

**-МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

*На правах рукописи*

**ХАЧАТРЯН**

**Зарине Варужановна**

**«КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ  
ДИАГНОСТИКИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА»**

**14.01.01 – акушерство и гинекология**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

**Научные руководители:**

**доктор медицинских наук, профессор**

**КАН Наталья Енқыновна**

**кандидат биологических наук**

**КРАСНЫЙ Алексей Михайлович**

**Москва – 2020**

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1.</b> Современные представления о задержке роста плода.....	13
1.1. Этиологические и клиничко-патогенетические аспекты задержки роста плода.....	13
1.2. Молекулярные механизмы задержки роста плода.....	23
1.3. Перспективы прогнозирования и диагностики задержки роста плода.....	27
<b>Глава 2.</b> Материалы и методы исследования.....	37
2.1. Материалы исследования.....	37
2.2. Методы исследования.....	42
<b>Результаты собственных исследований</b>	
<b>Глава 3.</b> Исходная клиничко-анамнестическая характеристика у беременных с задержкой роста плода.....	56
<b>Глава 4.</b> Течение беременности и ее исходы, диагностические критерии задержки роста плода на основании определения внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов.....	65
4.1 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови .....	76
4.1.1 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода .....	76
4.1.2 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода и преэклампсии.....	82
4.2. Исследование метилирования генов.....	86
4.2.1 Исследование метилирования генов в плаценте.....	86
4.2.2. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в плазме материнской крови при задержке роста плода.....	89

4.2.3. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в пуповинной крови при задержке роста плода.....	93
<b>Глава 5. Обсуждение полученных результатов.....</b>	<b>96</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>117</b>
<b>Практические рекомендации.....</b>	<b>119</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>121</b>

## Введение

### Актуальность проблемы

Задержка роста плода (ЗРП) является актуальной проблемой акушерства и занимает важную роль в структуре перинатальной заболеваемости и смертности [6, 7, 100, 110]. ЗРП ассоциирована с такими перинатальными исходами как недоношенность [15], смерть в раннем неонатальном периоде [24], поражение головного мозга различной степени [44], церебральный паралич [162], нарушение метаболических процессов и возникновение сердечно-сосудистых заболеваний в старшем возрасте [29, 30]. Согласно отечественным данным, частота ЗРП в России варьирует от 5 до 18% [2, 6, 8].

ЗРП является патологическим состоянием, при котором наблюдается ограничение генетически запрограммированного роста плода, которое свидетельствует о его страдании [43]. В настоящее время существует несколько классификаций ЗРП, при этом наиболее патогенетически обоснованным является разделение на раннюю (при манифестации до 32 недель беременности) и позднюю (после 32 недель) [100, 194]. В реализации данных форм ЗРП играют отличные друг от друга патогенетические механизмы. Так, ранняя форма ЗРП в основном, за исключением генетических и хромосомных патологий плода, связана с неполноценной инвазией трофобласта в миометральный сегмент спиральных артерий, что приводит к развитию ишемии и, как следствие, системного воспалительного ответа, что в свою очередь ведет к формированию плацентарной недостаточности [152, 179, 257]. Поздняя форма чаще обусловлена системной воспалительной реакцией, связанной с изменением углеводного кода плаценты, нарушением иммунной толерантности, реализацией эпигенетических механизмов [124, 257].

По данным мировой литературы, в качестве маркеров, позволяющих выявить группы риска развития ЗРП, предлагается исследование сывороточных белков [70, 85, 152] и гормонов [224]. Общества акушеров-

гинекологов совершенствуют протоколы, основанные на инструментальных методах исследования, и разрабатывают новые диагностические критерии задержки роста плода. Несмотря на это в большинстве случаев диагноз маловесного к сроку гестации устанавливаются ретроспективно [2, 100].

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что в связи с отсутствием единых международных критериев для постановки диагноза и эффективных программа скрининга ЗРП, возникает потребность в разработке новых методов, направленных на улучшение пренатальной диагностики.

Внеклеточная фетальная ДНК (cff-DNA) является биомаркером, который в настоящее время уже является незаменимым в области неинвазивной пренатальной диагностики и скрининга. Усовершенствование методологических методов позволили обратить внимание на применении данного молекулярного маркера в качестве прогностического и диагностического фактора различных осложнений беременности.

С конца XX века внимание исследователей обращено на изучение взаимосвязи между низкой массой тела при рождении и риском развития метаболических, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний [31, 32, 121, 161]. Понимание важности механизмов внутриутробного программирования легло в основу исследований в области эпигенетики [1, 184, 186, 225]. В настоящее время имеются данные о том, что эпигенетические механизмы могут выступать ответными реакциями на определенные негативные пренатальные факторы [57, 246, 280]. Наиболее изученным эпигенетическим механизмом контроля экспрессии генов является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК [99, 209]. Плацента как главный транзитный орган позволяет не только изучить взаимодействие между генетическими факторами и факторами среды, но также их роль в развитии заболеваний [175, 185]. На основании определенных эпигенетических маркеров возможна разработка не только новых более чувствительных диагностических тестов, но и новых методов лечения.

Таким образом, исследования роли внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов в ранней диагностике и прогнозировании задержки роста плода остаются недостаточно изученными и представляют большой научный интерес.

### **Степень разработанности темы**

В настоящее время отсутствие эффективных методов диагностики и прогнозирования ЗРП требует поиска новых неинвазивных прогностических и диагностических маркеров. Совершенствование протоколов диагностики и ведения пациентов в мировой и российской практике позволяют улучшить перинатальные исходы. Тем не менее, частота ЗРП остается высокой и достигает 10 – 18% [6, 7, 8].

Оценка прогностической и диагностической ценности вфДНК, как одного из наиболее изученных неинвазивных биомаркеров, остается важной задачей современного акушерства, что во многом связано с изменением ее уровня до клинической манифестации некоторых осложнений беременности. Существуют данные об ассоциации изменения уровня вфДНК в первом триместре с развитием ЗРП. Однако, исследований, направленных на определение роли внеклеточной фетальной ДНК в диагностике и прогнозировании ЗРП во второй половине беременности недостаточно.

Общеизвестно, что ЗРП ассоциирована с экспрессией определенных генов, которые могут играть роль в ее реализации. Эпигенетическая регуляция данных генов может служить одной из причин ЗРП. Кроме того, имеются данные о том, что эпигенетические механизмы лежат в основе фетального программирования и отвечают за развитие заболеваний уже во взрослом периоде.

Вышеизложенные данные говорят об актуальности предложенной темы исследования и дальнейшей перспективе изучения и внедрения полученных результатов в клиническую практику.

### **Цель исследования**

Оптимизация диагностики задержки роста плода на основании исследования уровня внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов.

### **Задачи исследования**

1. Провести анализ клинико-анамнестической характеристики, особенностей течения беременности, выделить факторы риска и разработать модель прогноза задержки роста плода.
2. Изучить содержание внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови для верификации ранней и поздней форм задержки роста плода.
3. Выявить взаимосвязь между уровнем внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови и степенью выраженности апоптоза в плаценте при задержке роста плода.
4. Определить диагностически значимые уровни метилирования генов, регулирующих метаболические процессы и врожденный иммунитет, в плаценте, плазме материнской и пуповинной крови при задержке роста плода.
5. Оптимизировать алгоритм диагностики задержки роста плода на основании выявленных неинвазивных предикторов для улучшения перинатальных исходов.

### **Научная новизна**

На основании проведенного исследования выделены наиболее значимые факторы риска и разработана модель прогноза формирования задержки роста плода.

Показано снижение концентрации внеклеточной фетальной ДНК при ранней форме задержки роста плода, обусловленное гипоплазией и изменением архитектоники плаценты с преобладанием стромального компонента. Определены диагностически значимые уровни внеклеточной

фетальной ДНК, позволяющие верифицировать формы задержки роста плода.

Установлено снижение уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в плаценте, плазме материнской и пуповинной крови при задержке роста плода.

Выявлена прямая корреляционная связь между концентрацией внеклеточной фетальной ДНК с массой плаценты и антропометрическими показателями новорожденных.

Доказана корреляция aberrантного метилирования импринтинг контролирующей области генов (ICR) IGF2/H19 в пуповинной крови новорожденных с формированием задержки роста плода.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Определены клиничко-анамнестические предикторы и разработана прогностическая модель развития задержки роста плода.

Обоснована целесообразность определения внеклеточной фетальной ДНК для верификации ранней формы задержки роста плода.

Определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК позволяет прогнозировать риск рождения детей с низкими массо-ростовыми показателями.

Выявление низких уровней метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области генов IGF2/H19 в плаценте, плазме материнской и пуповинной крови при задержке роста плода определяет возможность их применения в качестве неинвазивных прогностических маркеров.

Внедрение разработанного алгоритма в акушерскую практику позволяет оптимизировать диагностику задержки роста плода и улучшить перинатальные исходы.



