6; CI=2,1-11,3) женщин по сравнению с умеренной ПЭ (12,5% n=7) ($p<0,01$). При этом в

подгруппе с умеренной ПЭ частота нарушений ФПК и МПК была также достоверно выше по сравнению со II группой ($p < 0,05$). В подгруппе с тяжелой ПЭ статистически значимо выше была частота ЗРП у 53,7% (OR=18,2; CI=2,8-15,3) по сравнению с умеренной ПЭ – 12,5% (OR=3,1; CI=1,1-8,3) случаев ($p < 0,01$), а в подгруппе с умеренной ПЭ достоверно выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). Повышение уровня печеночных ферментов составило в подгруппе с тяжелой ПЭ 24,4% (OR=9,6; CI=2,9-10,3), в подгруппе с умеренной ПЭ 14,3% (OR=5,1; CI=1,6-9,2), что было достоверно выше, чем в группе сравнения (2,4% $n=2$) ($p < 0,01$).

В III триместре частота отеков составила в подгруппе с тяжелой ПЭ 87,8% (OR=8,1; CI=3,1-19,3) случаев, в подгруппе с умеренной ПЭ 76,8% (OR=7,6; CI=2,9-14,6), что было статистически выше, чем в группе сравнения (14,3% $n=12$) ($p < 0,01$).

Угроза преждевременных родов осложнила примерно одинаковое число беременностей во всех обследованных группах: в подгруппе с тяжелой ПЭ у 7,3% ($n=3$) женщин, в подгруппе с умеренной ПЭ у 5,4% ($n=3$) беременных и у 9,5% $n=8$ в группе сравнения. Частота анемии беременных в обследованных группах была несколько выше в подгруппах с ПЭ, составив 31,7% $n=13$ и 30,4% $n=17$ случаев соответственно, а в группе сравнения встречалась лишь 9,5% $n=8$ случаев.

При сравнительном анализе сроков родоразрешения в обследованных группах отмечено что, имеются достоверные различия между подгруппой тяжелой ПЭ и группой сравнения ($p < 0,01$). Так срок родоразрешения в подгруппе с тяжелой ПЭ был $32,02 \pm 3,05$, что было статистически значимо ниже по сравнению со II группой ($39,28 \pm 0,76$) ($p < 0,01$).

Длительность пролонгирования беременности с момента манифестации ПЭ и до момента родоразрешения в подгруппе в тяжелой ПЭ были достоверно ниже, чем при умеренной ПЭ, ($5,7 \pm 4,9$) против $10,4 \pm 7,2$ суток, соответственно ($p < 0,01$).

Пациенты в подгруппах с ПЭ родоразрешены путем операции кесарева сечения в 100% и 58% случаев соответственно. Ранние преждевременные роды в

сроке 28 - 33,6 недель произошли у 30% женщин только в подгруппе с тяжелой ПЭ ($p < 0,01$). Роды в сроке 34 - 36,6 недель у 40,7% женщин в подгруппе тяжелой ПЭ, что достоверно выше, чем у женщин из подгруппы с умеренной ПЭ (17,8%) ($p < 0,01$). В то же время в подгруппе с умеренной ПЭ роды в этом сроке достоверно чаще встречались по сравнению со II группой ($p < 0,01$). Своевременные роды (в сроке больше 37 недель) зарегистрированы у 12 женщин из подгруппы с тяжелой ПЭ. В группе сравнения в 100% беременные были родоразрешены на сроках от 38 до 41 недели. Таким образом, своевременные роды статистически значимо чаще встречались в подгруппе с умеренной ПЭ по сравнению с подгруппой с тяжелой ПЭ ($p < 0,01$).

3.2. Анализ перинатальных исходов при оперативном родоразрешении пациенток с ПЭ

Проанализировав неонатальные исходы, нельзя не отметить статистически значимую более низкую массу тела при рождении в подгруппе тяжелой ПЭ, по сравнению с подгруппой умеренной ПЭ и группой сравнения: 1642 ± 560 г, 2835 ± 532 г и 3584 ± 430 г, соответственно; при этом масса новорожденных в подгруппе с умеренной ПЭ также достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,01$). Оценка по шкале Апгар на 1 и 5 минутах в подгруппе с тяжелой ПЭ составила $6,4 \pm 1,6$ и $7,5 \pm 1,3$, в подгруппе умеренной ПЭ $7,9 \pm 0,4$ и $8,7 \pm 0,5$, а в группе сравнения $8,0 \pm 0,2$ и $8,9 \pm 0,3$, соответственно. На основании этого можно сделать вывод, что оценка состояния по шкале Апгар на 1 и 5 минуте была достоверно ниже в подгруппе с тяжелой ПЭ по сравнению с подгруппой умеренной ПЭ и группой сравнения ($p < 0,01$). В 70,7% случаев дети из подгруппы тяжелой ПЭ были недоношенными, что статистически значимо больше по сравнению с подгруппой умеренной ПЭ 17,8% ($p < 0,01$). Нельзя не отметить, что в подгруппе с умеренной ПЭ также были выявлены достоверные различия с группой сравнения по частоте недоношенных детей ($p < 0,01$). ЗРП достоверно чаще встречался в подгруппе с тяжелой ПЭ у 17,5%

(OR=3,1; CI=4,2-8,7) женщин по сравнению с умеренной ПЭ – 9,5% женщин и с группой сравнения, где данный признак отсутствовал ($p<0,01$). Данные об основных осложнениях III триместра, сроках и исходах родоразрешения представлены в таблице 2.

Таблица 2. Осложнения III триместра беременности, сроки и исходы родоразрешения в исследуемых группах.

	Тяжелая ПЭ n = 41	Умеренная ПЭ n = 34	Группа сравнения n = 84
Нарушение ФПК и МПК, %	46,3	12,5	0
ЗРП, %	17,5	9,5	0
Повышение уровня печеночных трансаминаз, %	24,4	14,3	2,4
Отеки, %	87,8	76,8	14,3
тах САД, мм рт ст	159,0 (151,8 – 164,5)	149,5 (141,9 – 158,1)	107,5 (101,0 – 116,0)
тах ДАД, мм рт ст	98,0 (87,0 – 119,5)	91,0 (85,8 – 98,1)	61,0 (56,0 – 67,5)
Длительность пролонгирования беременности с момента манифестации ПЭ, дн	5,7±4,9	10,4±7,2	-
Срок родоразрешения, нед	32,0	36,4	39,3
Вес при рождении, гр	1642	2835	3584
Оценка новорожденного по шкале Апгар	6,4 – 7,5	7,9 – 8,7	8,0 – 8,9

Такие осложнения, как РДС плода и ВУИ были достоверно выше в подгруппе с тяжелой ПЭ – 25,1% (OR=4,1; CI=1,5-11,3) и 13,9% (OR=3,2; CI=1,2-9,8), по сравнению с подгруппой умеренной ПЭ (8,9% и 5,3% случаев соответственно). В группе сравнения ЗРП, недоношенность, РДС и ВУИ не встречались.

Таким образом, неонатальные исходы были тяжелее в подгруппе с тяжелой ПЭ, по сравнению с умеренной ПЭ, что обусловлено более ранними сроками родоразрешения и сопутствующим ЗРП. Неонатальные исходы в

подгруппе умеренной ПЭ сопоставимы с группой сравнения, частота здоровых детей достигает 80%, что связано с поздними сроками родоразрешения, более редким сочетанием умеренной ПЭ с ЗРП.

Проанализировав течение послеродового периода, можно сделать вывод о снижении протеинурии и нормализации АД в 17,1% случаев подгруппы с тяжелой ПЭ и в 39,3% в подгруппе с умеренной ПЭ. Большинство пациенток, перенесших преэклампсию, нуждались в пролонгированном приеме антигипертензивных препаратов под контролем терапевта и кардиолога по месту жительства после выписки из стационара. Случаев гнойно – септических осложнений среди наблюдаемых пациенток в послеродовом периоде отмечено не было.

Принимая во внимание высокий процент оперативного родоразрешения среди пациенток с преэклампсией, достигающий 100% в подгруппе с тяжелой преэклампсией, особый интерес представляло проведение углубленного анализа зависимости показаний к родоразрешению и перинатальных исходов.

Необходимость экстренного родоразрешения в подгруппах с ПЭ была обусловлена выраженными нарушениями состояния плода, такими как отрицательный или «нулевой» кровоток по данным доплерометрии, нарастанием тяжести ПЭ, отсутствием эффекта от проводимой антигипертензивной терапии и присоединением неврологической симптоматики и составила 100% и 58% соответственно. Данные отображены на рисунке 7.

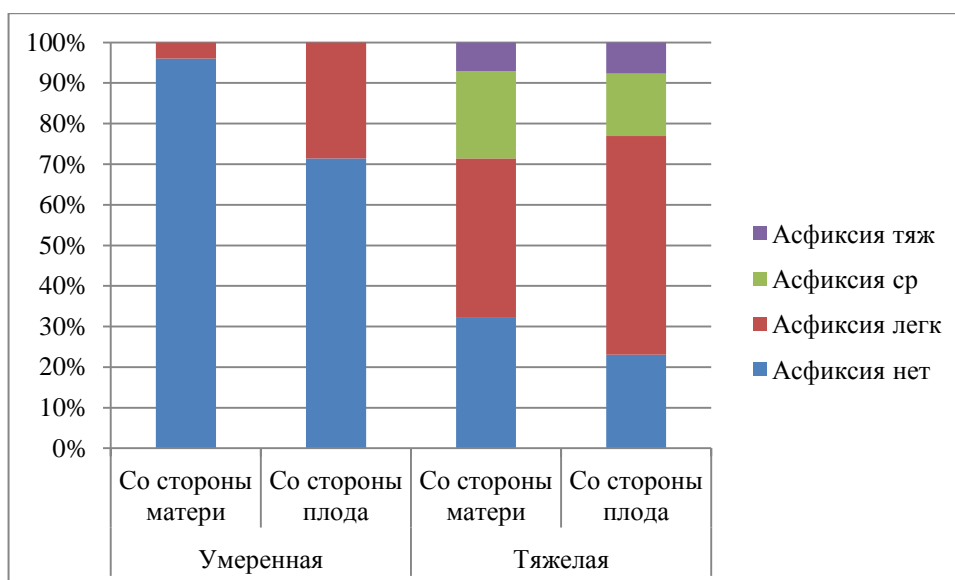


Рисунок 7. Зависимость структуры показаний к оперативному родоразрешению и тяжести состояния новорожденного в исследуемых группах.

В подгруппе умеренной преэклампсии у новорожденных была диагностирована асфиксия легкой степени в 23,5% (OR=3,5; CI=2,5-6,3). При оперативном родоразрешении, выполненном со стороны матери, ввиду нарастания тяжести преэклампсии, асфиксия отмечалась у 4,0% новорожденных, тогда как при операции, выполненной в связи с внутриутробным страданием плода, выявлялась в 28,6% случаев и сочеталась с ЗРП и недоношенностью. Асфиксии средней и тяжелой степени в данной подгруппе выявлено не было.

При анализе зависимости показаний к операции и исходов для новорожденных в подгруппе тяжелой преэклампсии показания так же разделились на две группы: со стороны матери и плода. При оперативном родоразрешении, выполненном в связи с нарастанием тяжести преэклампсии, асфиксия легкой и средней степени отмечалась в 39,3% и 21,4% соответственно, а асфиксия тяжелой степени в 7,1% случаев. Анализ исходов операций, произведенных, в связи с внутриутробным страданием плода, выявил асфиксию легкой и средней степени в 23,5% и 15,4% случаев, а тяжелую асфиксию в 7,7%. Асфиксия тяжелой степени всегда была связана с ЗРП и недоношенностью.

Примечательно, что доля родоразрешений в интересах матери в сроке до 35,5 была одинаковой как при умеренной, так и при тяжелой ПЭ: 67% и 68% соответственно (рис. 8).

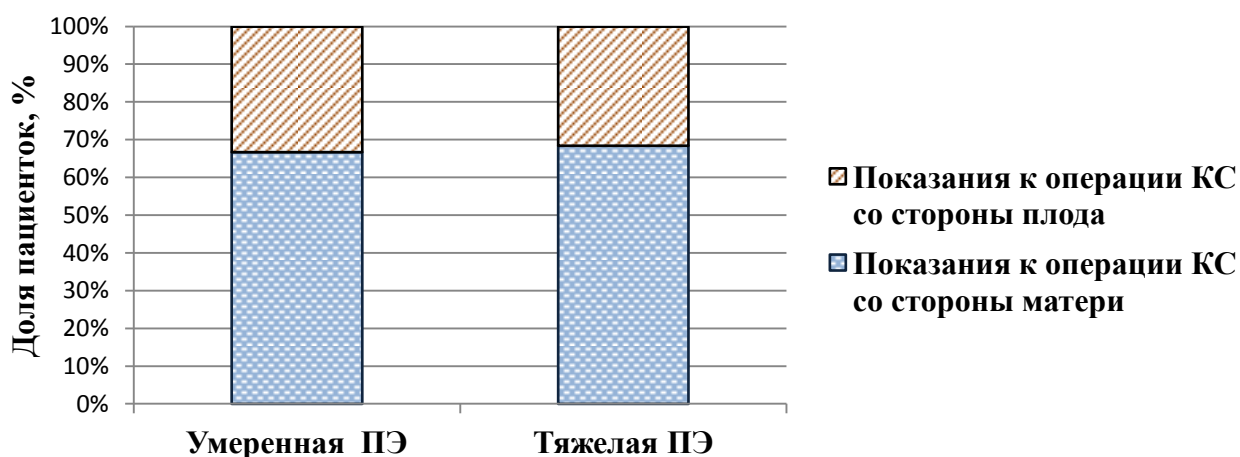


Рисунок 8. Структура показаний к операции кесарева сечения до 35,5 недель

Системная воспалительная реакция в сосудистом русле плода, развивающаяся при тяжелой форме преэклампсии, находясь в большинстве случаев в компенсаторном состоянии, не может быть в полной мере диагностирована современными инструментальными методами исследования, визуализирующими изменения на территории плода только в стадии декомпенсации. Таким образом, можно предположить, что диагностика внутриутробного состояния плода не может в полной мере отобразить реальную картину состояния внутриутробного пациента при тяжелой преэклампсии и требует дальнейших научных исследований в этом направлении разработки новых неинвазивных диагностических и прогностических тестов, отображающих состояние плода и фетоплацентарного комплекса при тяжелой преэклампсии.

Учитывая полученные данные анализа клинической характеристики групп, на следующем этапе работы нами было проведено исследование уровня свободной внеклеточной ДНК и возможность применения данного показателя в качестве прогностического критерия тяжести преэклампсии и внутриутробного состояния плода.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Исследование свободной внеклеточной ДНК в крови матери

4.1.1. Исследования уровней фетальной внеклеточной ДНК и общей внеклеточной ДНК

Как известно развитие системного воспалительного ответа при ПЭ сопровождается развитием апоптотических процессов в плаценте.

Для выявления клеток плаценты в стадии апоптоза была проведена реакция TUNEL. Установлено, что при ПЭ гибель клеток трофобласта происходит по пути апоптоза (рисунок 9а), при этом при тяжелой ПЭ отмечается апоптоз клеток как трофобласта, так и стромы стволовых ворсин (рисунок 9б). В плацентах группы сравнения вышеуказанных явлений не наблюдалось.

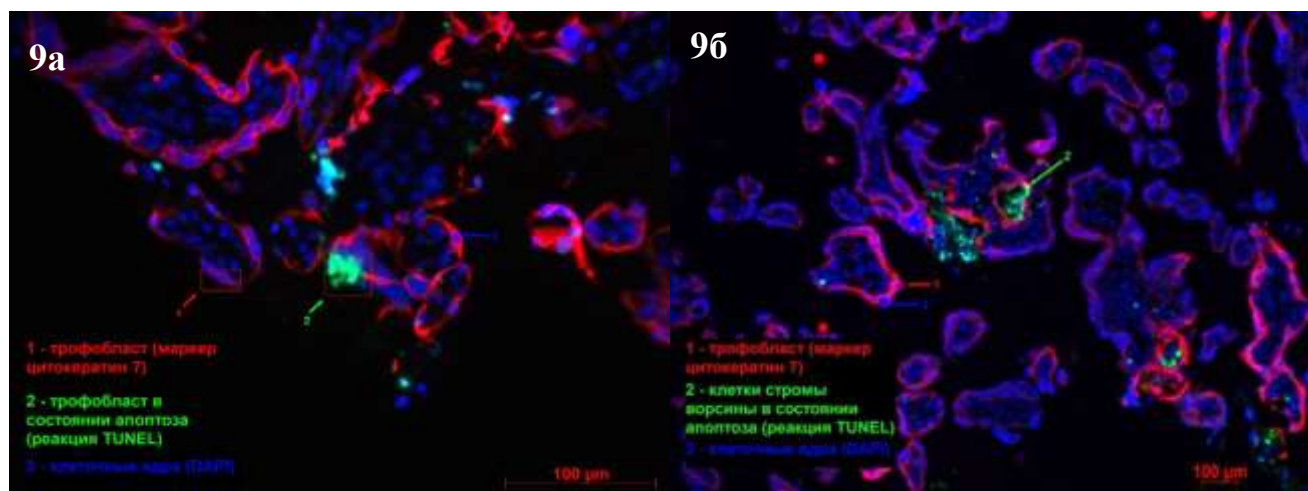


Рисунок 9. Апоптоз в плаценте при преэклампсии.

9а - Преэклампсия, апоптоз в клетках трофобласта

9б - Тяжелая преэклампсия, апоптоз в клетках трофобласта и в строме стволовых ворсин.

Красный – цитокератин-7; Зеленый – реакция TUNEL.

Полученные данные, подтверждающие развитие апоптоза в плаценте обосновывают возможность попадания ДНК плода в кровотоки матери, что в свою

очередь предопределяет перспективность изучения свободной и фетальной ДНК при ПЭ.

Внеклеточная циркулирующая фетальная ДНК в материнском кровотоке появляется при апоптозе или некрозе клеток плаценты. Изучение фвДНК позволяет получить информацию о состоянии плода и его наследственных заболеваниях. Результаты распределения уровней фвДНК в основной и группе сравнения представлены на рисунке 10. Р – значение, рассчитанное с помощью U – критерия Манна – Уитни, составило $< 0,0001$.

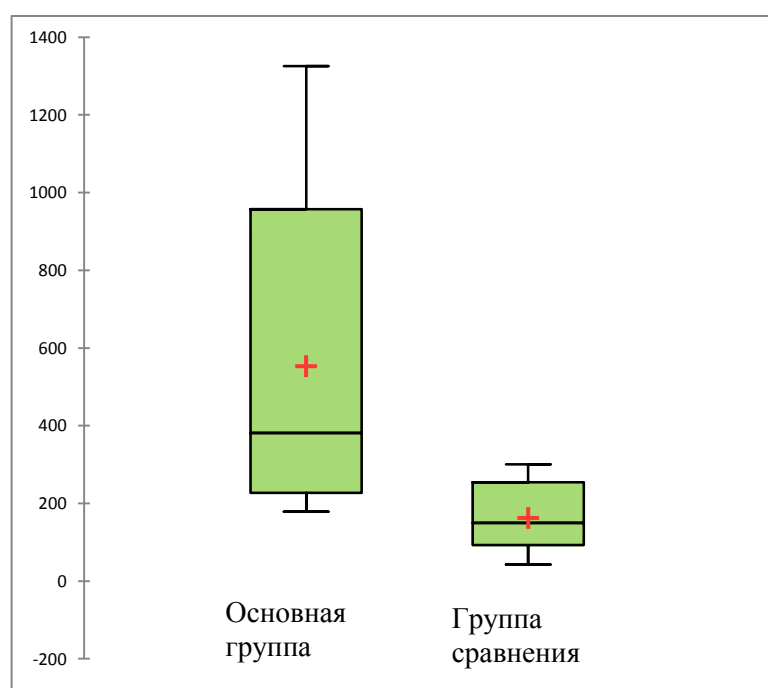


Рисунок 10. Диаграмма размаха распределения уровней фвДНК в основной и группе сравнения.

Важным наблюдением являлось то, что у женщин с наименьшим значением овДНК из группы ПЭ на фоне проводимой терапии к моменту повторного забора крови основные параметры ПЭ (давление и белок в моче) нормализовались.

Основываясь на данном наблюдении, основная группа пациенток была разделена на 2 подгруппы: умеренная ПЭ (n=56) и тяжелая ПЭ (n=41) с последующим сравнительным анализом показателей уровня внеклеточной ДНК в двух точках – в момент поступления в стационар с диагнозом ПЭ и через 48 часов

от момента начала терапии и результата исхода родов для плода. Изменение уровня овДНК в исследуемых группах в зависимости от проводимой терапии представлено на рисунке 11.

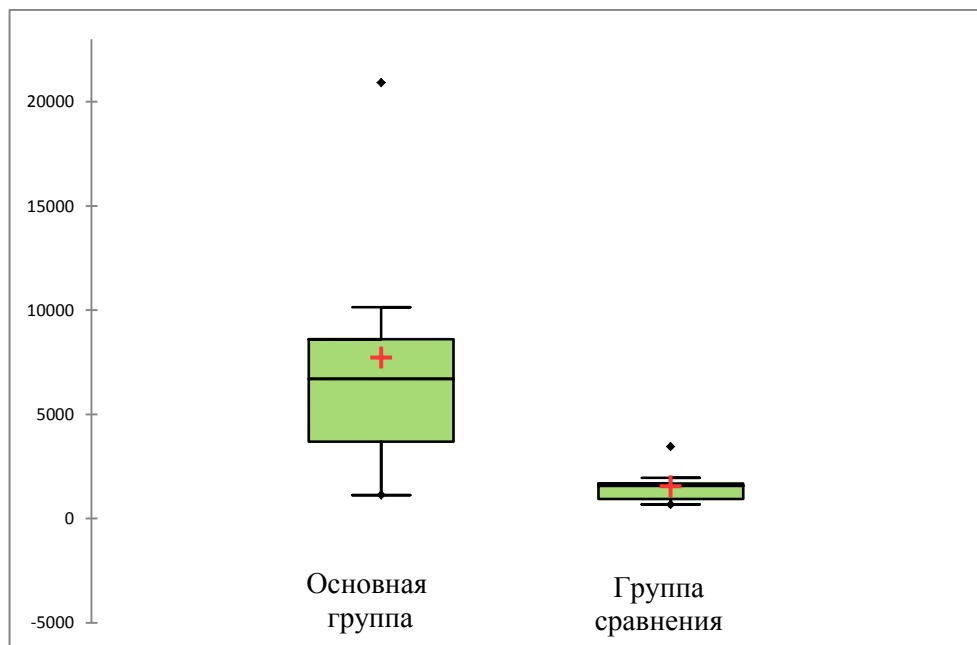


Рисунок 11. Диаграмма размаха распределения уровней овДНК в основной и группе сравнения.

4.1.2. Оценка диагностической ценности уровня свободной и плодовой ДНК для диагностики ПЭ

Хорошую диагностическую эффективность согласно оценке площади под ROC –кривой показали как фвДНК, так и овДНК. Между уровнем фвДНК и овДНК наблюдалась высокая корреляция как в группе ПЭ ($p=0.000003$), так и в группе сравнения ($p=0.004$). Наиболее точным параметром ПЭ оказался уровень овДНК, при этом $AUC=0.924$, 95% ДИ (0.83; 1.0), чувствительность составила 89.4%; специфичность - 93.7%, при значении концентрации равным 2873 ГЕ/мл (рис. 12а). Для фвДНК $AUC=0.868$, 95% ДИ (74.7; 99), чувствительность составила 73.6% специфичность - 87.5%, при значении концентрации равным 277 ГЕ/мл (рис. 12б).

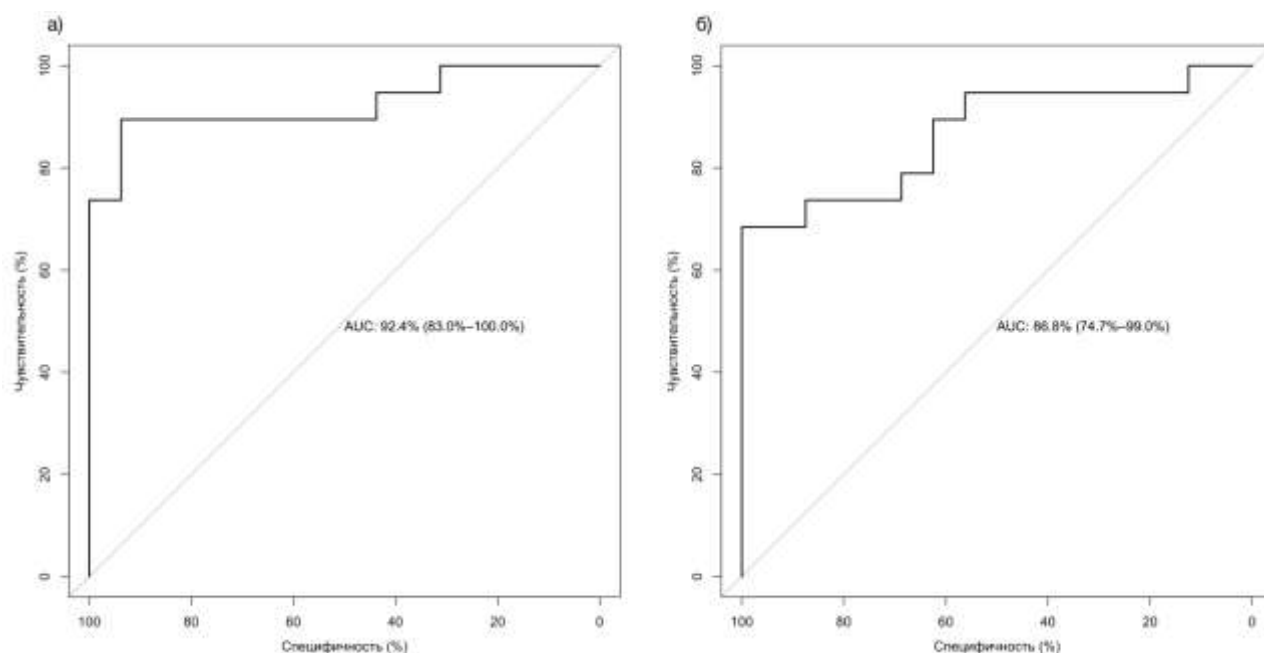


Рисунок 12. Оценка площади под ROC – кривой фвДНК и овДНК.

овДНК,
AUC=0.924, 95% ДИ (0.83; 1.0),
чувствительность 89.5%;
специфичность - 93.8%,
при значении концентрации 2873 ГЕ/мл

фвДНК
AUC=0.868, 95% ДИ (74.7; 99),
чувствительность 73.7%
специфичность - 87.5%,
при значении концентрации 277 ГЕ/мл

Таким образом, увеличение уровней общей и фетальной внеклеточной ДНК в крови матери ассоциировано с ПЭ. Уровень общей внеклеточной ДНК обладает лучшими диагностическими характеристиками для выявления ПЭ и оценки тяжести состояния беременной и плода.

4.1.3. Подтверждение валидности метода опеределения фетальной ДНК в крови беременных женщин

Для подтверждения валидности метода, используемого для определения концентрации фвДНК, была набрана дополнительная группа – 19 женщин без уточненного диагноза на третьем триместре беременности с мужскими плодами и проведено исследование корреляции концентраций гиперметилированной части промотора RASSF 1A и SRY, гена Y хромосомы в плазме крови.

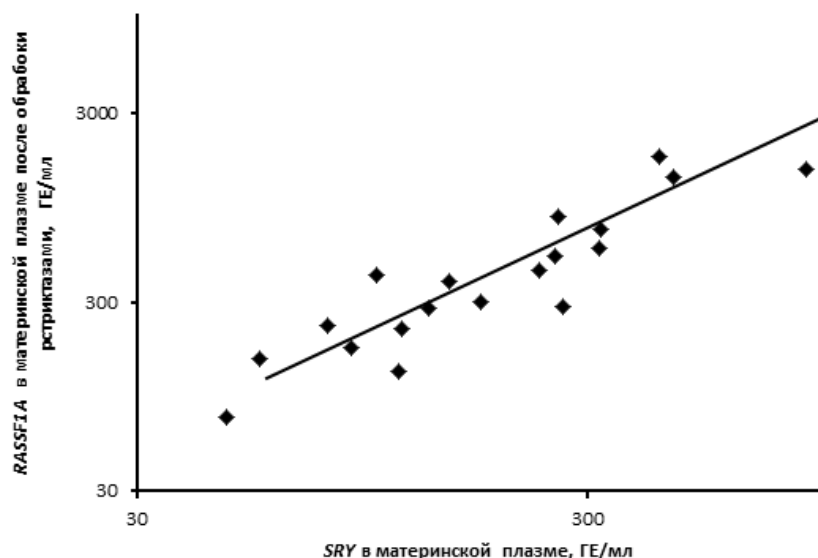


Рисунок 13. Корреляция концентраций гиперметилированной части промотора RASSF1A и SRY в плазме матери в третьем триместре беременности женщин с мужскими плодами

Коэффициент корреляции составил 0.891; $p < 0,0001$. Таким образом, концентрация гиперметилированной части промотора RASSF 1A в плазме крови беременной женщины может быть использована для оценки уровня свободной эмбриональной ДНК вне зависимости от пола плода.

4.1.4. Взаимосвязь уровня внеклеточной ДНК с перинатальными исходами

При анализе уровня овДНК в сыворотке крови беременных с ПЭ, разделенных на две подгруппы по тяжести ПЭ, наиболее высокие показатели были зарегистрированы у пациенток с тяжелой ПЭ (6780 GE/мл, $p=0,01$), наиболее низкие в подгруппе с умеренной ПЭ (5820 GE/мл, $p=0,01$). Показано влияние лечения метилдопой и $MgSO_4$ на сывороточные уровни овДНК. У беременных с умеренной ПЭ, антигипертензивная и магниезальная терапия была связана со значительным падением концентрации уровня овДНК в сыворотке крови

($p=0,001$) по сравнению с беременными из подгруппы тяжелой ПЭ, в которой однако наблюдалась устойчивая тенденция к снижению данного показателя на фоне терапии, не достигшая статистической значимости.

Особый интерес представляло проведение сравнительного анализа неонатальных исходов в зависимости от изменения уровня овДНК на фоне проводимой терапии в подгруппе с умеренной ПЭ, в которой были выявлены статистически значимые показатели снижения данного параметра через 48 часов от начала лечения. Уровень овДНК у пациенток с ПЭ является показателем напряженности системного воспалительного ответа, поддающийся воздействию при терапии на этапе умеренной ПЭ и, судя по результатам проведенной работы, не отвечающему снижению при запущенных массивных системных нарушениях при тяжелой ПЭ. Так в подгруппе беременных с умеренной ПЭ 80% здоровых новорожденных, были рождены от матерей со статистически достоверным снижением уровня овДНК на фоне проводимой терапии. 20% новорожденных от матерей, не ответивших на лечение снижением уровня овДНК, при рождении имели такие осложнения, как РДС, асфиксию, малый вес к сроку гестации. Период адаптации этих детей протекал с явлениями гипербилирубинемии, транзиторного тахипноэ и требовал их перевода для дальнейшей терапии и наблюдения в отделение реанимации и патологии новорожденных.

Поскольку перинатальные исходы при родоразрешении до 35,5 недель в интересах матери были хуже, чем при родоразрешении в интересах плода, можно сделать вывод о недооценке тяжести состояния плода при ухудшении состояния беременной. В качестве потенциального маркера состояния плода был проведен анализ уровня свободной внеклеточной ДНК в зависимости от перинатальных исходов.

У пациенток, дети которых имели асфиксию умеренной и тяжелой степени уровень свободной внеклеточной ДНК был несколько выше, но различия не достигали статистической значимости. При этом наблюдалась высокая вариабельность этого показателя. Данные отображены на рисунке 14.