### **Методология и методы исследования**

Работа была выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Клиническая часть работы выполнялась в акушерском отделении (заведующий – д.м.н., профессор Кан Н.Е.). Специальные методы исследования осуществлялись в лаборатории цитологии (изучение внеклеточной фетальной ДНК, метилирования генов) (заведующий – к.б.н. А.М. Красный) и в патологоанатомическом отделении (исследование плацент) (заведующий – д.м.н., профессор А.И. Щеголев). В исследование было включено 219 беременных, которые обратились в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России на проведение данного исследования. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие.

На первом этапе было проведено ретроспективное когортное исследование, в которое вошли пациентки с задержкой роста плода и физиологической беременностью. Пациентки с задержкой роста плода в зависимости от срока манифестации были разделены на раннюю и позднюю формы. Стандартные методы исследования проводились в соответствии с приказом Минздрава России № 572н от 01 ноября 2012 г. На втором этапе были проведены специальные исследования: ПЦР в режиме реального времени, иммунофлуоресцентный и гистохимический анализ, MS-HRM (анализ кривых плавления с высоким разрешением) и пиросеквенирование.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. К значимым факторам риска задержки роста плода относятся: хронический пиелонефрит и цервицит, задержка роста плода в анамнезе и угроза прерывания с образованием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности. Разработанная модель позволяет прогнозировать риск развития задержки роста плода с чувствительностью 73% и специфичностью 74%.

2. Уровень внеклеточной фетальной ДНК имеет прямую корреляционную связь с морфометрическими параметрами плаценты и массой новорожденного, а его снижение до 119,11 ГЕ/мл позволяет диагностировать раннюю форму задержки роста плода с чувствительностью 73% и специфичностью 79%.

3. Снижение уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плаценте, плазме материнской и пуповинной крови свидетельствует о нарушении регуляции иммунных и метаболических процессов, что обосновывает целесообразность их использования в качестве неинвазивных прогностических маркеров задержки роста плода.

### **Личный вклад автора**

Автором была произведена систематизация данных литературы по теме диссертации, на основании которой были сформированы цели и задачи работы, был проведен подбор в определении необходимого дизайна исследования и анализ клинико-anamnestических данных. Автором осуществлялось ведение пациентов и их родоразрешение, забор биологического материала и участие в молекулярно - генетических исследованиях. Диссертантом был произведен анализ медицинской документации, статистическая обработка полученных данных и научное обобщение полученных результатов.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2, 3 и 4 паспорта «акушерство и гинекология».

### **Апробация работы**

Основные положения работы представлены на: XIX Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и Дитя - 2018" и VI Съезд акушеров-гинекологов России (Москва, 2018), XXIV Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2018), XXVI Европейском конгрессе перинатальной медицины (Санкт-Петербург, 2018), XX Юбилейном Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и Дитя - 2019" (Москва, 2019), XXI Всероссийском научно-образовательном форуме "Мать и Дитя - 2020" (Москва, 2020).

Работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (22 июня 2020 года, протокол № 22).

### **Внедрение результатов исследования**

Практические рекомендации, основанные на результатах исследования, используются в работе акушерских отделений ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты, полученные в ходе работы, используются в учебном процессе в виде практических занятий и лекций для клинических ординаторов, аспирантов, а также врачей различных регионов России, работающих в системе специализированной акушерско-гинекологической помощи.

### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 12 статей в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представлена на 151 странице компьютерного текста. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками. Библиографический указатель включает 303 работы цитируемых авторов, из них 11 на русском языке и 292 на иностранных языках.

## **ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЗАДЕРЖКЕ РОСТА ПЛОДА (обзор литературы)**

### **1.1. Этиологические и клинико-патогенетические аспекты задержки роста плода**

Задержка роста плода (ЗРП), занимая важное место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности остается одной из ведущих проблем акушерства и неонатологии [6, 7, 100, 110]. Данные о частоте данного осложнения беременности неоднородны. Так согласно нескольким источникам, частота ЗРП в России составляет от 5 до 18% [6, 8]. Важным фактом является низкие показатели антенатальной диагностики ЗРП, которые составляют лишь 25 % от всех случаев [2, 100].

При этом отмечаются вариации частоты ЗРП в зависимости от популяций. Согласно эпидемиологическим данным ЗРП является более распространённой патологией в странах, которые располагают ограниченными ресурсами. Доля детей, рожденных маловесными к сроку гестации в развитых странах составляет 10 %, и значительно отличается от того же показателя в развивающихся странах, где данная когорта составляет 20% [170, 207]. Исследовательская группа по эпидемиологии детского здоровья провела исследование, которое включило 14 когорт новорожденных с использованием данных Международного консорциума по росту плода и новорожденного в 21-ом веке (INTERGROWTH-21). Были получены данные, согласно которым доля маловесных к сроку гестации новорожденных составила 19,3 % живорождённых детей в странах с ограниченными ресурсами [170]. Стоит отметить, что в данном отчете доля маловесных к сроку гестации новорожденных в структуре неонатальной смерти составили 22 % [170].

Маловесные к сроку гестации младенцы входят в группу риска по развитию ряда осложнений в перинатальном периоде. Высокий риск антенатальных осложнений объясняет ассоциацию ЗРП с ятрогенными

преждевременными родами [19, 24, 96, 117]. Недоношенные маловесные к сроку гестации дети подвержены риску развития таких осложнений как некротический энтероколит, респираторный дистресс-синдром, бронхолегочная дисплазия и ретинопатия недоношенных по сравнению с недоношенными детьми, имеющими нормальные массо-ростовые показатели [39, 42, 221]. Одним из наиболее распространенных осложнений перинатального периода при ЗРП является асфиксия в родах, что связано с патогенетическими особенностями данного осложнения беременности [50]. Плацентарная недостаточность приводит к развитию гипоксии и метаболическому ацидозу, а, следовательно, развитию гипоксического поражения органов: ишемической энцефалопатии с развитием церебрального паралича, сердечной недостаточности, легочной гипертензии, острому поражению желудочно-кишечного тракта и почек, мекониальной аспирации [44, 221]. Недостаточное количество подкожно-жировой клетчатки, а также дефицит катехоламинов приводит к нарушению процессов терморегуляции у малых к сроку гестации детей [300]. Одним из частых осложнений раннего неонатального периода является гипогликемия, риск которой повышается соответственно степени тяжести ЗРП [225]. Малые к сроку гестации дети подвержены нарушениям иммунной системы, в частности снижением активности клеточного иммунитета [46, 153, 154].

Помимо высокой заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, дети с ЗРП входят в группу риска по развитию сердечно-сосудистых, метаболических заболеваний при достижении ими зрелого возраста [193]. Анализ эпидемиологическим данных, опубликованных в последние четыре десятилетия, продемонстрировал, что низкая масса тела при рождении была связана с повышенным риском смерти от ишемической болезни сердца [31, 32], гипертонической болезни [30, 236], инсульта [30], а также метаболических нарушений [122]. Эти данные согласуются с концепцией внутриутробного программирования Баркера, согласно которой недостаточное поступление питательных веществ, дефицит энергии и

изменение механизмов регуляции влияют на метаболизм плода и осложняют не только перинатальный период, но и имеют отдаленные последствия [56, 184, 246].

До сих пор в мировой практике нет единого термина, обозначающего состояние плода, при котором наблюдается изменение массо-ростовых показателей по сравнению с нормативными для срока гестации [98, 100, 112]. В структуре детей, рожденных с массой тела меньше 10-ого перцентиля 50% составляют дети, низкая масса при рождении которых обусловлена конституциональными особенностями, в 40% случаев низкая масса при рождении является исходом плацентарной недостаточности, а в 10% случаев малый вес обусловлен различными плодовыми факторами. Крайне важным является тот факт, что масса плода более 10 перцентиля необязательно свидетельствует о нормальном росте плода, поэтому оценка состояния плода должна быть комплексной. В литературе и практике можно встретить термины «маловесный к сроку гестации» и «задержка роста плода». Данные термины не являются синонимичными. Маловесный к сроку гестации (Small for gestational age) – это плод с предполагаемой массой менее 10 перцентиля, обусловленной его конституциональными особенностями, а не задержкой роста [21, 112]. Задержка роста плода (Intrauterine growth restriction/retardation) – это патологическое ограничение генетически запрограммированного роста плода, свидетельствующее о его страдании [266, 278]. При этом нет доказательств, что в случае малого к сроку гестации плода нет задержки его роста, даже в случае благоприятных перинатальных исходов.

Маловесный к сроку гестации плод характеризуется: умеренно малыми размерами, нормальными темпами роста в течение беременности, нормальным объемом околоплодных вод, нормальными показателями доплерометрии пупочной артерии и размерами, соответствующими таким характеристикам матери как рост, масса, раса/этническая принадлежность [74, 80, 131, 149].

Отсутствие единой системы диагностических критериев приводит к недостаточной эффективности антенатального выявления случаев ЗРП [100]. В мировой практике нет единых диагностических критериев для постановки диагноза.

Согласно Американскому обществу акушеров-гинекологов (ACOG, 2013) и Канадскому обществу акушеров-гинекологов (SOGC, 2013) диагноз ЗРП устанавливается при предполагаемой массе плода меньше 10-ого перцентиля по данным ультразвукового исследования [17, 207].