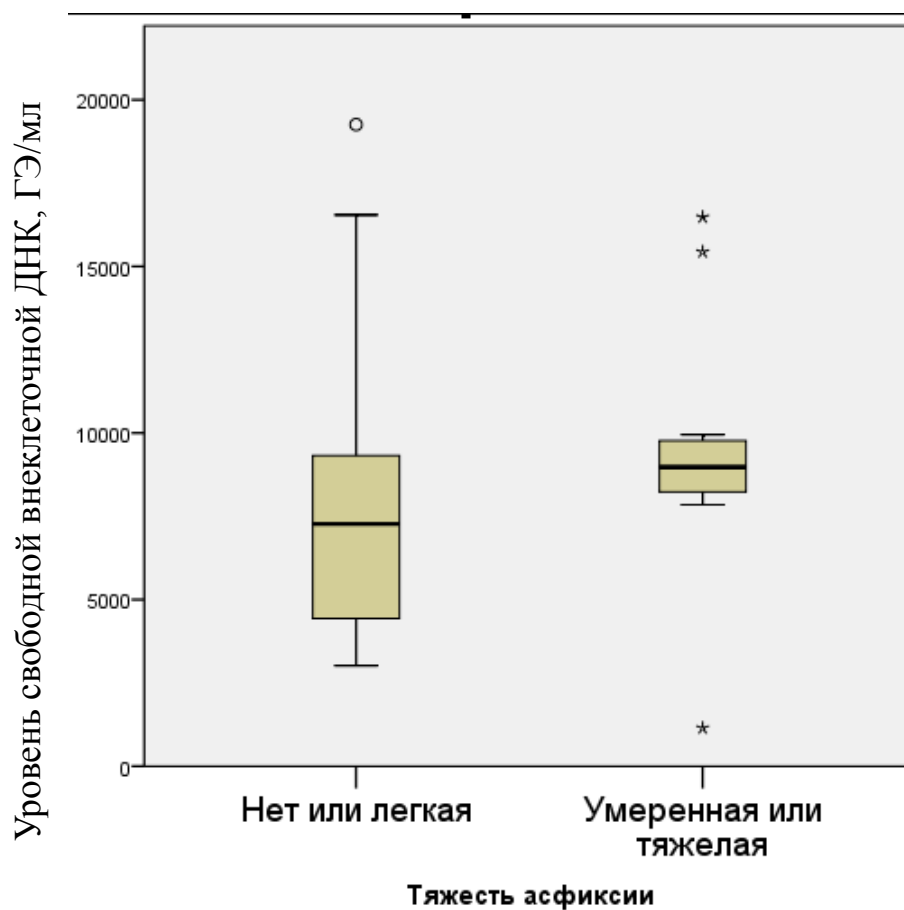


Рисунок 14. Уровень внеклеточной ДНК в зависимости от основных перинатальных осложнений.

Для оценки влияния лечения на уровень свободной внеклеточной ДНК был проведен повторный анализ через 48 часов терапии. Также была рассчитана разница между конечным и исходным уровнем. Положительные значения соответствовали приросту а отрицательные – снижению уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения.

Медиана разницы уровня свободной внеклеточной ДНК была выше у пациенток, дети которых имели асфиксию, что свидетельствовало о нарастании уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения. У женщин, дети которых не имели асфиксии, уровень свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения снижался или оставался неизменным.

Статистически значимые различия в уровне свободной внеклеточной ДНК зафиксированы только в случае родоразрешения по показаниям со стороны матери. Это может свидетельствовать о недооценке в ряде случаев тяжести

сосотояния плода. Таким образом, для улучшения перинатальных исходов требуется более информативный маркер оценки состояния плода при ПЭ у матери. Поскольку уровень фетальной ДНК связан с состоянием фетоплацентарного комплекса, а снижение этого показателя в ответ на лечение связано с благоприятными перинатальными исходами, был проведен анализ информативности данного показателя при ПЭ (рис. 15).

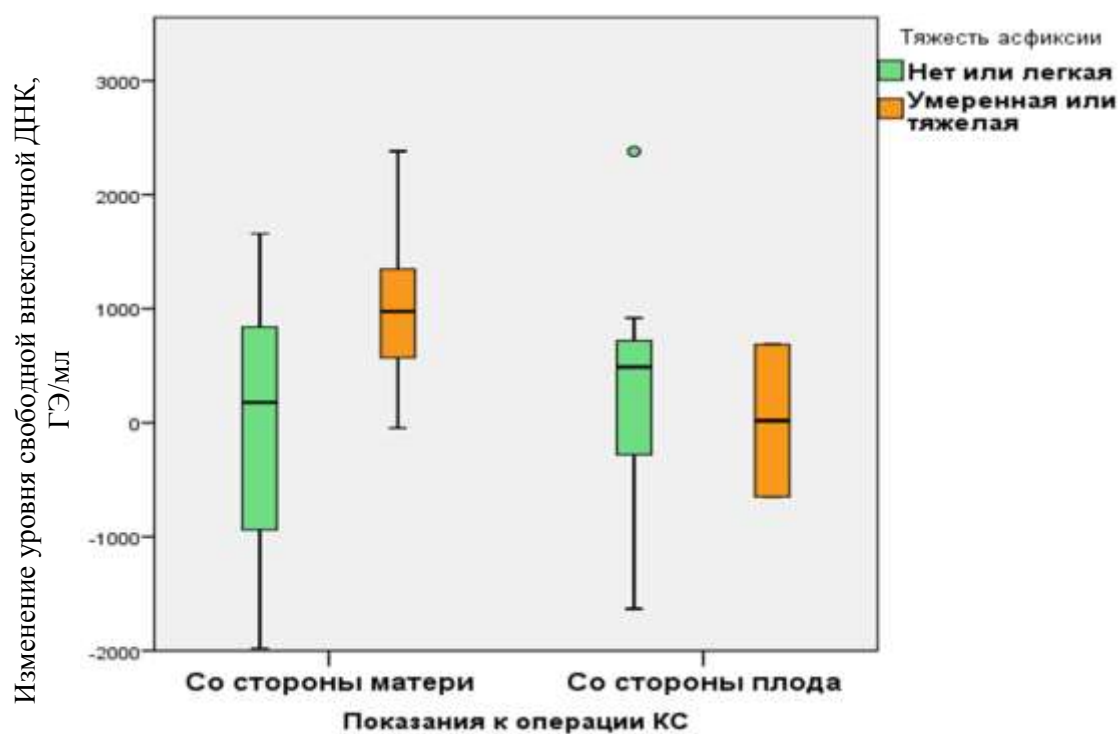


Рисунок 15. Изменение уровня внеклеточной ДНК в процессе лечения в зависимости от тяжести асфиксии новорожденных.

На рисунке 16 представлено отношение шансов основных перинатальных исходов при повышении уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения при родоразрешении в интересах матери. Видно, что повышение уровня свободной внеклеточной ДНК является неблагоприятным прогностическим критерием, хотя, в силу ограниченности выборки, статистически значимые различия достигнуты только для умеренной или тяжелой асфиксии.

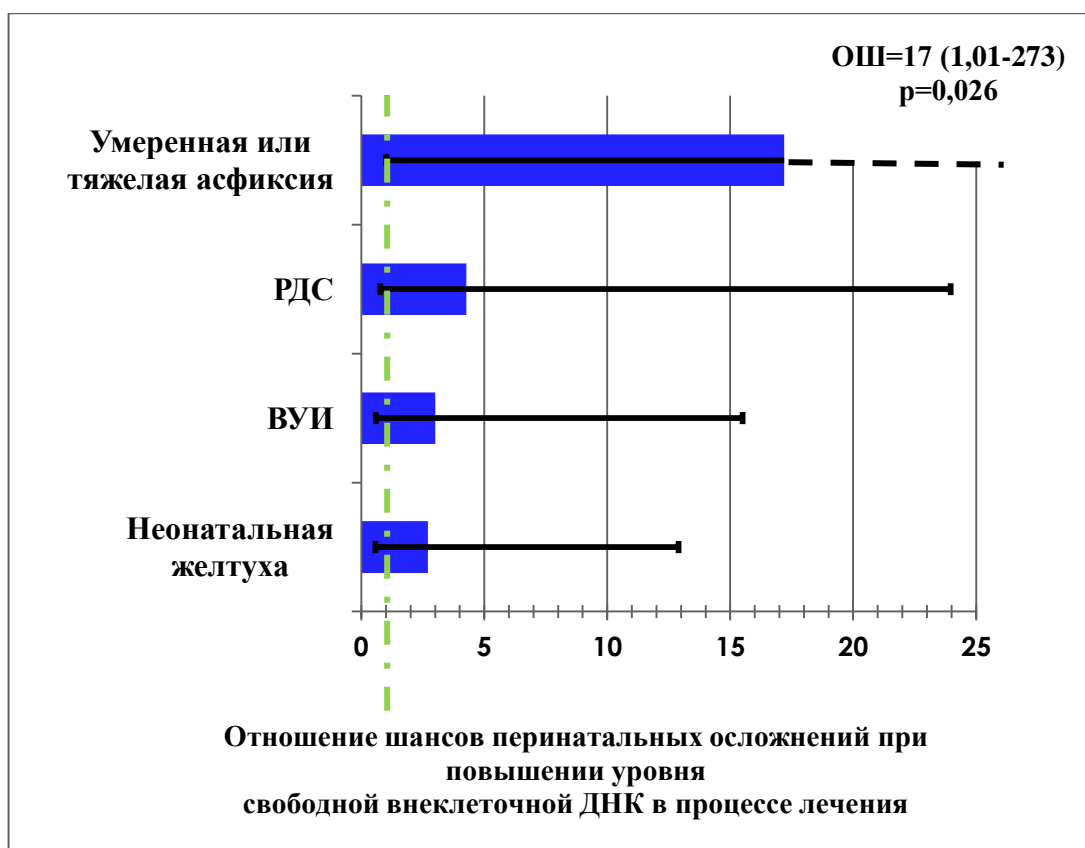


Рисунок 16. Предсказательная ценность повышения уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения при родоразрешении в интересах матери. Штрих-пунктирной линией показан уровень «бесполезного классификатора» (отношение шансов равно 1).

Таким образом, на основании наших наблюдений можно сделать вывод о прямой зависимости между снижением уровня овДНК на фоне проводимой терапии и лучшими неонатальными исходами при ПЭ. Мониторинг данного состояния у пациенток с первыми проявлениями ПЭ может быть использован в качестве прогностического маркера неонатальных исходов и выступать в качестве показателя, играющего роль в выборе сроков родоразрешения у беременных с ПЭ.

Однако при тяжелой ПЭ до 35,5 недель гестации может происходить недооценка тяжести состояния плода, что проявляется более тяжелыми перинатальными исходами при КС в интересах матери. Нарастание уровня общей внеклеточной ДНК в процессе лечения ПЭ является неблагоприятным прогностическим критерием.

Полученные данные указывают на перспективность прогностического использования определения уровня овДНК в сыворотке беременных с целью прогнозирования риска развития, тяжести течения ПЭ и возможности оценки успеха проводимой терапии и сроков родоразрешения. Последующие исследования в данном направлении позволят применять овДНК для подбора персонализированных схем терапии ПЭ.

4.2. Исследование уровня цитокинов

Для определения иммунологических аспектов ПЭ и их влияния на уровень внеклеточной ДНК было проведено исследование уровней восьми различных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ и TNF α) и их корреляция с уровнями фетальной ДНК и общей ДНК в плазме крови женщин с ПЭ и группе сравнения.

IL-2 играет важную роль в ключевых функциях иммунной системы, толерантности и иммунитета, в первую очередь, благодаря его прямому воздействию на Т-клетки. В тимусе, где Т-клетки созревают, он предотвращает аутоиммунные заболевания, способствуя дифференцировке некоторых незрелых Т-клеток в регуляторные Т-клетки, которые подавляют другие Т-клетки, способные атаковать нормальные здоровые клетки в организме. IL-2 также способствует дифференцировке Т-клеток в эффекторные Т-клетки и в Т-клетки памяти, когда исходная Т-клетка также стимулируется антигеном, что помогает организму бороться с инфекциями.

Результаты распределения уровней IL-2 в основной и группе сравнения представлены в таблице 3.

Таблица 3. Данные распределения уровней IL-2 в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,495	0,601
Максимум	2,827	2,756
Первая квартиль	0,724	0,742
Медиана	0,883	0,848
Третья квартиль	1,166	0,936

IL-4 играет ключевую роль в формировании характера иммунных реакций. Клетки Th2 продуцируют IL-4, при этом связывание IL-4 Т-клетками с его рецептором индуцирует пролиферацию и дифференцировку в клетки Th2. IL-4 подавляет провоспалительную активность макрофагов и секрецию ими IL-1, фактора некроза опухоли и IL-6, то есть оказывает противовоспалительный эффект.

Результаты распределения уровней IL-4 в в основной и группе сравнения представлены в таблице 4.

Таблица 4. Данные распределения уровней IL-4 в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,229	0,257
Максимум	0,572	0,486
Первая квартиль	0,265	0,286
Медиана	0,300	0,286
Третья квартиль	0,365	0,347

IL-6 продуцируется в месте воспаления и играет ключевую роль в реакции острой фазы, определяемой различными клиническими и биологическими особенностями, такими как продуцирование белков острой фазы. IL-6 в сочетании

с его растворимым рецептором sIL-6R α , определяет переход от острого к хроническому воспалению, изменяя характер инфильтрата лейкоцитов (от полиморфноядерных нейтрофилов до моноцитов / макрофагов). Кроме того, IL-6 оказывает стимулирующее действие на Т- и В-клетки, что способствует хроническим воспалительным реакциям.

Результаты распределения уровней IL-6 в основной и группе сравнения представлены в таблице 5.

Таблица 5. Данные распределения уровней IL-6 в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,084	0,098
Максимум	27,950	4,300
Первая квартиль	0,126	0,117
Медиана	1,130	0,137
Третья квартиль	6,130	0,943

IL-8, также известный как хемотаксический фактор нейтрофилов, имеет две основные функции. Он индуцирует хемотаксис в клетках-мишенях, прежде всего нейтрофилах, но также и других гранулоцитах, заставляя их мигрировать к месту заражения. IL-8 также индуцирует фагоцитоз, как только они прибывают. Известно также, что IL-8 является мощным промотором ангиогенеза. В клетках-мишенях IL-8 индуцирует серию физиологических реакций, необходимых для миграции и фагоцитоза, таких как увеличение внутриклеточного Ca²⁺, экзоцитоз (например, высвобождение гистамина) и респираторный взрыв. IL-8 может быть секретирован любыми клетками, имеющими toll-like рецепторы, которые вовлечены во врожденный иммунный ответ. Обычно первыми макрофаги связывают антиген, и высвобождают IL-8 для хемотаксиса других клеток.

Результаты распределения уровней IL-8 в основной и группе сравнения представлены в таблице 6.

Таблица 6. Данные распределения уровней IL-8 в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,060	0,060
Максимум	20,780	12,040
Первая квартиль	0,340	1,140
Медиана	3,240	2,715
Третья квартиль	7,140	4,540

IL-10 представляет собой цитокин с множественными плеiotропными эффектами при иммунорегуляции и воспалении. Он подавляет экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах. Он также улучшает выживание, пролиферацию и продуцирование В-клеток. IL-10 может блокировать активность NF-κB и участвует в регулировании сигнального пути JAK-STAT. Известно, что IL-10 преимущественно ингибирует липополисахарид (LPS) и опосредованную бактериальным продуктом индукцию провоспалительных цитокинов.

Результаты распределения уровней IL-10 в основной и группе сравнения представлены в таблице 7.

Таблица 7. Данные распределения уровней IL-10 в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,090	0,070
Максимум	10,170	5,810
Первая квартиль	0,680	0,100
Медиана	2,090	0,260
Третья квартиль	3,805	0,820

GM-CSF представляет собой мономерный гликопротеин, который функционирует как цитокин - это фактор роста лейкоцитов. GM-CSF стимулирует стволовые клетки к образованию гранулоцитов (нейтрофилов, эозинофилов и базофилов) и моноцитов. Моноциты выходят из кровообращения и мигрируют в ткань, после чего они созревают в макрофи и дендритные клетки. Таким образом, он является частью иммунного / воспалительного каскада, благодаря которому активация небольшого количества макрофагов может быстро привести к увеличению их числа.

Результаты распределения уровней GM-CSF в основной и группе сравнения представлены в таблице 8.

Таблица 8. Данные распределения уровней GM-CSF в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0,292	0,250
Максимум	1,575	1,230
Первая квартиль	0,428	0,467
Медиана	0,490	0,657
Третья квартиль	0,772	0,787

IFN γ или интерферон типа II представляет собой цитокин, который имеет решающее значение для врожденного и адаптивного иммунитета против вирусных, некоторых бактериальных и протозойных инфекций. IFN γ является важным активатором макрофагов и индуктором высвобождения молекулы основного комплекса гистосовместимости класса II (MHC). Абберантное выражение IFN γ связано с рядом аутоиммунных и аутоиммунных заболеваний.

Результаты распределения уровней GM-CSF в основной и группе сравнения представлены в таблице 9.

Таблица 9. Данные распределения уровней IFN γ в основной и группе сравнения.

Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	0.406	0.507
Максимум	111.500	152.380
Первая квартиль	0.609	0.507
Медиана	0.710	0.659
Третья квартиль	31.200	21.618

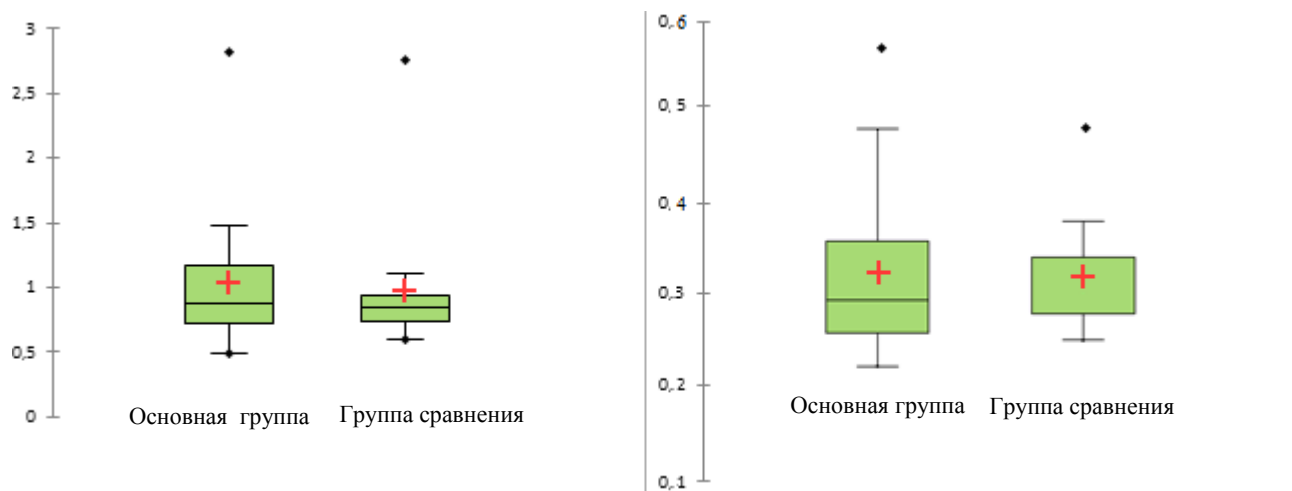
Фактор некроза опухоли – альфа — внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами. Влияет на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, стимулирует продукцию IL-1, IL-6, IL-8, интерферона-гамма, активирует лейкоциты, один из важных факторов защиты от внутриклеточных паразитов и вирусов.

Результаты распределения уровней TNF α в основной и группе сравнения представлены в таблице 10.

Таблица 10. Данные распределения уровней TNF α в основной и группе сравнения.

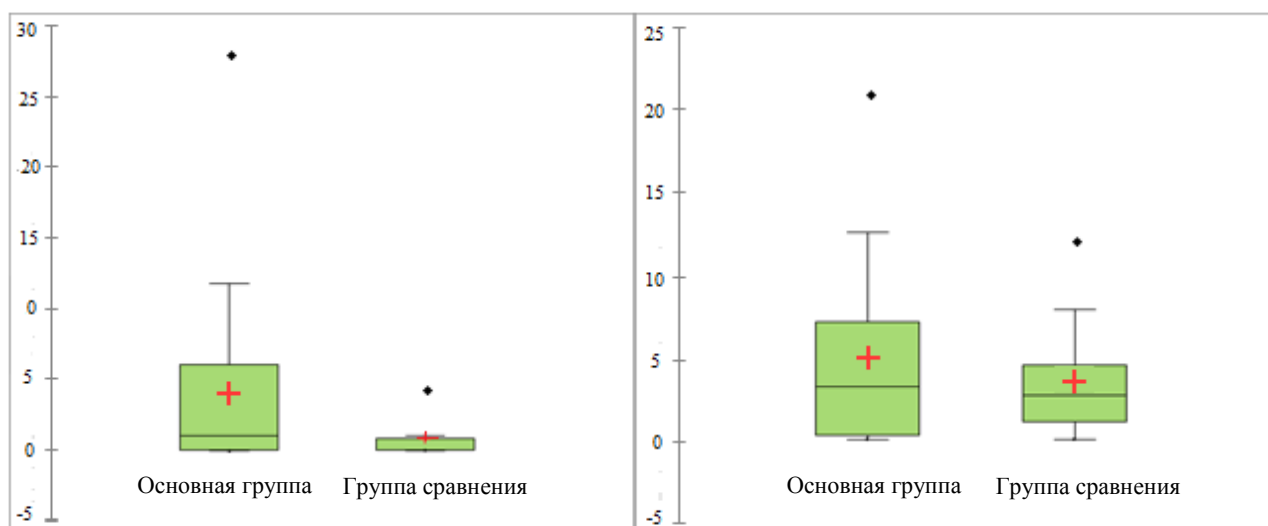
Статистический результат	Основная группа	Группа сравнения
Минимум	1.903	1.691
Максимум	6.976	4.651
Первая квартиль	1.955	1.903
Медиана	2.114	2.008
Третья квартиль	2.801	2.590

Распределение уровней анализируемых показателей в основной и группе сравнения отображено на рисунке 17.



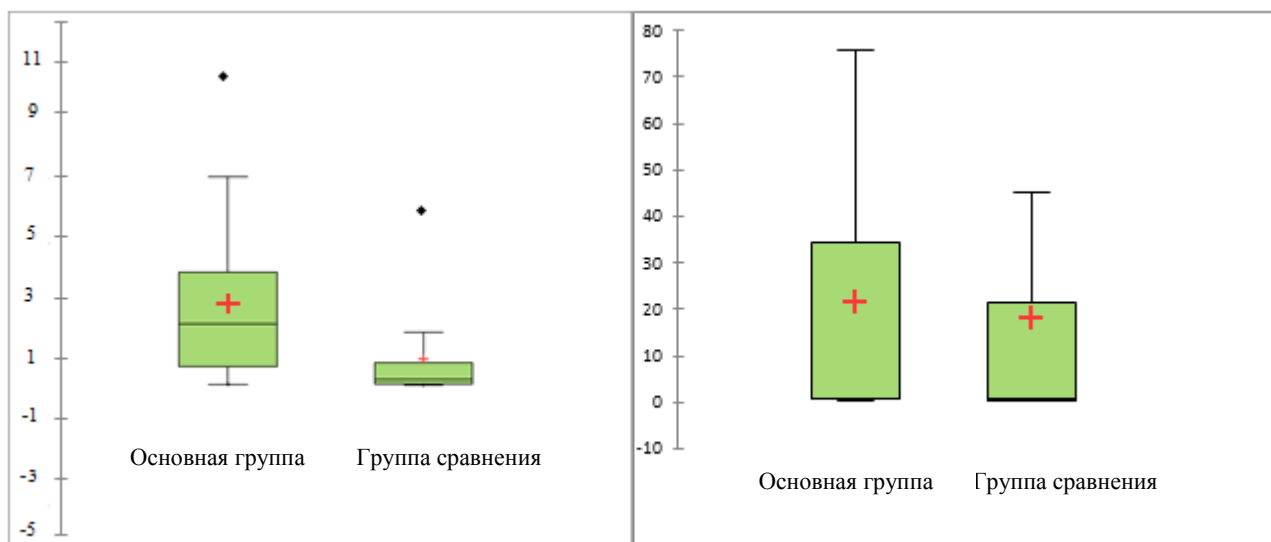
А Размах распределения уровней IL-2

Б Размах распределения уровней IL-4

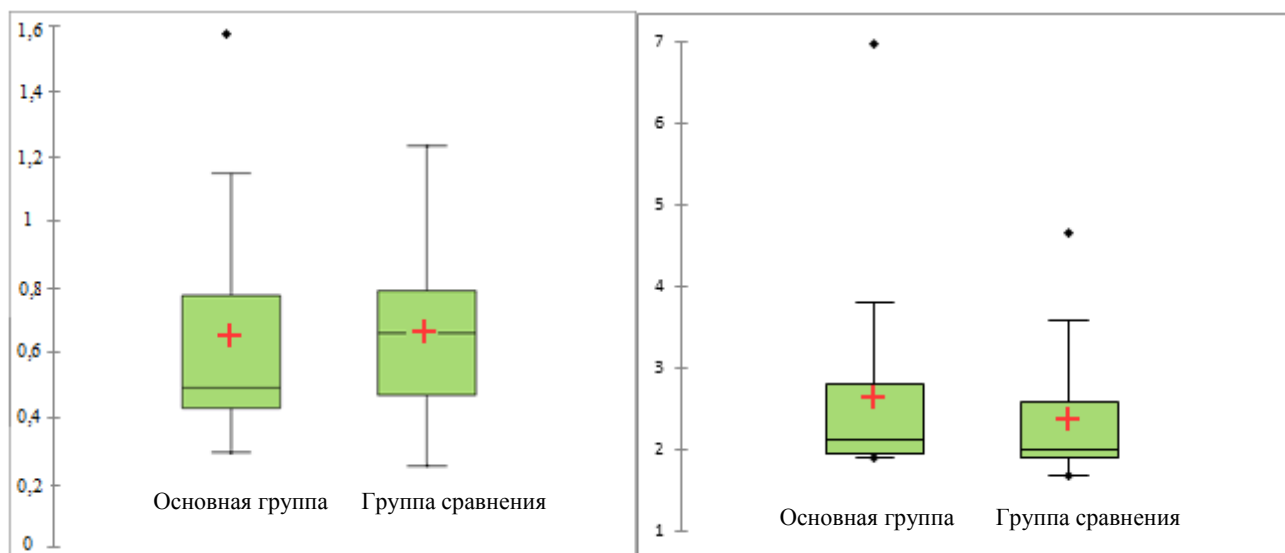


В Размах распределения уровней IL-6

Г Размах распределения уровней IL-8



Д Размах распределения уровней IL-10

Е Размах распределения уровней IFN γ 

Ж Размах распределения уровней GM-CSF

З Размах распределения уровней TNF α

Рисунок 17. Диаграмма размаха распределения уровней анализируемых показателей в основной и группе сравнения. Содержание интерлейкинов представлено в пг/мл. +- средние значения, • – максимум и минимум. А: *P* – значение для IL-2, рассчитанное с помощью *U* – критерия Манна – Уитни, составило 0,594; Б: *P* – значение, для IL-4, составило 0,955; В: *P* – значение, рассчитанное с помощью *U* – критерия Манна – Уитни, составило **0.046**

Уровень IL-6 и IL-10 имели корреляцию и с фвДНК и овДНК ($p < 0.05$) в группе с ПЭ. В группе сравнения подобных корреляций не наблюдалось.

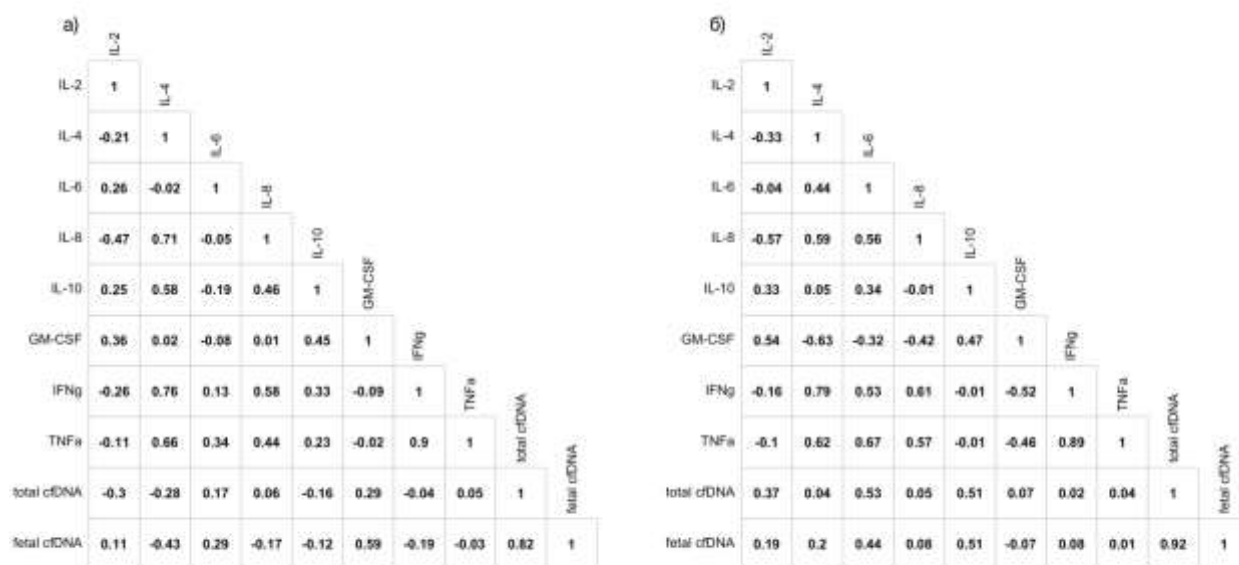


Рисунок 18. Корреляция показателей в исследуемых группах.

а) Коэффициент ранговой корреляции Спирмена в группе сравнения

б) Коэффициент ранговой корреляции Спирмена в основной группе.

Таким образом, достоверные различия между группами были обнаружены в уровне IL-6 и IL-10. Также при ПЭ наблюдалось погранично-значимое повышение фактора некроза опухоли альфа. Увеличение уровня внеклеточной ДНК коррелирует с уровнем про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови матери что отражает интенсивность системного воспалительного ответа при ПЭ.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Преэклампсия характеризуется значительным нарушением функций жизненно важных органов и систем, включающих в себя поражение сердечно-сосудистой системы, активацию синдрома системной воспалительной реакции, нарушение функции почек с последующим развитием полиорганной недостаточности, и сопровождается высокой материнской заболеваемостью.

Неблагоприятные исходы для плода связаны с формированием хронической гипоксии и высокой частотой задержки роста плода, а так же с преждевременным родоразрешением. По данным ВОЗ около 63 тысяч матерей и 500 тысяч младенцев ежегодно умирают вследствие ПЭ и эклампсии, при этом не разработаны общедоступные ранние критерии диагностики этого синдрома и отсутствуют эффективные методы лечения, кроме родоразрешения.

Нет однозначного мнения о том, что является факторами риска развития преэклампсии. Поиск предикторов ранней и поздней ПЭ лежит в основе профилактики осложненного течения беременности и является актуальной задачей современного акушерства.

В нашем исследовании при проведении сравнительного анализа соматической патологии среди обследованных пациенток были выявлены статистически значимые различия между I и II группами. Так, обследованные беременные женщины из группы сравнения имели меньший ИМТ, чем женщины с ПЭ ($p < 0,05$).