По данным Королевского колледжа акушеров-гинекологов (RCOG, 2013), а также многоцентрового рандомизированного исследования К.Е. Boers и соавт. (Disproportionate Intrauterine Growth Intervention Trial at Term, 2012) диагноз ЗРП может быть поставлен не только при предполагаемой массе плода меньше 10 перцентиля, но при выявлении окружности живота меньше данного значения [41, 242]. Согласно исследованию С.М. Bilardo и соавт. (Trial of Randomized Umbilical and Fetal Flow in Europe, 2013) диагноз ЗРП можно предположить при выявлении окружности живота меньше 10 перцентиля по данным УЗИ и пульсационного индекса (ПИ) в пупочной артерии больше 95 перцентиля [171]. Большой интерес представляет исследование J. Unterscheider и соавт. (Prospective Observational Trial to Optimize Pediatric Health in Intrauterine Growth Restriction, 2013), где оптимальными критериями при постановке диагноза ЗРП определены окружность живота меньше 5 перцентиля по данным УЗИ и ПИ в пупочной артерии больше 95 перцентиля [278].

В одном из последних исследований, получившим популярность в мировом сообществе акушеров-гинекологов, с целью разработки единого консенсусного документа в 2016 г. S.J. Gordijn и соавт. было проведено исследование, целью которого являлась разработка единых критериев ЗРП на основе Дельфийской системы [117]. Для оценки важности каждого параметра эксперты использовали пятибалльную шкалу Ликерта, где 1 – абсолютно неважно; 2 – неважно; 3 – нейтрально; 4 – важно; а 5 баллов –



очень важно. Данные параметры включали фетометрические, доплерометрические и биохимические показатели. После обработки данных были получены критерии, которые были одобрены более чем 60 % экспертов, и были рекомендованы в качестве диагностических критериев ЗРП [117].

Далее Международным консенсусом диагностические критерии были разделены на большие и малые. Для ранней формы были определены большие критерии: окружность живота меньше 3 перцентиля, предполагаемая масса плода меньше 3 перцентиля, нулевой/реверсный диастолический кровоток в пупочной артерии. Малыми критериями для постановки диагноза ранней формы ЗРП послужили: окружность живота меньше 3 перцентиля, предполагаемая масса плода меньше 10 перцентиля; ПИ в маточных артериях больше 95-го перцентиля, ПИ в артериях пуповины больше 95-го перцентиля. Для поздней формы были определены другие большие критерии – окружность живота меньше 3 перцентиля, предполагаемая масса плода меньше 3 перцентиля. Малыми критериями поздней формы ЗРП были отнесены фетометрические показатели – окружность живота меньше 10 перцентиля, предполагаемая масса плода меньше 10 перцентиля, замедление динамики прироста окружности живота (превышение двух кватрилей), замедление динамики прироста предполагаемой массы плода (превышение двух кватрилей). При этом для постановки диагноза необходим один большой критерий или сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия [282].

Вопрос постнатальной постановки диагноза ЗРП не теряет своей актуальности в связи с отсутствием единых международных протоколов. Так как дети, с массой тела при рождении менее 10 перцентиля могут не иметь задержки роста, а новорожденные с массой более 10 перцентиля могут быть с задержкой роста, важным остается комплексная оценка состояния плода и новорожденного и поиск новых показателей, которые могут помочь в улучшении поиска. Интересными представляются данные консенсуса по

определению задержки роста у новорожденных 2018 года. Так согласно консенсусу большим критерием задержки роста является масса новорожденного меньше 3 перцентилия согласно принятыми кривым роста [170]. Масса новорожденного меньше 10 перцентилия, окружность головки меньше 10 перцентилия, длина тела меньше 10 перцентилия, наличие пренатального диагноза ЗРП и данные анамнеза об осложнениях, ассоциированных с ЗРП (преэклампсия, гипертензия, инфекции) были представлены как малые критерии, а сочетание трех и более данных факторов служит основой для постнатального подтверждения диагноза ЗРП.

Классификация задержки роста плода.

В соответствии с МКБ-10 [International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)], ЗРП классифицируется в следующих рубриках (O30–O48), (O36), (P00–P96), (P00-P96).

В настоящее время наибольшей популярностью в практике пользуется хронологическая классификация, основанная на разделении задержки роста плода на раннюю и позднюю формы. Порогом для разделения считается срок 32-34 недели по данным различных авторов [117, 362]. Однако, общепринятой точкой отсечки в настоящее время принят срок гестации 32 недели.

Ранняя форма задержки роста плода (манифестация до 32 недель гестации) составляет 20-30% всех случаев задержки роста плода. В основе формирования данной формы лежит нарушение плацентации, а именно неполноценная инвазия трофобласта в миометральный сегмент спиральных артерий. Это приводит к увеличению сопротивления в маточных артериях, что повышает вероятность развития преэклампсии. В таких условиях возникающая гипоксия требует адаптации кардиоваскулярной системы плода, что проявляется его высокой толерантностью к низким уровням кислорода [18, 150, 152]. Перинатальная заболеваемость и смертность при

ранней форме крайне высоки. Главной проблемой при ранней форме является тактика ведения данной группы беременных.

Поздняя форма задержки роста плода (манифестация после 32 недель гестации) составляет 70-80% всех случаев задержки роста плода. При данной форме незначительные плацентарные нарушения приводят к легкой гипоксии, которая также требует развитие компенсаторных механизмов сердечно-сосудистой системы плода. Степень толерантности к гипоксии низкая, и плод не может долго переносить низкие уровни кислорода. Поздняя форма ЗРП редко ассоциирована с высоким риском развития преэклампсии [48, 62, 93, 150, 160]. Перинатальная заболеваемость и смертность при поздней форме низкие [179]. Главной проблемой при поздней форме является диагностика, так как при незначительных плацентарных нарушениях, показатели доплерометрии остаются в пределах нормативных значений.

Так как плацентарная недостаточность выступает одной из причин развития ЗРП, существуют классификации, которые основаны не просто на степени плацентарных изменений, а приведены в совокупности с показателями доплерометрии. Так выделяют стадию 1, которая характеризуется умеренной плацентарной недостаточностью с сохранением кровотока в артериях пуповины, стадию 2 – тяжелую плацентарную недостаточность регистрацией в более чем половине сердечного циклов нулевого диастолического кровотока в артериях пуповины, стадию 3 – когда к вышеописанным изменениям присоединяются возникновение обратного диастолического кровотока в артериях пуповины, но с положительной а-волна в венозном протоке, и стадию 4 – когда в венозном протоке регистрируется отрицательная а-волна, свидетельствующая о высокой вероятности ацидоза у плода.

Внутриутробный рост плода характеризуется сменой процессов клеточной гиперплазии на процессы клеточной гипертрофии. При этом влияние определенных факторов влияют на данные процессы путем их

торможения или ускорения. При задержке роста плода влияние этиологических факторов на ранних сроках гестации, когда преобладают процессы клеточной гиперплазии приводит к развитию симметричной формы ЗРП, которая характеризуется ограничением потенциала роста плода, пропорциональным уменьшением всех фетометрических параметров [45]. При нарушениях на поздних сроках гестации после 30-32 недель, когда преобладают процессы клеточной гипертрофии, формируется асимметричная форма задержки роста плода, или гипотрофический тип, который характеризуется преимущественным отставанием размеров туловища при относительно нормальных размерах головки и бедра [1.2]. Данная классификация не имеет клинического значения, однако, она важна для понимания патогенетических механизмов, вовлеченных в формирование задержки роста плода [194].

ЗРП может развиваться в результате воздействия различных материнских, плацентарных, внутриутробных или генетических факторов, но также важным является то, что у каждой беременной может возникнуть индивидуальное сочетание различных патогенетических механизмов, в исходе которых возможно развитие данного осложнения беременности.

К материнским факторам ЗРП относят возраст старше 35 лет [162], индекс массы тела меньше 20 [232] и больше 25 [246], короткий (меньше 6 месяцев) и длительный (больше 60 месяцев) [162] интергравидарный период, низкое социальное положение [76]. Употребление алкоголя, наркотиков и курение являются важными факторами риска ЗРП [205]. К существенным факторам риска относят соматические заболевания матери, сопровождающиеся хронической гипоксией и ангиопатией: хроническую артериальную гипертензию [141], сахарный диабет [26], хроническую болезнь почек [121], антифосфолипидный синдром [66]. К особенностям питания, которые могут внести вклад в развитие ЗРП относят потребление кофеина больше 300 мкг в сутки [47] и исключение из диеты фруктов [63]. Воздействие ионизирующего излучения, проживание в высокогорных

областях, стресс, депрессивные расстройства также являются факторами риска ЗРП.

К развитию ЗРП могут привести такие плацентарные нарушения как инфаркты и тромбозы плаценты, двудолевая плаценты, хориоангиома плаценты. Предрасполагающими факторами могут послужить патологии пуповины.

К плодовым факторам риска ЗРП относятся хромосомные аномалии, генетические мутации, врожденные пороки развития, болезни обмена, инфекционные поражения, а также многоплодная беременность [78, 82, 162].

В норме при инвазии вневорсинчатого хориона в спиральные артерии, происходит их преобразование вплоть до миометральных сегментов с потерей мышечных и эластических компонентов (рисунок 1).

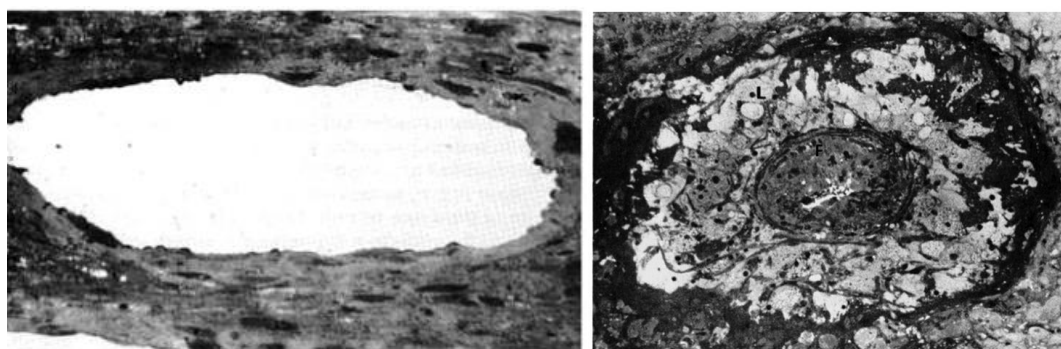


Рисунок 1. А – срез спиральной артериолы в том же масштабе и в том же месте во время беременности. Сосуд не имеет эластической пластинки и мышечных клеток. В – многочисленные клетки с накоплениями липидов в цитоплазме и отложениями фибрина. [257]

Это приводит к потере способности спиральных артерий реагировать на вазоконстрикторные факторы. В течение многих лет считалось, что основной задачей ремоделирования спиральных артерией является увеличение перфузии в межворсинчатом пространстве, которая в определенной степени действительно повышает маточный кровоток от 45 мл/мин вне беременности до 750 мл/мин во время беременности. Однако основным эффектом расширения терминальных отделов спиральных артерий

является обеспечение относительного замедления скорости кровотока во избежание разрушения ворсинчатого дерева, часть которого находится в непосредственном контакте с кровотоком [257]. Снижение скорости кровотока обеспечивает время для транспорта кислорода, что является одним из немаловажных факторов нормального внутриутробного роста. Помимо данных процессов в миометрии наблюдается усиленное образование сосудистых шунтов между артериями и венами.

В основе формирования плацентарной недостаточности лежит неполноценная инвазия вневорсинчатого хориона с неполным преобразованием спиральных артерий, которое происходит только в децидуальных сегментах, не затрагивая миометральные. Это приводит к сохранению способности спиральных артерий отвечать на вазоконстрикторные агенты, что вызывает снижение маточно-плацентарной перфузии [45]. Неполное преобразование спиральных артерий приводит к усиленной скорости материнского кровотока, следовательно, разрушению терминальных ворсин и выходу их фрагментов в материнский кровоток. Повреждение ворсинок приводит к выделению прокоагулянтов в межворсинчатое пространство, активации каскада коагуляции, окклюзии сосудов и инфаркту плаценты. В условиях плацентарной ишемии наблюдается окклюзия маточных сосудов, в том числе спиральных артерий, пенстыми клетками, которые подобны наблюдаемым в системных сосудах при их атеросклеротическом поражении (рисунок 2). Данные изменения приводят к развитию оксидативного стресса, что обусловлено сохраняющейся чувствительностью спиральных артерий к вазоконстрикторам [257].

Одними из наиболее изученных механизмов, демонстрирующих отдаленные последствия плацентарной недостаточности, являются процессы, которые лежат в основе повреждения головного мозга плода и приводят к возникновению реакций, которые напрямую или опосредованно влияют на

развитие головного мозга. Плацентарная недостаточность снижает синтез нейтрофических факторов, стероидов и их метаболитов, в том числе аллопрегнанолона, обладающего защитными функциями для головного мозга [35] и, таким образом, приводит к повреждению головного мозга. При задержке роста плода наблюдается запуск молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMP), активация макрофагов, а также идиопатический виллит, которые способствуют системной циркуляции медиаторов воспаления. Системная воспалительная реакция запускает диффузную активацию церебральной микроглии и нейровоспаления, опосредованного микроглией, что вызывает не только нарушение функции микроглии, но и повреждение созревающих олигодендроцитов. Наблюдаемая при плацентарной недостаточности гипоксия вызывает гибель нейроцитов и тем самым составляет основу для развития серьезных неврологических нарушений [91, 187].

## **1.2. Молекулярные механизмы задержки роста плода**

Отсутствие единых диагностических критериев ЗРП оказывает негативное влияние на частоту обнаружения данной патологии на антенатальном этапе. Однако, помимо проблемы диагностики, в настоящее время внимание исследователей занимает другая важная проблема – отсутствие эффективных методов лечения. В связи с чем внимание приковано на изучение молекулярных механизмов формирования ЗРП, которые могут стать основой для разработки действенных методов лечения.

Развитие плаценты при физиологической беременности вследствие адекватных процессов инвазии вневорсинчатого цитотрофобласта в спиральные артерии с их последующей трансформацией. Данные процессы требуют баланса между пролиферативными и апоптотическими процессами. Апоптоз является одним из физиологических процессов при формировании плаценты, поэтому выход апоптотического материала в материнский кровоток не вызывает системный воспалительный ответ [136]. При

плацента-ассоциированных осложнениях беременности, наблюдается нарушение баланса между данными процессами [257]. При этом в плаценте наблюдается возникновение зон некроза в синцитиотрофобласте, которые способствуют высвобождению в системный кровоток матери, не только продуктов апоптоза, но и некроза. Не так давно был описан такой программируемый тип некротической клеточной гибели как некроптоз [68]. В настоящее время известны несколько белков, которые участвуют в реализации сигнальных путей некроптоза. Среди них NAD-зависимая деацетилаза сиртуин 2 (SIRT 2), псевдокиназа смешанного происхождения (MLKL) [58, 206, 258]. Однако, наиболее важными белками, которые участвуют в инициации процессов некроптоза являются протеинкиназы 1 и 3, взаимодействующие с белком (RIPK 1 и 3). При некроптозе образуется внутриклеточный комплекс, который активирует SIRT 2 и вызывает деацетилирование RIPK 1 [206]. Данный процесс путем фосфорилирования RIPK 3 позволяет активировать псевдокиназу MLKL, который путем регуляции обмена ионов, меняет осмотическое давление и вызывает разрыв плазматической мембраны [258]. Большой интерес представляет изучение плацент при задержке роста плода с точки зрения реализации данных механизмов. N.J. Hannan и соавт. обнаружили SIRT 2 и RIPK 1 в цитоплазме цитотрофобласта, синцитотрофобласта и эндотелии во всех плацентах при задержке роста плода. Обнаружение ключевых участников подтвердило присутствие некроптоза при плацентарной недостаточности [126].

Необходимо отметить, что любые изменения со стороны матери, плаценты или плода могут потенциально влиять на биологическую активность плода и приводить к нарушению роста. ЗРП ассоциирована не только с перинатальными осложнениями, но и развитием во взрослом периоде таких метаболических нарушений как ожирение, сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия [281]. Таким образом, изучение механизмов, лежащих в основе данных процессов, может помочь в разработке в будущем новых терапевтических подходов.



Сигнальный путь янус-киназа и активатор транскрипции (JAK-STAT), играя важную роль в различных процессах онтогенеза, является одним из консервативных путей регуляции у высших эукариот. Рецепторы лептина принадлежат к семейству цитокинов класса 1 с шестью сплайсированными изоформами, но только полная изоформа OB-R имеет важное значение для JAK-STAT сигнального пути [81, 203]. ЗРП связана с более высокой экспрессией белка лептина и повышением связывающих способностей к нему у новорожденных. В условиях гипоксии наблюдается повышенная экспрессия гена лептина, что вызывает увеличение синтеза белка лептина в клетках трофобласта. Повышение концентрации белка приводит к увеличению концентрации рецепторов, связывающих лептин, в пуповинной крови. Лептин, связываясь со специфическими рецепторами в гипоталамусе, изменяет экспрессию ряда нейропептидов, участвующих в нейроэндокринной регуляции [276]. Таким образом, у новорождённых с малыми размерами к сроку гестации, в связи с повышенной экспрессией рецепторов к лептину, наблюдается снижение его уровня, что в будущем может приводить к развитию различных метаболических нарушений.

Лептин индуцирует синтез трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) посредством активации JAK-STAT пути [203]. TGF- $\beta$  представляет собой многофункциональный цитокин с множеством биологических эффектов, участвующий в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток трофобласта [299]. В патогенезе задержки роста плода представляет интерес регуляция TGF- $\beta$  активности ферментов ацил-сфингозин-аминогидролазы 1 (ASAH1) и сфингозин-киназы 1,2 (SPHK1/2). Нарушение регуляции данных ферментов приводит к накоплению сфингозина, что вызывает неадекватный ангиогенез и некроз клеток трофобласта [56].