Нарушение жирового обмена достоверно чаще встречалось в I группе (ПЭ) (13,5%, OR=2,1; CI=1,1-8,3) по сравнению со II группой (сравнения) (3,5% $n=3$) ($p < 0,01$). Среди заболеваний сердечно - сосудистой системы в основной группе превалировала ВСД по гипертоническому типу (14,7%, OR=3,1; CI=2,6-4,3) ($p < 0,01$). Статистически значимых различий в частоте заболеваний органов мочевого выделения, пищеварения и эндокринной системы не выявлено. В структуре гинекологических заболеваний в основной группе превалировали сальпингоофорит (5,5%, OR=3,6; CI=1,8-4,3) и эндометрит (4,8%, OR=1,8; CI=2,1-

7,3). Следует отметить, что первобеременные первородящие пациентки достоверно чаще встречались в группе с ПЭ, составив (73,3%, OR=5,2; CI=4,1-12,3).

При этом достоверных различий в частоте искусственного и самопроизвольного прерывания беременности, неразвивающейся беременности выявлено не было. Особый интерес представлял анализ семейного анамнеза преэклампсии в исследуемых подгруппах. Были получены статистически значимые различия в частоте выявленных случаев преэклампсии у родственных пробандов (матерей) пациенток из подгруппы тяжелой преэклампсии (3,5%, OR=3,1; CI=2,1-3,2). Также в этой группе чаще отмечалось указание на наличие детей с ЗРП (4,2%, OR=2,1; CI=1,9-3,3).

При анализе течения беременности в первом триместре при ПЭ статистически значимо чаще отмечался ранний токсикоз (11,5%, OR=4,3; CI=2,1-6,3), угроза прерывания беременности с формированием ретрохориальной гематомы (4,5%, OR=3,3; CI=4,2-14,3).

Во втором триместре такие осложнения, как угроза прерывания беременности и ИЦН примерно с одинаковой частотой отмечены в обеих группах. Однако выявлена статистически значимая более высокая частота ЗРП при ПЭ (22,5%, OR=7,1; CI=3,1-9,3). В третьем триместре частота отеков составила в подгруппе с тяжелой ПЭ 87,8% (OR=8,1; CI=3,1-19,3) случаев, в подгруппе с умеренной ПЭ 76,8% (OR=7,6; CI=2,9-14,6), что было статистически выше, чем в группе сравнения (14,3% n=12) ($p < 0,01$). Угроза преждевременных родов осложнила примерно одинаковое число беременностей во всех обследованных группах: в подгруппе с тяжелой ПЭ у 7,3% (n=3) женщин, в подгруппе с умеренной ПЭ у 5,4% (n=3) беременных и у 9,5% n=8 в группе сравнения.

При сравнительном анализе сроков родоразрешения в обследованных группах установлено, что срок родоразрешения в подгруппе с ПЭ составил $32,2 \pm 3,05$, а группе сравнения $39,28 \pm 0,7$.

Длительность пролонгирования беременности с момента манифестации ПЭ и до момента родоразрешения в подгруппе в тяжелой ПЭ были достоверно ниже, чем при умеренной ПЭ, ($5,7 \pm 4,9$) против $10,4 \pm 7,2$ дней, соответственно ($p < 0,01$).

Необходимость экстренного родоразрешения в подгруппах с ПЭ была обусловлена выраженными нарушениями состояния плода, такими как отрицательный или «нулевой» кровоток по данным доплерометрии, нарастанием тяжести ПЭ, отсутствием эффекта от проводимой антигипертензивной терапии и присоединением неврологической симптоматики и составила 100% и 58% соответственно.

Результаты изучения исхода родов для плода и течения раннего неонатального периода у новорождённых показали, что у детей в подгруппах с ПЭ достоверно чаще диагностировалась асфиксия (23,5%, OR=3,5; CI=2,5-6,3), РДС (25,1%, OR=4,1; CI=1,5-11,3), ЗРП (17,5%, OR=3,1; CI=4,2-8,7).

Неонатальные исходы в подгруппе с тяжелой ПЭ, по сравнению с умеренной ПЭ, были более неблагоприятны, что обусловлено более ранними сроками родоразрешения и ЗРП. Неонатальные исходы в подгруппе умеренной ПЭ были сопоставимы с группой сравнения, что связано с поздними сроками родоразрешения, более редким сочетанием умеренной ПЭ с ЗРП.

Таким образом, беременные с ПЭ достоверно чаще имели высокую частоту сердечно - сосудистых заболеваний, отягощенный соматический и акушерский анамнез, беременность у них протекала с большим количеством осложнений.

Вышеперечисленное свидетельствует о нарушении микроциркуляции в системе «мать-плацента-плод», что и является основной причиной перинатальных осложнений. При этом, различные предикторы часто сочетаются. Так, в нашем исследовании асфиксия тяжелой степени всегда была связана с ЗРП и недоношенностью. Аналогичные тенденции описывают и другие авторы [2].

Очевидно, что перинатальные исходы при ПЭ будут зависеть от множества взаимосвязанных факторов, основными из которых будут срок и метод родоразрешения, которые, в свою очередь, во многом определяются тяжестью ПЭ.

Поэтому было необходимо по возможности минимизировать влияние этих конфаундеров. Была сформирована подгруппа беременных, родоразрешенных оперативным путем в срок до 35,5 недель. Это позволило добиться сопоставимой структуры показаний к операции КС, что было необходимо для дальнейшего анализа. В результате доля родоразрешений в интересах матери была одинаковой как при умеренной, так и при тяжелой ПЭ, что явилось косвенным подтверждением адекватности формирования этой подвыборки. Далее анализ проводился отдельно в зависимости от ведущего показания к оперативному родоразрешению, что позволило свести к минимуму влияние этого конфаундера. Медиана сроков родоразрешения в этих подгруппах была сопоставима, что позволило в дальнейшем оценить перинатальные исходы и ряд лабораторных показателей. Следствием проведенного отбора явилось сокращение исходной выборки, и, как следствие, снижение мощности исследования. Поэтому по ряду исходов не было достигнуто статистической значимости. Тем не менее, частота и тяжесть респираторных нарушений у новорожденных явились информативным показателем для анализа. Поскольку развитию асфиксии новорожденного способствует наличие экстрагенитальной патологии у беременной [21] и сходные тенденции были получены по другим, более редким перинатальным исходам (РДС, ВУИ), что позволило сделать вывод о наличии общих неспецифических причин. Важно понимать, что чаще всего асфиксия новорожденных является следствием гипоксии плода во время беременности. По данным обследования 2293 беременных только в 37,6% случаев причиной асфиксии новорожденного были осложнения в родах [10]. Среди причин асфиксии новорожденных отмечают нарушение микроциркуляции в системе мать-плацента-плод с формированием внутриутробной гипоксии [14], что, очевидно, имеет место при ПЭ. В другой работе выделяется 23 признака, ассоциированных с асфиксией новорожденных [2, 3]. Среди них, в частности, показатели венозного кровотока в системе «мать — плод», показатели артериального кровотока в системе «мать — плацента — плод», пропорциональность развития плода; структурные особенности плаценты. Между тяжестью состояния новорожденного и наличием эклампсии различной

степени тяжести обнаружено существование средней корреляционной связи.

Поскольку перинатальные исходы при родоразрешении до 35,5 недель в интересах матери были хуже, чем при родоразрешении в интересах плода, можно сделать предположение о недооценке тяжести состояния плода при ухудшении состояния беременной. Это согласуется с мнением ряда авторов [152, 169]. Более благоприятные перинатальные исходы при родоразрешении в интересах плода свидетельствуют об эффективности активной акушерской тактики для профилактики неонатальной заболеваемости.

Системная воспалительная реакция в сосудистом русле плода, развивающаяся при тяжелой форме преэклампсии, находясь в большинстве случаев в компенсаторном состоянии, не может быть в полной мере диагностирована современными инструментальными методами исследования, визуализирующими изменения на территории плода только в стадии декомпенсации. Таким образом, можно предположить, что диагностика внутриутробного состояния плода не может в полной мере отобразить реальную картину состояния внутриутробного пациента при тяжелой преэклампсии и требует дальнейших научных исследований в этом направлении разработки новых неинвазивных диагностических и прогностических тестов, отображающих состояние плода и фето – плацентарного комплекса при тяжелой преэклампсии.

Поиск наиболее оптимальных маркеров состояния фетоплацентарного комплекса, в.т.ч. при ПЭ является одной из актуальных задач современного акушерства.

Выявление взаимосвязей между про- и противовоспалительными цитокинами, а также овДНК и фвДНК в плазме крови матери при ПЭ, позволил оценить связь между системным воспалительным ответом и уровнем внеклеточной ДНК для выявления возможных причин и механизмов развития ПЭ.

На сегодняшний день установлена возможность использования фвДНК в качестве прогностического маркера для ранней диагностики таких патологических состояний, ассоциированных с беременностью, как ПЭ, ЗРП, ПР, ранний токсикоз беременных. Уровень фвДНК достоверно увеличивается до

начала проявления клинических симптомов осложнений беременности. Механизмом действия включает в себя сочетание апоптоза, апонекротических и воспалительных явлений, которые проявляются в ходе развития плацентарной ткани. Таким образом, оценку уровня фвДНК в периферической крови беременной можно рассматривать в качестве дополнения к методам ранней оценки тяжелых осложнений беременности.

В ходе работы было проведено сравнение диагностической и прогностической ценности оценки уровня двух типов свободной внеклеточной ДНК: общей (содержащей материнскую и плодовую фракции) и только плодовой ДНК. В ходе анализа были получены несколько лучшие диагностические характеристики для общей ДНК. Несмотря на то, что эти различия не были статистически значимыми, полученные результаты стали веским основанием для выбора именно общей внеклеточной ДНК для практического применения. Основной причиной стали технологические аспекты. Так как доля свободной внеклеточной ДНК плодового происхождения составляет от 3 до 10% общей внеклеточной ДНК, то ее абсолютное содержание крайне низкое и определение уровня сопряжено с большими аналитическими ошибками. Кроме того, идентификация именно плодовой фракции требует проведения дополнительных этапов анализа (в нашем случае для этого использовалась метил-чувствительная рестрикция). ФвДНК рассматривается как перспективный прогностический маркер уже более 10 лет, однако до сих пор не создано тест-системы для клинического применения. Некоторые исследователи отмечают методические сложности как главное препятствие широкого использования для диагностики уровня фетальной ДНК. Таким образом, доказательство того, что аналитические и диагностические характеристики оценки уровня общей внеклеточной ДНК не хуже, чем таковые для фетальной ДНК имеет важное практическое значение.

В нашей работе мы установили, что более точным диагностическим маркером ПЭ является повышение уровня овДНК по сравнению с уровнем фвДНК в крови матери. Подобные результаты ранее были получены Salvianti et al. [164]. Эти данные указывают на то, что причина манифестации ПЭ наиболее

вероятно находится в кровеносной системе матери, и меньше связана с процессами, протекающими в плаценте, при этом, как известно, потенциальная возможность развития ПЭ связана с неправильным формированием плаценты в 9-11 недель. Одним из факторов, в результате которого развивается ПЭ, может быть активация эндотелия сосудов, с последующим его разрушением, что отражается в увеличении уровня овДНК. Chen et al. показали, что уменьшение тяжести ранней формы тяжелой ПЭ может быть связано с переходом эндотелиальных клеток из активированного состояния в нормальное [45]. Не ясно, какие факторы приводят к активации и разрушению эндотелия. Предполагается, что данные факторы высвобождаются из плаценты при недостаточной ее инвазии в матку [151, 155]. Но, возможно, причиной активации и последующего разрушения эндотелия сосудов матери при ПЭ является повышенный в 2-3 раза уровень АФК в крови во время беременности [11], а в случае нормы такой активации не происходит, что связано с адаптацией эндотелия сосудов к окислительному стрессу, происходящей во время беременности.

Мы обнаружили высокий уровень корреляции между овДНК и фвДНК у женщин с ПЭ. Это позволяет предположить, что клетки плаценты, источник фвДНК в крови матери, возможно, разрушаются под воздействием тех же факторов, что и эндотелий материнских сосудов.

В результате нашего исследования установлено, что уровни белков плацентарного происхождения циркулируют в крови беременных с ПЭ, отражая экспрессию плацентарного гена, связанного с профилями метилирования плацентарной ДНК. Таким образом, профилирование плацентарной ДНК в сыворотке крови беременной может стать прогностическим маркером реализации ПЭ.

Однако на сегодняшний день включение большого количества клинических параметров, являющихся конфаундерными, могут существенно повлиять на предикционную точность данного метода.

Samantha L. Wilson et al. в своей работе отобрали основные процессы, которые могут влиять на связь между ДНК, экспрессией генов и экспрессией

белка. На рисунке 19 авторами данной статьи представлены основные причины, по которым на сегодняшний день не представляется возможным найти корреляцию между плацентарной ДНК и экспрессией гена или между экспрессией гена плаценты и циркулирующими уровнями плацентарного белка в материнской крови [201].

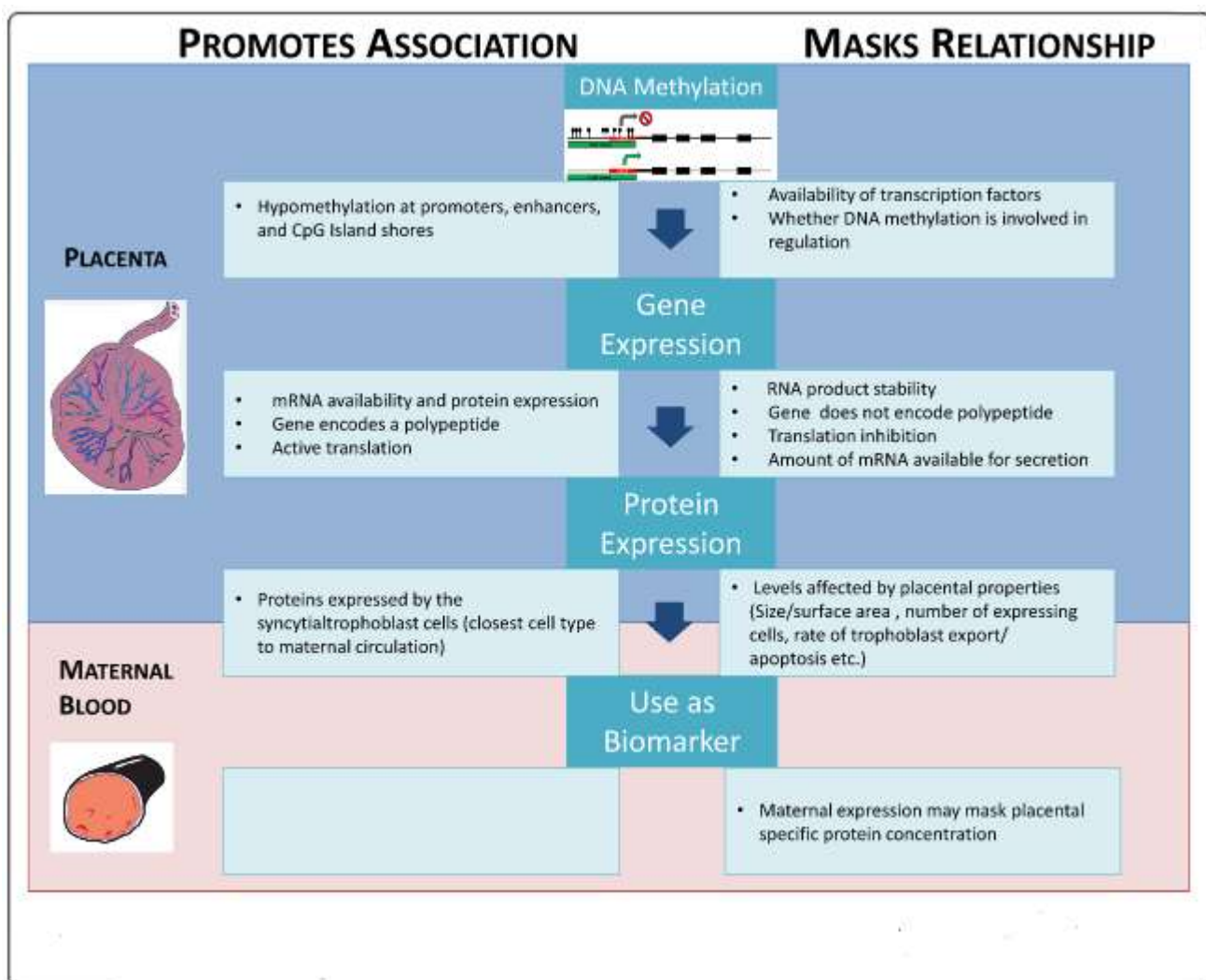


Рисунок 19. Процессы, влияющие на связь между ДНК, экспрессией генов и экспрессией белка [201].

Результаты авторов статьи показывают, что установление корреляции между уровнем ДНК в ворсинах плаценты и изменением уровней белка в материнской сыворотке зависит от ряда факторов. Тем не менее, определение уровня ДНК может быть полезным инструментом для выявления новых биомаркеров неблагоприятных исходов беременности.

Выявление более низких значений овДНК среди женщин, у которых лечение ПЭ привело к клиническому и лабораторному улучшению, свидетельствует, о том, что наблюдение за динамикой уровня овДНК в процессе лечения ПЭ может быть прогностическим фактором дальнейшего развития ПЭ.

Основываясь на данном наблюдении, основная группа пациенток была разделена на 2 подгруппы: умеренная ПЭ (n=56) и тяжелая ПЭ (n=41) с последующим сравнительным анализом показателей уровня внеклеточной ДНК в двух точках – в момент поступления в стационар с диагнозом ПЭ и через 48 часов от момента начала терапии.

При анализе уровня овДНК в сыворотке крови беременных с ПЭ, разделенных на две подгруппы, наиболее высокие показатели были зарегистрированы у пациенток с тяжелой ПЭ (6780 ГЕ/мл, $p=0,01$), наиболее низкие в подгруппе с умеренной ПЭ (5820 ГЕ/мл, $p=0,01$).

В результате проведенного исследования установлено влияние лечения метилдопой и $MgSO_4$ на сывороточные уровни овДНК. У беременных с умеренной ПЭ, антигипертензивная и магниевая терапия была связана со значительным падением концентрации уровня овДНК в плазме крови ($p=0,001$) по сравнению с беременными из подгруппы тяжелой ПЭ, в которой однако наблюдалась устойчивая тенденция к снижению данного показателя на фоне терапии, не достигшая статистической значимости. В исследовании Asma Khalil et al., посвященном изучению эффекта антигипертензивной терапии Метилдопой на изменение уровня ангиогенных факторов у беременных с гипертоническими расстройствами, доказана роль данного препарата на эндотелиальные клетки при ПЭ с последующим снижением факторов ангиогенеза [96]. Tamar Eshkoli et al. также провели оценку изменения секреции уровня sFlt-1 в плаценте от пациенток с преэклампсией, но после внутривенной терапии сульфатом магния. В результате исследования авторы установили, что в плацентах от пациенток с преэклампсией концентрация sFlt-1 после терапии $MgSO_4$ не показала достоверных изменений. Этот результат может указывать на то, что $MgSO_4$ действует симптоматически и не влияет на плацентарную экспрессию про- или ангиогенных факторов [62].

Опираясь на данные международного опыта, можно предположить, что существенное снижение уровня овДНК у беременных с ПЭ в нашем исследовании напрямую связано с проведением антигипертензивной терапии метилдопой, оказывающим непосредственное протективное влияние на клетки эндотелия. Однако, учитывая использование многокомпонентной терапии у пациенток, вошедших в наше исследование, установить прямое влияние метилдопой на снижение уровня овДНК не представляется возможным.

Полученные данные указывают на перспективность прогностического использования определения уровня овДНК в сыворотке беременных с ПЭ с целью оценки успеха проводимой терапии. Последующие исследования в данном направлении позволят применять овДНК для подбора персонифицированных схем терапии ПЭ.

Сравнительный анализ неонатальных исходов в зависимости от изменения уровня овДНК на фоне проводимой терапии в подгруппе с умеренной ПЭ, в которой были выявлены статистически значимые показатели снижения овДНК через 48 часов от начала лечения. Уровень овДНК у пациенток с ПЭ является показателем напряженности системного воспалительного ответа, поддающийся воздействию терапии на этапе умеренной ПЭ и, судя по результатам проведенной работы, не отвечающему снижению при запущенных массивных системных нарушениях при тяжелой ПЭ. Так в подгруппе беременных с умеренной ПЭ 80% здоровых новорожденных, были рождены от матерей со статистически достоверным снижением уровня овДНК на фоне проводимой терапии. 20% новорожденных от матерей, не ответивших на лечение снижением уровня овДНК, при рождении имели такие осложнения, как РДС, асфиксию, малый вес к сроку гестации. Период адаптации этих детей протекал с явлениями гипербилирубинемии, транзиторного тахипноэ и требовал их перевода для дальнейшей терапии и наблюдения в отделение реанимации и патологии новорожденных.

Поскольку перинатальные исходы при родоразрешении до 35,5 недель в интересах матери были хуже, чем при родоразрешении в интересах плода, можно

сделать вывод о недооценке тяжести состояния плода при ухудшении состояния беременной. В качестве потенциального маркера состояния плода был проведен анализ уровня свободной внеклеточной ДНК в зависимости от перинатальных исходов.

У пациенток, дети которых имели асфиксию умеренной и тяжелой степени уровень свободной внеклеточной ДНК был несколько выше, но различия не достигали статистической значимости. При этом наблюдалась высокая вариабельность этого показателя.

Для оценки влияния лечения на уровень свободной внеклеточной ДНК был проведен повторный анализ через 48 часов терапии. Также была рассчитана разница между конечным и исходным уровнем. Положительные значения соответствовали приросту а отрицательные – снижению уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения.

Медиана разницы уровня свободной внеклеточной ДНК была выше у пациенток, дети которых имели асфиксию, что свидетельствовало о нарастании уровня свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения. У женщин, дети которых не имели асфиксии, уровень свободной внеклеточной ДНК в процессе лечения снижался или оставался неизменным.

Статистически значимые различия в уровне свободной внеклеточной ДНК зафиксированы только в случае родоразрешения по показаниям со стороны матери. Это может свидетельствовать о недооценке в ряде случаев тяжести состояния плода. Таким образом, для улучшения перинатальных исходов требуется более информативный маркер оценки состояния плода при ПЭ у матери. Поскольку уровень фетальной ДНК связан с состоянием фетоплацентарного комплекса, а снижение этого показателя в ответ на лечение связан с благоприятными перинатальными исходами, был проведен анализ информативности данного показателя при ПЭ. Повышение уровня свободной внеклеточной ДНК является неблагоприятным прогностическим критерием, хотя, в силу ограниченности выборки, статистически значимые различия достигнуты только для умеренной или тяжелой асфиксии.

Таким образом овДНК может выступать в роли прогностического маркера неонатальных исходов в каждой конкретной ситуации и служить показателем выбора сроков родоразрешения.

Внеклеточная циркулирующая ДНК присутствует в кровотоке в виде коротких фрагментов, которые могут взаимодействовать с клетками естественного иммунитета, вызывая их активацию. При исследовании цитокинов мы не обнаружили различий в уровнях $IFN\gamma$ и IL-4 – маркеров активности про-противовоспалительных лимфоцитов Th1 и Th2. При этом уровень IL-10, который в основном продуцируют моноциты [141] был достоверно повышен в группе ПЭ. Это также подтверждается данными других исследований [184]. Считается, что IL-10 обладает противовоспалительным эффектом, об этом может свидетельствовать его корреляция с IL-4 в группе сравнения. Однако в случае ПЭ наблюдается корреляция IL-10 и GM-CSF, фактора способного поляризовать макрофаги в сторону провоспалительного M1-фенотипа. Известно, что в момент апоптоза макрофаги выделяют значительное количество IL-10 [38]. При этом апоптоз макрофагов может быть непосредственно связан с внеклеточной ДНК. Choi et al. установили, что без макрофагов некротические или апоптотические клетки практически не высвобождают ДНК во внеклеточное пространство. Однако при взаимодействии с некротическими или апоптотическими клетками макрофаги сами подвергаются апоптозу, что, может вносить свой вклад в уровень внеклеточной ДНК [48]. Обнаруженная нами корреляция уровня IL-10 как с овДНК, так и с фвДНК при ПЭ указывает на возможную роль макрофагов в разрушении и эндотелия сосудов, и клеток трофобласта плаценты. Известно, что уровень IL-10 снижается в процессе беременности примерно в три раза [184], что возможно связано с возникновением иммунной толерантности к плоду, выраженной в снижении способности макрофагов к апоптозу. Таким образом, повышенный уровень IL-10 при ПЭ может отражать формирование недостаточной иммунной толерантности. Полученные нами результаты, о том, что IL-6 повышен при ПЭ, также подтверждаются другими исследователями [195]. Высокая корреляция IL-6 и $IFN\gamma$, фактора поляризующего макрофаги в

сторону M1-фенотипа, а также $TNF\alpha$, фактора продуцируемого макрофагами M1-фенотипа, указывает на связь IL-6 и активности провоспалительных макрофагов. IL-6, как и IL-10, коррелировал и с уровнем овДНК и с уровнем фвДНК. В группе сравнения подобных корреляций не наблюдалось.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать предположение, что причиной развития ПЭ может быть разрушение эндотелия материнских сосудов и клеток трофобласта плаценты при повышенной активности провоспалительных макрофагов.

Своевременное выявление беременностей с риском реализации ПЭ имеет решающее значение для улучшения мониторинга и профилактической терапии данного осложнения для оптимизации результатов лечения и улучшения перинатальных исходов.

ВЫВОДЫ

1. К факторам риска развития преэклампсии относятся сердечно – сосудистые заболевания, нарушение жирового обмена и отягощенный семейный анамнез по преэклампсии.

2. Течение беременности при преэклампсии ассоциировано с высоким риском угрозы прерывания в первом триместре с формированием ретрохориальной гематомы, угрозой преждевременных родов и задержки роста плода во втором и третьем триместрах.

3. Уровень общей и фетальной внеклеточной ДНК в крови матери при преэклампсии имеет высокую диагностическую ценность.

4. Преэклампсия характеризуется повышением уровней провоспалительных цитокинов и наличием взаимосвязей между внеклеточной ДНК в крови матери и цитокинами имеющими, в основном, моноцитарное происхождение.

5. Повышение уровня внеклеточной ДНК на фоне проводимой терапии преэклампсии свидетельствует о ее неэффективности и высоком риске перинатальных осложнений.

6. Разработанный алгоритм позволит оценить степень тяжести преэклампсии для решения своевременного вопроса о сроке родоразрешения для снижения перинатальных осложнений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Беременным группы высокого риска целесообразно определение уровней свободной внеклеточной ДНК для своевременной верификации тяжести преэклампсии и определения тактики ведения.

2. У беременных с преэклампсией целесообразно определение в крови уровня общей внеклеточной ДНК, имеющее высокую диагностическую ценность для оценки тяжести преэклампсии.

3. Динамическое определение внеклеточной ДНК в крови матери с преэклампсией целесообразно для оценки эффективности проводимой терапии и оптимизации срока родоразрешения.

4. Ведение беременных группы высокого риска необходимо проводить согласно разработанному алгоритму.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ** – артериальная гипертензия
- АД** – артериальное давление
- АЛТ** – аланинаминотрансфераза
- АСТ** – аспартатаминотрансфераза
- АФК** – активные формы кислорода
- ВСД** – вегето-сосудистая дистония
- ДАД** – диастолическое артериальное давление
- ЗРП** – задержка роста плода
- ИБС** – ишемическая болезнь сердца
- ИМТ** – индекс массы тела
- КСМА** – кровоток среднемозговой артерии
- ЛПВП** – липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП** – липопротеиды низкой плотности
- МПК** – маточно-плацентарный кровоток
- мРНК** – микроРНК
- овДНК** – общая внеклеточная ДНК
- ОАА** – отягощенный акушерский анамнез
- ПИ** – пульсационный индекс
- ПН** – плацентарная недостаточность
- ПЭ** – преэклампсия
- РДС** – респираторный дистресс синдром
- САД** – систолическое артериальное давление
- СД** – сахарный диабет
- СПКЯ** – синдром поликистозных яичников
- УЗИ** – ультразвуковое исследование
- фвДНК** – фетальная внеклеточная ДНК
- ФПК** – фето-плацентарный кровоток
- ХАГ** – хроническая артериальная гипертензия

ADAM12 – металлопротеаза 12, связывающая инсулиноподобный фактор роста

PlGF – плацентарный фактор роста

sFit-1 – специфический растворимый рецептор-1 для тирозинкиназы

VEGF – фактором роста эндотелия сосудов

sEng – растворимый эндоглин

PAPP-A – крупный высокогликозилированный белок, образованный путем выработки трофобластных клеток

PP-13 – галектин 13, семейства карбогидрат-связывающих белков (b-галактозид-специфичный лектин в синцитиальном слое трофобластов)

ACE – ангиотензин-преобразующий фермент

CTLA4 – цитотоксический белок-4, ассоциированный с Т-лимфоцитами

F2 – фактор 2

FV – фактор V

LPL – липопротеин-липаза

SERPIN1 – ингибитор серпин-пептидазы-1

SNPs – однонуклеотидные полиморфизмы

cfDNA – внеклеточная фетальная ДНК

RASSF1A – ген-супрессор опухолевого роста

IDO – индоламин 2,3-диоксигеназа

MHC – главный комплекс гистосовместимости

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барков И.Ю., Плацентарный мозаицизм по хромосоме 7, выявленный по результатам полногеномного неинвазивного ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери / И.Ю. Барков [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – №10. – С. 59-63. (214)
2. Батман, Ю.А. Прогнозирование развития дезадапционного синдрома и асфиксии у новорожденных // Здоровье ребенка. – 2007. - №4 (7). – С. 51-57. (196)
3. Факторы риска и прогноз развития пневмонии у новорожденных / В.В. Викторов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т.8, № 3. – С. 62-67. (197)
4. Митохондрии плаценты в норме и при преэклампсии / П.А. Вишнякова П.А. [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. – №5. – С. 5-8. (210)
5. Дубровина, С.О. Ранние предикторы преэклампсии /С.О. Дубровина С.О., Ю.С. Муцалханова Ю.С., В.В. Васильева // Акушерство и гинекология. – 2018. – №10. – С. 47-51. (200)
6. Диагностическая значимость определения плацентарного фактора роста и растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 в качестве маркеров преэклампсии / Т.Ю. Иванец [и др.] // Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21. – №4. – С. 129-133. (212)
7. Комплексный подход к прогнозированию преэклампсии с учетом молекулярно-генетических и клинических факторов / Н.Е. Кан [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – №4. – С. 35-41. (205)
8. Карапетян, А.О. Роль внеклеточной ДНК плода в прогнозировании больших акушерских синдромов / А.О. Карапетян, М.О. Баева, О.Р. Баев // Акушерство и гинекология. – 2018. – №4. – С. 10-15. (206)
9. HELLP-синдром: клинико-лабораторные особенности и дисбаланс плацентарных факторов ангиогенеза / Т.В. Кирсанова Т.В. [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – №7. – С. 46-55. (203)

10. Частота и особенности течения беременности и родов у женщин с асфиксией новорожденного / М.Ф. Киселевич [и др.] // И нновационное развитие: потенциал науки и современного образования: сборник трудов конференции (Пенза, 5 января 2018г.). – Белгород, 2018. – С. 235 – 239. (194)
11. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности / А.М. Красный [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2016. – №5. – С.90-95. (177)
12. Лемешевская, Т.В. Прогнозирование преэклампсии при проведении расширенного комбинированного пренатального скрининга первого триместра беременности / Т.В. Лемешевская, О.В. Прибушена // Акушерство и гинекология. – 2017. – №12. – С. 52-59. (207)
13. Клиническое значение предикторов преэклампсии, возможности прогнозирования / А.Е. Николаева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. – №11. – С. 30-36. (208)
14. Постнов, А.С. Предикторы риска формирования тяжелой асфиксии новорожденных / А.С. Постнов, Е.А. Баева // Научно-практическая конференция «Современные технологии в педиатрической практике»: сборник трудов конференции (Самара, 7 сентября 2015г.). – Самара, 2015. – С 166-167. (195)
15. Серов, В.Н. Прогностическое значение отношения растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 к плацентарному фактору роста у беременных с преэклампсией / В.Н. Серов, Н.Е. Кан, В.Л. Тютюнник // Акушерство и гинекология. – 2016. – №6. – С. 5-10. (211)
16. Сидорова, И.С. Перспективы лечения преэклампсии / И.С. Сидорова, Н.А. Никитина // Акушерство и гинекология. – 2018. – №6. – С. 5-10. (204)
17. Сухих, Г.Т. Иммунные факторы в этиологии и патогенезе осложнений беременности / Г.Т. Сухих, Л.В. Ванько // Акушерство и гинекология. – 2012. – №1. – С. 128-136. (213)
18. Материнские и перинатальные исходы при ранней и поздней преэклампсии / Г.В. Хлестова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. – №6. – С. 41-47. (209)