Существует ряд работ, сообщающих о влиянии TGF- $\beta$  на развитие легких у плода. Атипичная экспрессия и активация TGF $\beta$  увеличивает экспрессию таких транскрипционных факторов как GATA-6 и тиреоидного фактора транскрипции-1 (TTF-1) в легочном эпителии, что приводит к

развитию бронхолегочной дисплазии у новорожденных [279]. Предполагается, что сигнальный путь трансформирующий фактор роста бета – костный морфогенетический белок (TGF $\beta$ /BMP) путем повышения резистентности дыхательных путей может способствовать развитию бронхиальной астмы [14].

В процессе формирования плацентарной недостаточности наблюдается не только нарушение процессов пролиферации и апоптоза клеток трофобласта, но и усиление окислительного стресса, который, в свою очередь, приводит к экспрессии провоспалительных цитокинов. Среди них представляет интерес трансформирующий фактор роста –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Члены суперсемейства TGF- $\beta$  – TGF- $\beta$  1, 2 и 3 выступают в качестве важных посредников для нормального формирования плаценты и роста плода путем регуляции процессов инвазии, пролиферации и апоптоза клеток трофобласта [56]. В исследовании Genbasev O. и соавт., которые продемонстрировали изменение экспрессии TGF- $\beta$  3 в ответ на снижение оксигенации на ранних этапах физиологической беременности. Было показано, что TGF- $\beta$  3 регулирует дифференцировку трофобласта, предотвращая его развитие по инвазивному фенотипу, и с началом формирования кровотока в межворсинчатом пространстве в 10-12 недель гестации, путем снижения его экспрессии, обеспечивает возможность развития инвазивного вневорсинчатого трофобласта [299]. Гипоксия, которая наблюдается при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, запускает ряд механизмов, которые приходят в действие путем активации индуцируемых гипоксией факторов 1 и 2 (HIF-1 и HIF-2) [21]. Существуют данные, согласно которым индуцируемый гипоксией фактор 1 повышает транскрипцию TGF- $\beta$  3 и приводит к нарушению процессов инвазии цитотрофобласта [22 - 24].

Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) представляет собой гормон, секреция которого регулируется гормоном роста (GH) [1]. Инсулиноподобный фактор роста впервые был описан W.D. Salmon и соавт. в 1957 году, но открытие завершилось лишь два десятилетия спустя, благодаря

исследованиям E. Rinderknecht и соавт. [33, 36] Эти результаты позволили Le Roith и соавт. идентифицировать новое семейство белков, состоящих из IGF-1 и IGF-2 [156]. Основная разница между IGF-1 и IGF-2 находится в их биологической активности. Экспрессия IGF-2 происходит преимущественно в раннем эмбриональном и внутриутробном периоде, тогда как IGF-1 в большей степени продуцируется у взрослых [186]. IGF-1 обладает многочисленными функциями, среди которых важную роль во внутриутробном росте играют пролиферативная [33], противовоспалительная [36] и анаболическая [268]. Такое разнообразие функций вызывает потребность в наличии регуляторных белков. Так активность IGF-1 находится в строгом контроле от белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста, которые обладают высоким сродством к IGF-1 [156]. Продукция данных белков осуществляется во многих биологических средах [186]. 75% IGF-1 вырабатывается печенью, но каждая клетка с целью регуляции местных процессов способна к синтезу данного белка [26]. Важное биологическое значение имеет функционирование оси «соматотропный гормон – инсулиноподобный фактор роста 1», который представляет собой цепь взаиморегулируемых биологически активных веществ [63]. Инсулин является немаловажным фактором метаболизма плода, поскольку он способствует не только регуляции уровня глюкозы, но обмену аминокислот. Согласно исследованиям дефицит инсулина может способствовать развитию ЗРП [36].

### **1.3. Перспективы прогнозирования и диагностики задержки роста плода**

Современные протоколы диагностики ЗРП включают в себя комбинированные алгоритмы с использованием биохимических, ультразвуковых и доплеровских методов исследования. В настоящее время большой интерес представляет поиск основанных на материнской крови

новых неинвазивных маркеров которые могли бы выступить в качестве предиктивных и диагностических методов.

В 2000 году Ong и соавт. провели оценку уровня бета-хорионического гонадотропина человека ( $\beta$ -ХГЧ) и ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы (РАРР-А) на 10-14 недели гестации у 5584 женщин с одноплодной беременностью и пришли к выводу, что низкие уровни  $\beta$ -ХГЧ и РАРР-А ассоциированы с развитием осложнений беременности [214]. Подобные результаты были получены в исследовании Spencer и соавт. в 2005 году, в котором были получены данные об ассоциации низкого уровня РАРР-А с неблагоприятными исходами беременности [2]. Также низкие уровни РАРР-А были упомянуты в качестве предикторов ЗРП у K. Goetzingер и соавт. в 2009 году и у L. Рооп и соавт. в 2009 году [115]. Однако, согласно исследованиям T. Leung и соавт. и Y. Zhong и соавт. при уровне РАРР-А в первом триместре ниже 5-го перцентиля чувствительность обнаружения ЗРП колеблется в диапазоне от 8 до 33 %, что демонстрирует РАРР-А в качестве недостаточного скринингового инструмента [173, 301].

L. Dugoff и соавт. провели исследование 11-14 неделе гестации у 34271 женщины и показали снижение уровня бета-хорионического гонадотропина человека у женщин, беременность которых впоследствии осложнилась ЗРП [84]. Позднее K. Gotzinger et al. показали, что высокие уровни бета-хорионического гонадотропина наблюдались при беременностях, осложнившихся ЗРП [116]. Эти данные представляют бета-хорионический гонадотропин человек в качестве неудовлетворительного предиктивного маркера ЗРП [263, 283].

В 2008 году было проведено исследование комитетом по генетике Общества акушеров и гинекологов Канады, в котором были рассмотрены акушерские исходы, связанные с аномальными уровнями сывороточных маркеров, используемых при рутинном скрининге на анеуплоидии. В исследование были включены ассоциированный с беременностью протеин-А

плазмы (РАРР-А), альфа-фетопротеин, бета-хорионический гонадотропин, эстриол, неконъюгированный эстриол, ингибин-А. Расчёты показали, что неблагоприятные акушерские исходы были связаны с низким уровнем РАРР-А (меньше 0,4 МоМ) и низким уровнем бета-хорионического гонадотропина (меньше 0,5 МоМ) [81]. В исследовании Е. Keikkala проводилось исследование уровня гипергликозилированного хорионического гонадотропина человека в первом триместре. Было обнаружено, что низкий уровень данного маркера коррелировал с низким уровнем ассоциированного с беременностью протеина-А плазмы и приводил к плацента-ассоциированным осложнениям беременности. Согласно полученным данным прогностическая способность гипергликозилированного хорионического гонадотропина показала 90% специфичность и 69% чувствительность при учете среднего артериального давления [150]. Интерес для изучения представляет дезинтегрин А и матриксная металлопротеаза 12 (ADAM-12) - протеаза, связывающая инсулиноподобный фактор роста, вырабатываемый плацентой. Однако, исследования F. Loechel и соавт., N. Cowans и соавт., L. Roop и соавт. показали низкую прогностическую ценность данных белков в диапазоне от 7,16 до 20% [180].

Плацентарный белок 13 (PP-13) представляет собой пептид, участвующий в процессах инвазии трофобласта в спиральные артерии и их ремоделировании [164]. В 2007 году I. Chaftez и соавт. показали, что низкие уровни плацентарного белка 13 в первом триместре были ассоциированы с преждевременными родами у женщин с ЗРП [48]. В 2008 году N. Cowans и соавт. показали связь между плацентарным белком 13 и ЗРП [70]. В 2008 году, используя комплексную оценку, включающую определение уровня плацентарного фактора 13, ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы и доплерометрии маточной артерии на 11-13 неделе беременности, L. Roop и соавт. определили частоту обнаружения ЗРП 20%, а частота ложноположительных результатов была оценена в 5% [228].

Такие связанные с плацентой ангиогенные факторы как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарный фактор роста (PlGF) также оценивались во многих исследованиях [18]. Растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFlt-1) представляет собой антиангиогенный протеин, выполняющий роль мощного ингибитора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF) путем блокирования их взаимодействия со специфическими рецепторами. Дисбаланс между антиангиогенными и ангиогенными факторами связан с развитием таких плацента-ассоциированных осложнений беременности как преэклампсия и ЗРП [166].

В 2013 году А. Conde-Agudela и соавт. провели метаанализ, который включил в себя 53 исследования и 39974 женщин. В исследовании была проведена оценка 37 новых биомаркеров, среди которых были факторы, связанные с ангиогенезом – плацентарный фактор роста (PlGF), растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFlt-1), растворимый эндоглин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); биомаркеры, отражающие эндотелиальную функцию и окислительный стресс – гомоцистеин, лептин, асимметричный диметиларгинин (ADMA), растворимая межклеточная молекула адгезии (sICAM-1), интерферон-С, С-реактивный белок, фолат; связанные с плацентой белки – связывающие инсулиноподобный фактор роста белки-1 и -3, металлопротеаза 12 (ADAM-12), плацентарный белок 13, активин А, гормон роста плаценты, а также такие генетические маркеры и исследования по метаболомике. В целом, ни один из оцененных биомаркеров не показал высокой прогностической значимости в отношении ЗРП [152].