19. Ацетилсалициловая кислота в профилактике преэклампсии и ассоциированных акушерских и перинатальных осложнений / З.С. Ходжаева З.С. [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – №8. – С. 12-18. (201)
20. Прогнозирование преэклампсии в первом триместре на основе клинико-anamнестических факторов, биомаркеров и 3D-энергетической доплеровской оценки васкуляризации плацентарного ложа / А.М. Холин [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – №8. – С. 56-65. (202)
21. Асфиксия новорожденных / Н.П. Шабалов, В.А. Любименко, А.Б. Пальчик, В.К. Ярославский. – М.: МЕДпресс-информ, 1999. – 416 с. (193)
22. Agathangelou, A. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers / A. Agathangelou, W.N. Cooper, F. Latif // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – №12. – P. 3497–3508. (119)
23. Maternal serum placental protein 13 at 11–13 weeks of gestation in pre-eclampsia / R. Akolekar [et al.] // Prenat. Diagn. – 2009. – Vol. 29. – №12. – P. 1103–1108. (18)
24. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks / R. Akolekar [et al.] // Prenat. Diagn. – 2011. – Vol. 31. – №1. – P. 66–74. (49)
25. Competing risks model in early screening for pre-eclampsia by biophysical and biochemical markers / R. Akolekar [et al.] // Fetal Diagn. Ther. – 2013. – Vol. 33. – №1. – P. 8–15. (60)
26. Correlation of P-selectin and lipoprotein(a), and other lipid parameters in pre-eclampsia / H. Aksoy [et al.] // Clin. Exp. Med. – 2002. – Vol. 2. – №1. – P. 39–43. (101)
27. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction / M.S. Alberry [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2009. – Vol. 200. – №1. – P. 1–6. (161)
28. Alvarez-Garcia, I. MicroRNA functions in animal development and human disease / I. Alvarez-Garcia, E.A. Miska // Development. – 2005. – Vol. 132. – №21. – P. 4653–4662. (122)

29. The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin is overwhelmed during pre-eclampsia— New biomarkers and potential targets for therapy / U.D. Anderson [et al.] // *Pregnancy Hypertens* – 2015. – Vol. 10. – P. 86. (21)
30. Free fetal hemoglobin and hemoglobin-scavenging proteins are predictive first and second trimester biochemical markers for pre-eclampsia / U.D. Anderson [et al.] // *Pregnancy Hypertens* – 2015. – Vol. 5. – P. 53. (22)
31. Fetal hemoglobin and α 1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for pre-eclampsia / U.D. Anderson [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 204 – №6 – P. 520 e1–e5. (23)
32. Andre, P. P-selectin in haemostasis // *Br. J. Haematol.* – 2004. – Vol. 126. – №3. – P. 298–306. (93)
33. Women with pre-eclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin-A, activin-A and soluble E-selectin / N.A. Bersinger [et al.] // *Hypertens. Pregnancy* – 2003. – Vol. 22. – №1. – P. 45–55. (67)
34. Bersinger, N.A. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in pre-eclampsia and small-for-gestational age pregnancies / N.A. Bersinger, R.A. Odegard // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2004. – Vol. 83. – №1. – P. 37–45. (66)
35. Circulating microparticles: A marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by pre-eclampsia or intrauterine growth restriction / F. Bretelle [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2003. – Vol. 89. – P. 486–492. (99)
36. Prevention of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: A meta-analysis / Bujold E. [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 116. (Pt 1) – P. 402–414. (12)
37. Genetic variants in pre-eclampsia: A meta-analysis / A.J. Buurma [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2013. – Vol. 19. – №3. – P. 289–303. (110)
38. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes / M. Bzowska [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32. – №7. – P. 2011-2020. (186)

39. Placental expression profiling in pre-eclampsia: Local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes / M. Centlow [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90. – №5. – P. 1834–1843. (108)
40. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction / I. Cetin [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2006. – Vol. 194. – №5. – P. 1347–1353. (92)
41. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? / I. Cetin [et al.] // *Placenta* – 2011. – Vol. 32. – P. 4–16. (28)
42. First-trimester placental protein 13 screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction / I. Chafetz [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol. 197. – №1. – P. 35 e1–7. (80)
43. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia / T. Chaiworapongsa [et al.] // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* – 2002. – Vol. 12. – №1. – P. 19–27. (104)
44. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis / K.C. Chan [et al.] // *Clin. Chem.* – 2006. – Vol. 52. – №12. – P. 2211–2218. (181)
45. Reduction in the severity of early onset severe preeclampsia during gestation may be associated with changes in endothelial cell activation: A pathological case report / Q.Chen [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* – 2016. – Vol. 35. – №1. – P. 32–41. (183)
46. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma / S.S. Chim [et al.] // *Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 54. – №3. – P. 482–490. (133)
47. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas / R.W. Chiu [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170. – №3. – P. 941–950. (120)
48. Choi, J.J. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells / J.J. Choi, C.F. Reich, D.S. Pisetsky // *Immunology.* – 2005. – Vol. 115. – №1. – P. 55–62. (187)

49. MicroRNA expression profiles in placenta with severe pre-eclampsia using a PNA-based microarray / S.Y. Choi [et al.] // *Placenta*. – 2013. – Vol. 34. – №9. – P. 799–804. (126)
50. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: A systematic review and bivariable meta-analysis / J.S. Crossen [et al.] // *CMAJ*. – 2008. – Vol. 178. – №6. – P. 701–711. (39)
51. Accuracy of mean arterial pressure and blood pressure measurements in predicting pre-eclampsia: Systematic review and meta-analysis / J.S. Crossen [et al.] // *BMJ* – 2008. – Vol. 336. – P. 1117–1120. (45)
52. Conde-Agudelo, A. World Health Organization systematic review of screening tests for pre-eclampsia / A. Conde-Agudelo, J. Villar, M. Lindheimer // *Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 104. – №6. – P. 1367–1391. (139)
53. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of pre-eclampsia / A.M. Cotter [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №2. – P. 515–520. (113)
54. First trimester screening for early and late pre-eclampsia based on maternal characteristics, biophysical parameters, and angiogenic factors / F. Crovetto [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2015. – Vol. 35. – №2. – P. 183–191. (134)
55. Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia / A. Crowley [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2007. – Vol. 27. – №2. – P. 174–179. (153)
56. Cuckle, H.S. Screening for pre-eclampsia—Lessons from aneuploidy screening // *Placenta* – 2011. – Vol. 32. – P. 42–48. (19)
57. sFlt-1 controlled by CPAP in a pregnant patient with chronic hypertension, Pregnancy Hypertension / A.L. Daly [et al.] // *An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. – 2012. – Vol.2. – №3. – P. 240–339. (191)
58. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester / K. Deveci [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2009. – Vol. 35. – №1. – P. 94–98. (65)

59. Duley, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia / L. Duley // *Seminars in Perinatology* – 2009. – Vol. 33. – P. 130–137. (1)
60. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein / L.C. Dunlop [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 175. - №4. – P. 1147–1150. (95)
61. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by pre-eclampsia / D.A. Enquobahrie [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 204. – №2. – P. 178 e12–21. (123)
62. Perfusion with magnesium sulfate increases sFlt-1 secretion only in the fetal side of placenta of women with preeclampsia / T.Eshkoli [et al.] // *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* – 2013. – Vol. 26. – №2. – P. 116–122. (190)
63. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery / A. Farina [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 193. – №2. – P. 421–425. (165)
64. Maternal genotype and severe pre-eclampsia: A HuGE review/ F.M. Fong [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2014. – Vol. 180. – №4. – P. 335–345. (109)
65. Assesment of plasma cell-free fetal DNA using hypermethylated RASSF1A in maternal plasma in cases of spontaneous preterm labor / W. El-Garf [et al.] // *Gynecol. Obstet.* – 2013. – Vol. 12. – P. 49–52. (168)
66. Prediction of pre-eclampsia by mean arterial pressure at 11–13 and 20–24 weeks' gestation / D. Gallo [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2014. – Vol. 36. – №1. – P. 28–37. (47)
67. Gleicher, N. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance / N. Gleicher, V.A. Kushnir, D.H. Barad // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2017. – Vol. 34. - №4. - P. 425-430. (176)
68. Efficiency of first-trimester uterine artery Doppler, a-disintegrin and metalloprotease 12, pregnancy-associated plasma protein a, and maternal characteristics in the prediction of pre-eclampsia / K.R. Goetzinger [et al.] // *J. Ultrasound Med.* – 2013. – Vol. 32. – №9. – P. 1593–1600. (87)

69. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: A prospective longitudinal study / R. Gonen [et al.] // BJOG. – 2008. – Vol. 115. – №12. – P. 1465–1472. (79)
70. Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (Review) / V. Gourvas [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2012. – Vol. 6. – №1. – P. 23–27. (158)
71. Potential markers of pre-eclampsia—A review. *Reprod. Biol. Endocrinol* / S. Grill [et al.] // 2009. – Vol. 7. – P. 70. (117)
72. Grubb, A.O. Cystatin C—Properties and use as diagnostic marker // *Adv. Clin. Chem.* – 2000. – Vol. 35. – P. 63–99. (88)
73. Increased death of adipose cells, a path to release cell free DNA into systemic circulation of obese women / M. Haghiac [et al.] // *Obesity (Silver Spring)*. – 2012. – Vol. 20. – №11. – P. 2213–2219. (171)
74. Hahn, S. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? / S. Hahn, B. Huppertz, W. Holzgreve // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26. – №7. – P. 515–526. (143)
75. Plasma P selectin (GMP-140) and glycoflectin are elevated in pre-eclampsia and eclampsia: Their significances / A. Halim [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1996. – Vol. 174 (Pt 1). – P. 272–277. (103)
76. Hansson, S.R. Fetal hemoglobin in pre-eclampsia: A new causative factor, a tool for prediction/diagnosis and a potential target for therapy / S.R. Hansson, M. Gram, B. Akerstrom // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 25. – №6. – P. 448–455. (107)
77. Harrington, K. Early screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 37. – № 5. – P. 623–624. (17)
78. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism / L.K. Harris [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 169 – №6. – P. 1863–1874. (31)

79. Elevated soluble adhesion molecules in women with pre-eclampsia. Do cytokines like tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β cause endothelial activation/ W. Heyl. [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 1999. – Vol. 86. – №1. – P. 35–41. (102)
80. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor / I. Hoesli [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 100. – № 5, Pt 1. – P. 992–996. (164)
81. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women / M.R. Holthe [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 190. – №4. – P. 1128–1134. (96)
82. Hromadnikova, I. Extracellular nucleic acids in maternal circulation as potential biomarkers for placental insufficiency // *DNA Cell Biol.* – 2012. – Vol. 31. – №7. – P. 1221–1232. (130)
83. Absolute and relative quantification of placenta-specific micrnas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications / I. Hromadnikova [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2012. – Vol. 14. – №2. – P. 160–167. (131)
84. Hui, L. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: Charting the course from clinical validity to clinical utility // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 41. – №1. – P. 2–6. (140)
85. Placental angiogenesis, maternal and fetal vessels—A workshop report / B. Huppertz [et al.] // *Placenta* – 2007. – Vol. 28. – P. 94–96. (32)
86. Huppertz, B. Placental origins of pre-eclampsia: Challenging the current hypothesis // *Hypertension* – 2008. – Vol. 51. – №4. – P. 970–975. (77)
87. Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of pre-eclampsia / B. Huppertz [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2008. – Vol. 24. – №3. – P. 230–236. (78)
88. Free fetal DNA levels in patients at risk of preterm labour / S. Illanes [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2011. – Vol. 31. №11. – P. 1082–1085. (166)

89. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: Population based cohort study / Irgens H.U. [et al.] // *BMJ* – 2001. – Vol. 323. – P. 1213–1217. (5)
90. Isaacs, A. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon / A. Isaacs, R.A. Cox, Z. Rotem // *Lancet*. – 1963. – Vol. 282. – №7299. – P. 113–116. (111)
91. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery / T. R. Jakobsen [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2012. – Vol. 32. – №9. – P. 840–845. (167)
92. Down syndrome biochemical markers and screening for pre-eclampsia at first and second trimester: Correlation with the week of onset and the severity / J.H. Kang [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2008. – Vol. 28. – №8. – P. 704–709. (71)
93. Kar, M. Role of biomarkers in early detection of pre-eclampsia // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2014. – Vol. 8 – P. 1–4. (54)
94. Fetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death / R.J. Keogh [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100 – №6 – P. 834–841. (30)
95. Early pregnancy prediction of pre-eclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: The Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study / L.C. Kenny [et al.] // *Hypertension*. – 2014. – Vol. 64. – №3. – P. 644–652. (136)
96. Effect of Antihypertensive Therapy with Alpha Methyldopa on Levels of Angiogenic Factors in Pregnancies with Hypertensive Disorders [электронный ресурс] / A.Khalil [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3. №.7. – CD002766. (189)
97. Association of fetal derived hypermethylated RASSF1A concentration in placenta-mediated pregnancy complications / M.J. Kim [et al.] // *Placenta*. – 2013. – Vol. 34. – №1. – P. 57–61. (172)
98. Extensive platelet activation in pre-eclampsia compared with normal pregnancy: Enhanced expression of cell adhesion molecules / A. Konijnenberg [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1997. – Vol. 176. – №2. – P. 461–469. (97)

99. Induction of labour vs. expectant monitoring for gestational hypertension or mild pre-eclampsia after 36 weeks' gestation (HYPITAT): A multicentre, open-label randomised controlled trial / C.M. Koopmans [et al.] // *Lancet* – 2009. – Vol. 374. – №9694. – P. 979–988. (50)
100. Kristensen, K Increased cystatin C expression in the pre-eclamptic placenta / K. Kristensen, I. Larsson, S.R. Hansson // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 13. – №3. – P. 189–195. (89)
101. Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in pre-eclampsia / J. Laigaard [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 106. – №1. – P. 144–149. (86)
102. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A / J.B. Lawrence [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1999. – Vol. 96. – №6. – P. 3149–3153. (64)
103. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia / T. N. Leung [et al.] // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47. – №1. – P. 137–139. (148)
104. Circulating angiogenic factors and the risk of pre-eclampsia / R.J. Levine [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – №7. – P. 672–683. (55)
105. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia / R.J. Levine [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 190. – №3. – P. 707–713. (151)
106. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in pre-eclampsia / R.J. Levine [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – №10. – P. 992–1005. (63)
107. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future / C. Litton [et al.] // *Mt Sinai J Med.* – 2009. – Vol. 76. – №6. – P. 521–528. (145)
108. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum / Y.M. Lo [et al.] // *Lancet.* – 1997. – Vol. 350. – №9076. – P. 485–487. (141)

109. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia / Y.M. Lo [et al.] // *Clin. Chem.* – 1999. – Vol. 45. – №2. – P. 184–188. (147)
110. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in pre-eclampsia / Y.M. Lo [et al.] // *Clin. Chem.* – 1999. – Vol. 45. – №2. – P. 184–188. (116)
111. Lo, Y.M. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications // *Clin. Chem.* – 2000. – Vol. 46. – №12. – P. 1903–1906. (142)
112. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3 / F. Loechel [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 278. – №3. – P. 511–515. (83)
113. Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in pre-eclampsia / C.A. Lok [et al.] // *Platelets.* – 2007. – Vol. 18. – №1. – P. 68–72. (100)
114. Strategic Training Initiative in Research in the Reproductive Health Sciences S. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy / L.A. Magee [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* – 2008. – Vol. 30. – Suppl. 3. – P.1–48. (24)
115. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict pre-eclampsia: A systematic review / A. Martin [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2014. – Vol. 34. – №7. – P. 685–691. (118)
116. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11–14 weeks of gestation / A.M. Martin [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 18. – №6. – P. 583–586. (34)
117. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in pre-eclampsia / S.E. Maynard [et al.] // *J. Clin. Investig.* – 2003. – Vol. 111. – №5. – P. 649–658. (56)
118. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by pre-eclampsia and preterm labor / K. Mayor-Lynn [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 18. – №1. – P. 46–56. (124)

119. Mechanisms underlying immunologic states during pregnancy: possible association of the sympathetic nervous system / M. Minagawa [et al.] // *Cell. Immunol.* – 1999. – Vol. 196. – №1. – P. 1–13. (175)
120. Role of circulating cell-free DNA levels in patients with severe pre-eclampsia and HELLP syndrome / M.L. Miranda [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2013. – Vol. 26. – №12. – P. 1377–1380. (114)
121. Prediction of pre-eclampsia by placental protein 13 and background risk factors and its prevention by aspirin / H. Meiri [et al.] // *J. Perinat. Med.* – 2014. – Vol. 42. – №5. – P. 591–601. (81)
122. Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum / M.S. Murphy [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2015. – Vol. 213. – №3. – P. 367 e1–9. (129)
123. Molecular mechanisms of pre-eclampsia / W.P. Mutter, S.A. Karumanchi // *Microvasc. Res.* – 2008. – Vol. 75. – №1. – P. 1–8. (62)
124. Serum inhibin-A and activin-A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia / S. Muttukrishna [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – №7. – P. 1640–1645. (69)
125. Can changes in angiogenic biomarkers between the first and second trimesters of pregnancy predict development of pre-eclampsia in a low-risk nulliparous patient population? / L. Myatt [et al.] // *BJOG* – 2013. – Vol. 120. – №10. – P. 1183–1191. (59)
126. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction / M. Al Nakib [et al.] // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2009. – Vol. 26. – №1. – P. 24–28. (162)
127. Antioxidant status and serum levels of selectins in pre-eclampsia / S. Nasrollahi [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol.* – 2015. – Vol. 35. – №1. – P. 16–18. (105)
128. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound / K.N. Nicolaides [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2006. – Vol. 27. – №1. – P. 13–17. (20)

129. Nicolaides, K.H. Turning the pyramid of prenatal care // *Fetal Diagn. Ther.* – 2011. – Vol. 29. – №3. – P. 183–196. (48)
130. Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: Development of model in international prospective cohort / R.A. North [et al.] // *BMJ* – 2011. – Vol. 342. – P.1875. (27)
131. Placental volume and three-dimensional power Doppler analysis in prediction of pre-eclampsia and small for gestational age between Week 11 and 13 weeks and 6 days of gestation / M. Odeh [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2011. – Vol. 31. – №.4 – P. 367–371. (44)
132. Placental volume and vascular flow assessed by 3D power Doppler and adverse pregnancy outcomes / A.O.Odibo [et al.] // *Placenta* – 2011. – Vol. 32. – №3. – P. 230–234. (43)
133. Olofsson, P. A high uterine artery pulsatility index reflects a defective development of placental bed spiral arteries in pregnancies complicated by hypertension and fetal growth retardation / P. Olofsson, R.N. Laurini, K. Marsal // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 1993. – Vol. 49. – №3. – P. 161–168. (33)
134. Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger $\alpha(1)$ -microglobulin in pre-eclampsia / M.G. Olsson [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 48. – №2. – P. 284–291. (106)
135. First-trimester maternal serum activin-A in pre-eclampsia and fetal growth restriction / C.Y. Ong [et al.] // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* – 2004. – Vol. 15. – №3. – P. 176–180. (73)
136. Prediction of pre-eclampsia by a combination of maternal history, uterine artery Doppler and mean arterial pressure / N. Onwudiwe [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 32 – №7. – P. 877–883. (29)
137. Sequencing the miRNAs in maternal plasma from women before and after parturition / M.Pan [et al.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 12. – №5. – P. 4035–4043. (132)

138. Second-trimester uterine artery Doppler screening in unselected populations: A review / A.T. Papageorghiou [et al.] // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* – 2002. – Vol. 12. – №2. – P. 78–88. (35)
139. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of pre-eclampsia / N. Papantoniou [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2013. – Vol. 33. – №7. – P. 682–687. (121)
140. Screening models using multiple markers for early detection of late-onset pre-eclampsia in low-risk pregnancy / H.J. Park [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2014. – Vol. 14. – №35. – режим доступа: <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-35> (61)
141. Induction of interleukin-10 expression through Fc α receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase / C. Pilette [et al.] // *Immunol. Cell. Biol.* – 2010. – Vol. 88. – №4. – P. 486-493. (184)
142. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with pre-eclampsia / B.L. Pineles [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol. 196. – №3. – P. 261 e1–6. (127)
143. Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia / W. Plasencia [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol.30. – №5. – P. 742–749. (36)
144. Polgar, J. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad / J. Polgar, J. Matuskova, D.D. Wagner // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3. – №8. – P. 1590–1596. (94)
145. Mean arterial pressure at 11(+0) to 13(+6) weeks in the prediction of pre-eclampsia / L.C. Poon [et al.] // *Hypertension* – 2008. – Vol. 51. – №4. – P. 1027–1033. (46)
146. First-trimester maternal serum a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) and adverse pregnancy outcome / L.C. Poon [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 112. – №5. – P. 1082–1090. (85)

147. Hypertensive disorders in pregnancy: Screening by biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks / L.C. Poon [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 35. – №6. – P. 662–670. (37)

148. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: A multivariate approach / L.C. Poon [et al.] // *J. Hum. Hypertens.* – 2010. – Vol. 24. – №2 – P. 104–110. (26)

149. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes / L.C. Poon [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2013. – Vol. 33. – №4. – P. 215–223. (154)

150. Poon, L.C Early prediction of pre-eclampsia [электронный ресурс] / L.C. Poon, K.H. Nicolaides // *Obstet. Gynecol. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – Article ID, 297397. – режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/297397>; свободный – Загл. С экрана. (42)

151. Powe, C.E. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease / C.E. Powe, R.J. Levine, S.A. Karumanchi // *Circulation.* – 2003. – Vol. 123. - №24. – P. 2856–2869. (180)

152. The influence of fluid management on outcomes in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis / T. Pretorius [et al.] // *Int J Obstet Anesth.* – 2018. – Vol. 34. – P. 85–95. (199)

153. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery / M.S. Quezada [et al.] // *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* – 2015. – Vol. 45 – №.1 – P. 101–105. (169)

154. Rana, S. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in pre-eclampsia / S. Rana, S.A. Karumanchi, M.D. // *Hypertension.* – 2014. – Vol. 63. – №2. – P. 198–202. (58)

155. Redman, C.W. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response -- a review / C.W. Redman, I.L. Sargent // *Placenta.* – 2003. – Vol. 24, Suppl A. – P.21–27. (179)

156. Early detection of pre-eclampsia using inhibin-A and other second-trimester serum markers / P.H. Ree [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2011. Vol. 29. – №4. – P. 280–286. (72)

157. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of preterm and term pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis / Roberge S. [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2012. – Vol. 31. – №3. – P. 141–146. (9)

158. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis / Roberge S. [et al.] // *Am. J. Perinatol.* – 2012. – Vol. 29. – №7. – P. 551–556. (10)

159. Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low-dose aspirin: A meta-analysis / S. Roberge [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 41. – №5. – P. 491–499. (11)

160. Roberts, J.M. If we know so much about pre-eclampsia, why haven't we cured the disease? / J.M. Roberts, M.J. Bell // *J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 99. – №1-2. – P. 1–9. (137)

161. Roberts, J.M. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia / J.M. Roberts, R.N. Taylor, A. Goldfien // *Am. J. Hypertens.* – 1991. – Vol. 4. – №8. – P. 700-708. (178)

162. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on hypertension in pregnancy / J.M. Roberts [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 122. – P. 1122–1131. (25)

163. Severe pre-eclampsia is associated with high inhibin-A levels and normal leptin levels at 7 to 13 weeks into pregnancy / L.J. Salomon [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 189. – №6. – P. 1517–1522. (74)

164. Prospective evaluation of RASSF1A cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia / F.Salvianti [et al.] // *Placenta.* – 2015. – Vol. 36. – №9. – P. 996-1001. (182)

165. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: Mechanism for fetal loss in preterm birth and pre-eclampsia / A. Scharfe-Nugent [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – №11. – P. 5706–5712. (112)
166. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum / A. Sekizawa [et al.] // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47. – №12. – P. 2164–2165. (173)
167. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction / A. Sekizawa [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 188. – №2. – P. 480–484. (159)
168. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3 / Z. Shi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – №24. – P. 18574–18580. (82)
169. Third-trimester abnormal uterine artery Doppler findings are associated with adverse pregnancy outcomes / P. Shwarzman [et al.] // *J Ultrasound Med.* – 2013. – Vol. 32. – №12. – P.2107-2113. (198)
170. Serum inhibin-A and angiogenic factor levels in pregnancies with previous pre-eclampsia and/or chronic hypertension: Are they useful markers for prediction of subsequent pre-eclampsia? / B.M. Sibai [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 199. – №3. – P. 268 e1–9. (70)
171. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia / S. Sifakis [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 201. – №5. – P. 472 e1–7. (156)
172. Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome: current knowledge and novel insights / S. Sifakis [et al.] // *J. Perinat. Med.* – 2012. – Vol. 40. – №4. – P. 319–327. (146)
173. Sifakis, S. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (Review) / S. Sifakis, Z. Koukou, D.A. Spandidos // *Molecular medicine reports.* – 2015. – Vol. 11. – №4. – P. 2367-2372. (144)

174. Simons, FE Anaphylaxis during pregnancy / F.E. Simons, M. Schatz // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – Vol. 130. – №3. – P. 597–606. (163)
175. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies / M. Smid [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2006. – Vol. 26. – №9. – P. 785–790. (160)
176. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, pre-eclampsia, and stillbirth / G.C. Smith [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 87. – №4. – P. 1762–1767. (68)
177. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury / D.G. Souza [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 160. – №5. – P. 1755–1765. (91)
178. First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia / K. Spencer [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol. 29. – №2. – P. 128–134. (38)
179. Spencer, K. ADAM12s in maternal serum as a potential marker of pre-eclampsia / K. Spencer, N.J. Cowans, A. Stamatopoulou // *Prenat. Diagn.* – 2008. – Vol. 28. – №3. – P. 212–216. (84)
180. Spencer-Jones, J. Make every mother and child count / J. Spencer-Jones // *S. Afr. Med. J.* – 2005. – P. 382, 384. (2)
181. Pre-eclampsia / E.A. Steegers [et al.] // *Lancet.* – 2010. – Vol. 376. – P. 631–644. (138)
182. Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies / W. Stein [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2013. – Vol. 166. – №1. – P. 10–13. (155)
183. Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma / Y. Sugito [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – №10. – P. 1667–1669. (174)

184. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array / A. Szarka [et al.] // *BMC Immunol.* – 2010. – Vol. 11. – №. – P. 59-68. (185)
185. Competing risk model in screening for pre-eclampsia by mean arterial pressure and uterine artery pulsatility index at 30–33 weeks' gestation / A. Tayyar [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2014. – Vol. 36. – №1. – P. 18–27. (51)
186. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death / N.G. Than [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2009. – Vol. 106. – №24. – P. 9731–9736. (75)
187. Galectins: Guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface / N.G. Than [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 23. – №1. – P. 23–31. (76)
188. Raised maternal serum cystatin C: An early pregnancy marker for pre-eclampsia / B. Thilaganathan [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2009. – Vol. 16. – №8. – P. 788–793. (90)
189. Early-pregnancy multiple serum markers and second-trimester uterine artery Doppler in predicting pre-eclampsia / Thilaganathan B. [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 115. – №6. – P. 1233–1238. (8)
190. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA / M.L. Tjoa [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 169. – №2. – P. 400–404. (115)
191. VEGF and PlGF: Two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis / M. Tjwa [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2003. – Vol. 314. – №1. – P. 5–14. (52)
192. Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: Effects of maternal characteristics and medical history / A. Tsiakkas [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2015. – Vol. 45. – №5 – P. 591–598. (53)
193. Prediction of pre-eclampsia using first trimester uterine artery Doppler: A meta analysis of 43,122 pregnancies / L. Velauthar [et al.] // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 40, Suppl. 1. – P. 1–54. (40)

194. A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI / N.L. Vora [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2012. – Vol. 32. – №9. – P. 912–914. (170)
195. Elevated maternal soluble Gp130 and IL-6 levels and reduced Gp130 and SOCS-3 expressions in women complicated with preeclampsia / Y. Wang [et al.] // *Hypertension.* – 2011. – Vol. 57. – №2. – P. 336–342. (188)
196. Pre-eclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta / W.Wang [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 97. – №6. – P. 1051–1059. (125)
197. Recent advances in the understanding of the pathophysiology of pre-eclampsia / Warrington J.P. [et al.] // *Hypertension* – 2013. – Vol. 62. – № 4. – P. 666–673. (4)
198. Wataganara, T Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications / T. Wataganara, D.W. Bianchi // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1022. – P. 90–99. (150)
199. Weindling, A.M. Confidential Enquiry into Maternal and Child Health (CEMACH) / A. M. Weindling // *Disease in Childhood* – 2004. – Vol. 88. – P. 134–137 (3)
200. Hypertension in Pregnancy: The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy / editor A. Welsh. – L.: National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2010. – 1194 p. (13)
201. Placental DNA methylation at term reflects maternal serum levels of INHA and FN1, but not PAPP, early in pregnancy / S. L. Wilson [et al.] // *BMC Medical Genetics.* – 2013. – Vol.16. – Article ID [26654447](https://doi.org/10.1186/s12881-015-0257-z). – режи доступа <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-015-0257-z>; свободный – Загл. С экрана (192)
202. Predictors of neonatal outcome in women with severe pre-eclampsia or eclampsia between 24 and 33 weeks' gestation / Witlin A.G. [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – Vol. 182. – №3. – P. 607–611. (7)

203. World Health Organization. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia and Eclampsia / World Health Organization. – Geneva. – 2014. – P.48. (14).
204. A competing risks model in early screening for pre-eclampsia / D. Wright [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2012. – Vol. 32. – №3. – P. 171–178. (41)
205. First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing / D. Wright [et al.] // *Fetal Diagn. Ther.* – 2014. – Vol. 35. – №2. – P. 118–126. (135)
206. Plasma adenosine levels and P-selectin expression on platelets in pre-eclampsia / Y. Yoneyama [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 97. – №3. – P. 366–370. (98)
207. Fetal Medicine Foundation Second-Trimester Screening Group. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: Relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age / Yu C.K. // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 31. – №3. – P. 310–313. (6)
208. Zhong, X.Y. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia / X.Y. Zhong, W. Holzgreve, S. Hahn // *Hypertens. Pregnancy.* – 2002. – Vol. 21. – №1. – P. 77–83. (149)
209. Zhong, Y. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction / Y. Zhong, M. Tuuli, A.O. Odibo // *Prenat. Diagn.* – 2010. – Vol. 30. – № 4. – P. 293–308. (15)
210. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe pre-eclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome / Y. Zhou [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 160. – №4. –P. 1405–1423. (57)
211. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs. normal pregnancies / X.M. Zhu [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 200. – №6. – P. 661 e1–7. (128)

212. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma / B. Zimmermann [et al.] // Clin. Chem. – 2005. – Vol. 51. – №9. – P. 1598–1604. (152)

Алгоритм ведения беременных с преэклампсией