Ультразвуковая доплерометрия маточных артерий является полезным неинвазивным методом для оценки системы «мать-плацента-плод». Начиная с ранних исследований данный инструментальный метод оценки показал себя многообещающим методом прогнозирования риска ЗРП [69, 112]. В случае неполноценной трофобластической инвазии в спиральные артерии и их неполного преобразования отмечается повышение индекса сопротивления

(RI) и пульсационного индекса (PI) выше 90-95-го перцентиля [117]. Первые исследования, которые оценивали доплерометрию маточных артерий, были выполнены во втором триместре беременности, между 18-23 неделями [73]. Хотя повышенная резистентность в маточных артериях ассоциированными с такими неблагоприятными акушерскими исходами как преэклампсия, преждевременные роды и ЗРП, было установлено, что прогностическое значение данного метода в отношении ЗРП составляет лишь 15% [117]. Дальнейшие исследования, проведенные в 2000-х годах, оценивали доплерометрию маточных артерий между 10-14 неделями беременности и обнаружили низкие положительные прогностические значения для ЗРП и несколько превосходящую прогностическую ценность для ЗРП с ПЭ или ЗРП с преждевременными родами в исходе [184]. Большинство опубликованных на сегодняшний день исследований, независимо от того, проводились ли они в течение первого или второго триместра, сходятся во мнении, что изменения доплерометрии маточных артерий связаны с развитием ЗРП, но не являются надежным единственным прогностическим маркером для определения низкого риска ЗРП [214]. Интересный подход, предложенный О. Gomez и соавт. в 2006 году показал, что последовательность изменений в маточном кровотоке между первым и вторым триместром коррелирует с последующим развитием ЗРП, а группу высокого риска данного осложнения беременности составляют женщины с постоянными низкими показателями [123, 204]. J. Hung и соавт. провели оценку доплерометрии спиральных артерий между 13-19 неделями и 20-25 неделями беременности и пришли к выводу, что доплеровская оценка спиральных артерий не является чувствительным инструментом для выявления ЗРП в популяции с низким риском [134]. Кроме того, в исследованиях, сравнивающих нормальные и осложненные исходы беременности, доплерометрия спиральных артерий не показала какой-либо статистически значимой прогностической ценности, что делает доплеровское исследование спиральных артерий недостаточным методом для скрининга IUGR [117].

Важное значение приобрел комплексный подход прогнозирования ЗРП. Исследователи пытались улучшить прогнозирование ЗРП путем сочетания доплеровских показателей с биохимическими и клиническими параметрами из-за недостаточной прогностической ценности каждого отдельного маркера [207]. Комбинированный подход отражает различные патологические пути: доплерометрия маточных артерий показывает неадекватную инвазию спиральных артерий, а нарушение секреторной функции плаценты отражается изменениями биохимических показателей [114]. Были опубликованы модели прогнозирования ПЭ в сочетании с ЗРП путем ультразвуковой оценки маточных артерий, определения биохимических маркеров и материнских факторов риска, но возникла необходимость в разработке модели для прогнозирования ЗРП без ПЭ [120, 135, 167]. С целью выявления ЗРП, не связанной с ПЭ, G. Karagiannis и соавт. использовали модель прогнозирования, содержащую пульсационный индекс маточной артерии на 11-13 неделе беременности, среднее артериальное давление, уровень PAPP-A, свободного  $\beta$ -ХГЧ, фактора роста плаценты, плацентарного фактора роста 13, металлопротеиназы-12 (ADAM-12). Исследование показало хорошую частоту выявления ЗРП, которая составила 73 % для ЗРП с преждевременными родами в исходе и 46% для ЗРП со своевременными родами [70, 180, 228].

Внеклеточная фетальная ДНК (cff-DNA) является молекулярным биомаркером, который произвел революцию в области неинвазивной пренатальной диагностики и скрининга. Впервые он был обнаружен в 1997 году Y. Lo и соавторами, которые продемонстрировали наличие последовательностей ДНК плода в материнской плазме и сыворотке [180]. Последующие исследования показали, что содержание фетальной ДНК значительно выше в материнской плазме по сравнению с кровью [12, 13]. Внедрение исследований, основанных на применении количественной ПЦР позволили сосредоточиться на клиническом применении этого биомаркера не только в качестве скринингового метода генетических нарушений плода, но



и в роли прогностического маркера осложнений беременности [147]. Природа внеклеточной фетальной ДНК остается не до конца изученной. Предполагается, основным источником данного маркера является плацента, доказательством чего служит его быстрое выведение из материнской крови после родов, в отличие от большинства эмбриональных клеток, которые могут циркулировать в материнском организме в течение несколько недель после родов [155]. В дополнение к этому отсутствие внеклеточной фетальной ДНК в случаях, связанных с плацентарным мозаицизмом, подтверждает плацентарное, а не фетальное происхождение [164]. Более позднее исследование С. Litton и соавт. показало, что основным источником внеклеточной фетальной ДНК являются клетки трофобластического происхождения, которые высвобождаются из синцитиотрофобласта в форме синцитиальных узлов. Эти клетки подвергаются апоптозу, а входящие в их состав нуклеиновые кислоты высвобождаются и попадают в материнский кровоток (рисунок 2) [178].

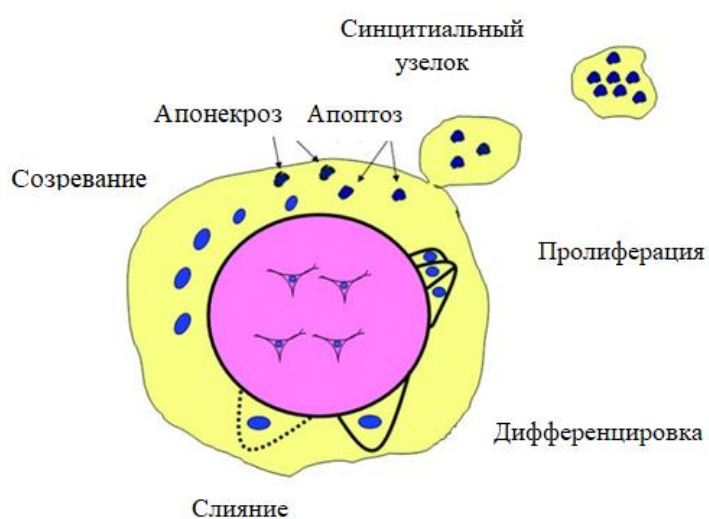


Рисунок 2. Клетки цитотрофобласта пролиферируют и подвергают дифференцировке во время роста плода. Сливаясь с синцитиотрофобластами,

они образуют апоптотический материал, который выделяется в материнский кровоток в виде синцитиальных узелков. Иногда апонекроз возникает, если апоптотический каскад не происходит и некротический материал попадает в материнскую кровоток.

Помимо апоптоза, возникающего в результате нормального старения синцитиотрофобласта, случайное разрушение или некроз также могут послужить одной из причин высвобождения нуклеиновых кислот в материнский кровоток. Значительный интерес приобретает представление о том, что апоптотические или апонекротические пути синцитиотрофобласта могут изменять долю фетального ДНК в материнском кровотоке. В частности, в настоящее время проводятся исследования, направленные на оценку внеклеточной фетальной ДНК в качестве прогностического и диагностического маркера ЗРП. Одним из первых подобное исследование провели А. Sekizawa и соавт. в 2013 году [251]. Полученные результаты не показали изменений уровня данного маркера по сравнению с группой контроля, что может быть связано с малой выборкой групп – 9 беременных с ЗРП и 20 беременных в группе контроля [221]. Более позднее исследование, проведенное М. Smid и соавторами в 2006 году, продемонстрировало повышение уровня внеклеточной фетальной ДНК у плодов с ЗРП [155]. Эти результаты были подтверждены более поздними исследованиями М. Alberry и соавт. [12] и М. Al Nakib и соавт. [13], которые использовали значительно большие размеры выборок по сравнению с А. Sekizawa и соавт. Показано, что уровни внеклеточной фетальной ДНК значительно выше у беременных, осложненных ЗРП, по сравнению с нормальными беременностями. Однако, в данных исследованиях авторами не было проведено разделение исследуемых групп на раннюю и позднюю формы ЗРП, которые по сути имеют не только различную патогенетическую основу, но и клиническую характеристику.

Д. Morano и соавт. было проведено исследование, целью которого было сравнение уровней фетальной фракции свободной внеклеточной ДНК в

первом триместре беременности между группами женщин, у которых беременность осложнилась ранней и поздней формой задержки роста плода, и контрольной группой. Согласно полученным данным, медиана внеклеточной фетальной ДНК составила 0,69 (ДИ 0,44 – 0,84) для ранней формы ЗРП, 0,93 (ДИ 0,83 – 1,03) для поздней формы и 1,00 (ДИ 0,89 – 1,12) для контрольной группы. Полученные результаты подтвердили гипотезу о том, что низкие концентрации внеклеточной фетальной ДНК ассоциированы с низкой массой плаценты и плацентарной недостаточностью, которая развивается при ранней форме ЗРП [200]. Полученные результаты согласуются с исследованием D. L. Rolnik и соавт., в котором было показано, что низкие концентрации внеклеточной фетальной ДНК в первом триместре, отражающие плацентарную недостаточность, ассоциированы с такими осложнениями беременности как задержка роста плода и преэклампсия [238]. D. Morano и соавт. было выдвинуто предположение о роли внеклеточной фетальной ДНК в качестве важного прогностического маркера уже с первого триместра, но только в отношении ранней формы ЗРП.

Противоречивые данные об уровне внеклеточной фетальной ДНК при ЗРП и сочетании ЗРП с ПЭ могут быть объяснены несколькими факторами. В основе повышения уровня данного маркера лежат такие факторы как аномальное увеличение апоптоза клеток трофобласта в результате ишемии плаценты [88] и уменьшение клиренса у матери [271]. Другим источником внеклеточной фетальной ДНК может служить увеличенное количество циркулирующих эритробластов плода растущих в ответ на эритропоэтин опосредованный гипоксией [16]. Кажущееся противоречие между более низкой концентрацией фетальной фракции по сравнению с увеличением общей внеклеточной ДНК также может быть объяснено тем, что при преэклампсии, наблюдается менее выраженное увеличение фетальной фракции ДНК по сравнению общей [94, 204]. Следует отметить, что необъяснимо высокие уровни общей внеклеточной ДНК и более низкие концентрации внеклеточной фетальной ДНК были обнаружены у

беременных с синдромом Дауна плода в первом триместре [146] и трисомии 18 во втором триместре [285]. Эти данные подтверждают, что о существенном влиянии плода, в частности анеуплоидий, на количество внеклеточной фетальной ДНК.

Изучение эпигенетических изменений ДНК плаценты представляет большой интерес в связи с перспективностью разработки новых диагностических тестов на основании определения эпигенетических меток в других биологических субстратах. Полученные знания об эпигенетической регуляции позволят в будущем внедрить их в развитие новых терапевтических методов. Обратимый и неспецифичный характер эпигенетических факторов и их роль в качестве посредников между геномом и окружающей средой, делает их одними из самых перспективных терапевтических мишеней. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов, осуществляющих контроль генной экспрессии, является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК.

Таким образом, несмотря на совершенствующиеся схемы скрининга и диагностики, ЗРП не имеет тенденции к снижению, в связи с чем актуальным остается поиск и разработка новых высокочувствительных и специфичных диагностических тестов пренатальной диагностики ЗРП. В настоящее время большой интерес представляет применение методов молекулярной биологии в неинвазивной диагностике осложнений, связанных с беременностью, представляется ценным инструментом для генетического скрининга и оценки патологических состояний, в отличие от инвазивных методов, которые требуют больших экономических затрат и связаны с большими рисками.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

С 01 октября 2017г. по 01 августа 2019г. проведено исследование, в которое согласно особенностям течения беременности и критериям включения и исключения были включены 305 пациенток. В дальнейшем после постнатального подтверждения диагноза в исследование были отобраны 219 беременных. С целью уточнения вклада факторов риска в развитие ЗРП на 1 этапе исследования было проведено когортное ретроспективное исследование, в которое были включены 2 группы – группу I (основную) составили 105 беременных с ЗРП, группу II (контрольную) 114 пациентки с физиологической беременностью. С учетом срока манифестации ЗРП, основная группа I была разделена на две подгруппы: IA – 49 беременные с ранней формой и IB – 56 пациенток с поздней формой ЗРП.

Для поиска диагностических маркеров и неинвазивных предикторов данного патологического состояния был проведен 2 этап исследования. Основную группу I составили 48 беременных с ЗРП, а группу II – контрольную – 45 пациенток, у которых беременность протекала без осложнений. Принимая во внимание различные клинические и патогенетические критерии ранней и поздней формы ЗРП, основная группа I была разделена на 2 подгруппы: IA – 23 беременные с ранней формой и IB – 25 пациенток с поздней формой ЗРП (рисунок 3).

Все пациентки были проинформированы с целью и методами проводимого исследования, и ими были даны информированные согласия на участие в научном исследовании.

## Когортное ретроспективное исследование.

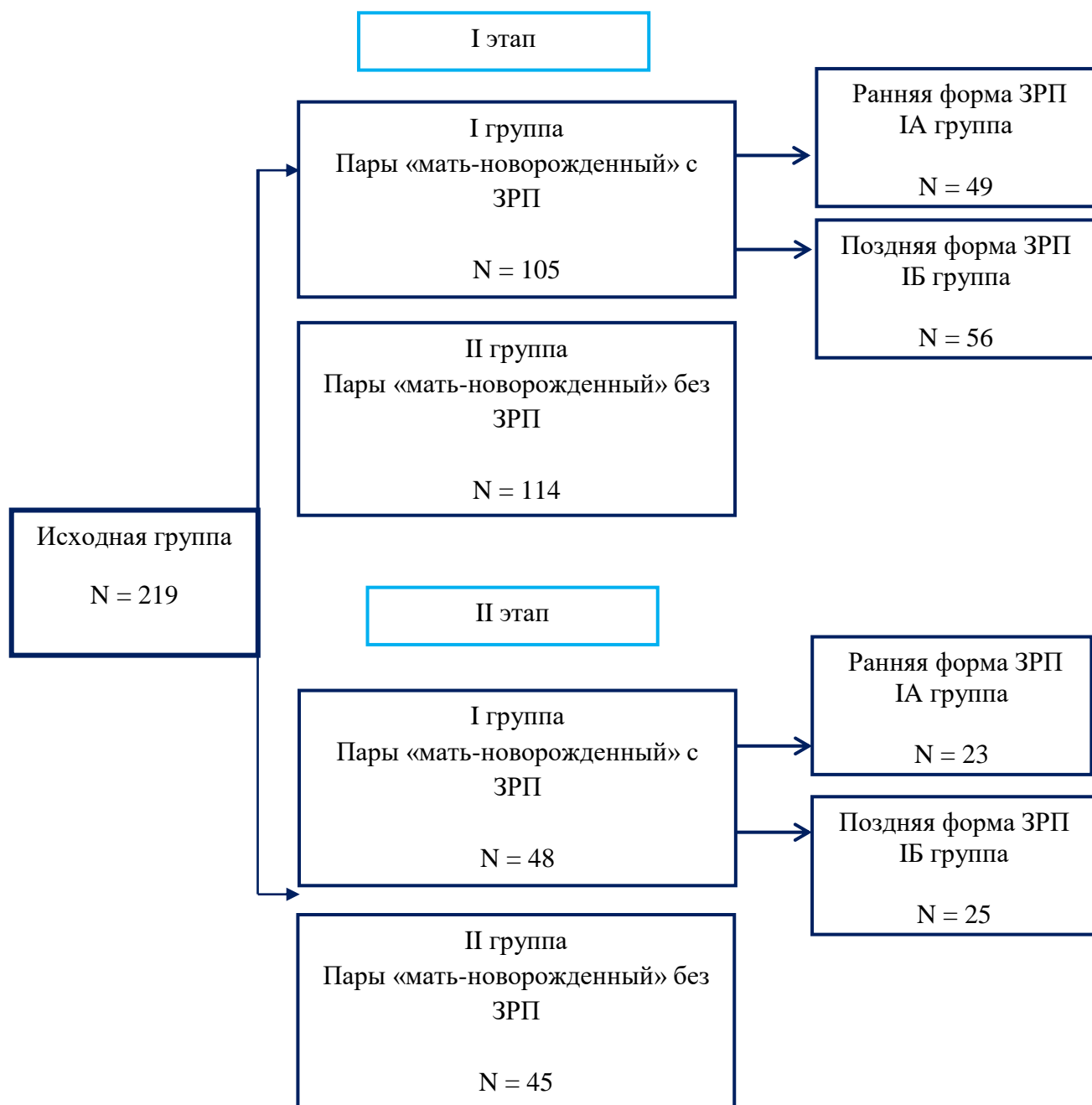


Рисунок 3. Дизайн исследования

Работа выполнялась в ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Клиническая часть работы выполнена в акушерском отделении (заведующий – д.м.н., профессор Н.Е. Кан). Специальные методы исследования

осуществлялись в лаборатории цитологии (заведующий – к.б.н. А.М. Красный).

Диагноз ЗРП на антенатальном этапе устанавливался согласно критериям единого консенсусного документа по Дельфийской системе для ранней и поздней форм ЗРП (таблица 1).

Таблица 1. Критерии диагностики ранней и поздней форм ЗРП согласно международному консенсусу по Дельфийской системе (2016 год)

Критерии диагностики ранней формы ЗРП		
Большие критерии (достаточного одного для диагностики)	Малые критерии (необходимо сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия)	
ОЖ меньше 3-го перцентиля ПМП меньше 3-го перцентиля Нулевой и реверсный диастолический кровотоки в артериях пуповины	Фетометрические критерии	Допплерометрические критерии
	ОЖ меньше 10-го перцентиля ПМП меньше 10-го перцентиля	ПИ в маточных артериях больше 95-го перцентиля ПИ в артериях пуповины больше 95-го перцентиля

Критерии диагностики поздней формы ЗРП		
Большие критерии (достаточного одного для диагностики)	Малые критерии (необходимо сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия)	
ОЖ меньше 3-го перцентиля ПМП меньше 3-го перцентиля	Фетометрические критерии	Допплерометрические критерии
	ОЖ меньше 10-го перцентиля ПМП меньше 10-го перцентиля Замедление динамики прироста ОЖ (превышение двух квартилей) Замедление динамики прироста ПМП (превышение двух квартилей)	ПИ в артериях пуповины больше 95-го перцентиля ЦПО меньше 5-го перцентиля

Постнатальный диагноз маловесного к сроку гестации устанавливался при показателях массы и длины тела новорожденного меньше 10 перцентиля согласно принятым кривым роста. Оценка массо-ростовых показателей детей проводилась с помощью кривых роста Фентона (2013 год).

Нами были детально изучены семейный и собственный анамнез пациенток, в особенности наличие заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыделительной и эндокринной систем, нарушений гемостаза, вредных привычек. Был проведен анализ акушерско-гинекологического анамнеза, в том числе на наличие задержки роста плода, преэклампсии и преждевременных родов в анамнезе у повторнородящих, социально-экономического статуса, исходной клинической характеристики, течения беременности, особенностей и исхода родов, а также состояния плода и новорожденного.

Для сбора необходимой информации согласно задачам настоящего исследования была разработана карта обследования беременных, которая состояла из двух разделов: первый включал подробное изложение анамнестических данных; второй раздел содержал информацию о течение данной беременности и ее исходах.

Критериями включения в исследование для основной группы являлись:

- Одноплодная беременность при сроке от 22 до 40 недель;
- Возраст беременных от 18 до 45 лет;
- Беременность, осложнившаяся ЗРП.

Критериями включения в исследование для группы сравнения являлись:

- Одноплодная беременность при сроке от 22 до 40 недель;
- Возраст беременных от 18 до 45 лет;
- Отсутствие ЗРП.

Критерии исключения беременных во всех группах исследования:

- Тяжелая экстрагенитальная патология;



- Многоплодная беременность;
- Беременность, наступившая после донации ооцита;
- Внутриутробные пороки развития плода;
- Генетические заболевания матери и плода;
- Острая фаза или обострение хронических инфекционных заболеваний;
- Миома матки больших размеров

Для выполнения поставленных задач всем пациенткам, включенным в исследование, был выполнен стандартный набор обследования согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 ноября 2012 года № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)»» (таблица 3).

Медиана сроков в исследуемых группах была сопоставима, что позволило в дальнейшем оценить результаты специальных методов исследования и перинатальные исходы (таблица 2).

Таблица 2. Срок беременности, на котором осуществлен забор биоматериала в подгруппах

Срок беременности, на котором осуществлен забор биоматериала			
Подгруппа IA Ранняя форма ЗРП	Подгруппа IB Поздняя форма ЗРП	Группа II Контрольная	p-value
32,0 (27,2; 38,2)	33,2 (28,1; 38,5)	32,5 (26,5; 39,0)	p = 0,31

Таблица 3. Лабораторные исследования и сроки забора материала для их проведения у обследованных пациенток

Показатели	До родов	После родов
	22-40 недель	1 <sup>ые</sup> сутки после родов
Определение основных групп крови (А, В, 0) и резус-принадлежности	+	–
Определение антител к бледной трепонеме ( <i>Treponema pallidum</i> ), ВИЧ, HBsAg, HCV	+	–
Общий (клинический) анализ крови развернутый	+	+
Коагулограмма (ориентировочное исследование системы гемостаза)	+	–
Биохимический анализ крови	+	–
Общий анализ мочи	+	+
УЗИ плода	+	–
Допплерометрия	+	–
КТГ	+	–
Определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК	+	–
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в плазме	+	–
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в плаценте	–	+
Флуоресцентная иммуногистохимия плаценты	–	+
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в пуповинной крови	–	+

## 2.2. Методы исследования

При выполнении исследования были использованы современные высокоинформативные методы, с применением реактивов и оборудования ведущих производителей.

При формировании и проведении исследования применялись следующие принципы:

1. Сопоставление клинико-anamnestической характеристики пациенток, течения беременности, родов, морфологических особенностей последа, состояния плода и новорожденного у беременных исследуемых групп.

2. Сопоставимые друг к другу сроки исследования различных физиологических и биохимических параметров, а также проведение специальных методов исследования.

3. Применение современных методов статистической обработки для и анализа полученных результатов.

### **Общеклинические методы**

При проведении подробного анализа данных анамнеза каждой пациентки особое внимание уделяли течению беременности, исходам предыдущих беременностей (выявление в анамнезе искусственных прерываний беременности, преэклампсии, преждевременных родов, неразвивающихся беременностей, самопроизвольных выкидышей, внутриутробного инфицирования плода, рождение детей, маловесных к сроку гестации, с пороками развития, генетическими заболеваниями, перинатальные потери).

Объективное исследование включало в себя оценку общего состояния, состояния систем органов дыхания, кровообращения, пищеварения, мочеполовой системы, а также неврологического статуса.

При наружном акушерском исследовании определяли положение и позицию плода, предлежащую часть и ее отношение к входу в малый таз, двигательную активность плода с аускультацией его сердечных тонов, а также оценивали состояние передней брюшной стенки. Результаты измерения окружности живота и высоты дна матки сравнивали с их нормативными показателями для соответствующего гестационного срока. При доношенной беременности проводился расчет предполагаемой массы плода согласно общепринятым формулам (Жордания, Джонсона, Якубовой).

При гинекологическом исследовании проводилась оценка кожных покровов и слизистых наружных половых органов, характера выделений из половых путей, состояния шейки матки при осмотре с помощью гинекологических зеркал и при бимануальном влагалищном исследовании с определением степени «зрелости» шейки матки по шкале Бишоп

(консистенция, длина, проходимость цервикального канала, отношение шейки матки к проводной оси малого таза).

Измерение АД проводилось на обеих руках механическим тонометром аускультативным методом по Н.С. Короткову через 5 минут отдыха, в положении сидя пациентки, с обеспечением поддержки спины и руки и расположением манжеты на уровне сердца. Производилось три измерения АД с интервалом 1-2 минуты, а дополнительное измерение требовалось лишь в случае разницы первых двух результатов более чем 10 мм рт.ст. Регистровалось АД, которое являлось средним из двух последних измерений. При этом использовали фазы I (появление первых звуков) и V (внезапное уменьшение/исчезновение) тонов Короткова для определения САД и ДАД соответственно. При выявлении разницы на руках ориентировались на более высокие значения. Показатели АД фиксировались с точностью до 2 мм рт. ст.

## **Функциональные методы исследования**

### **Ультразвуковое исследование**

Всем пациенткам проводилось ультразвуковое скрининговое исследование на сроках от 22 до 40 недели беременности с помощью экспертных ультразвуковых систем – сканеров Toshiba Aplio SSA 790A («Toshiba», Япония), «GE Voluson E8 expert» («General Electric», Соединенные Штаты Америки), «Samsung Medison Accuvix A30» («Samsung Medison», Южная Корея). Расчет предполагаемой массы плода проводили по биометрическим показателям на основании формул, предложенных В.Н. Демидовым и соавт. (1987), F.P Hadlock и соавт. (1984). Оценка количества околоплодных вод проводилась путем измерения глубины максимального вертикального кармана жидкости и индекса амниотической жидкости. Зрелость плаценты определяли по критериям Р. А. Grannum (1983).

### **Допплерометрическое исследование кровотока в системе «мать-плацента-плод»**

Изучение гемодинамики маточно-плацентарно-плодового кровообращения проводилось при помощи ультразвуковых сканеров «GE Voluson E8 expert» («General Electric», Соединенные Штаты Америки), «Samsung Medison Accuvix A30» («Samsung Medison», Южная Корея), HI VISION Preirus («Hitachi», Япония) с использованием трансабдоминальных датчиков частотой 3,5 и 5,0 МГц в режиме пульсовой доплеровской волны. Для оценки кровотока в маточных артериях использовалось среднее значение пульсационного индекса (ПИ) в правой и левой маточных артериях. Оценка кровотока в артерии пуповины проводилась путем нескольких измерений в близости от пупочного кольца плода. Церебрально-плацентарное отношение рассчитывалось как отношение ПИ в средней мозговой артерии к ПИ в артериях пуповины.

### **Аntenатальная кардиотокография**

Оценку состояния плода с 33 недель беременности проводилась на основе метода ультразвуковой локации плода путем антенатальной и интранатальной кардиотокографии при помощи автоматизированных кардиотокографов «УНИКОС-03» (Россия) и «Sonicaid Team» (Великобритания) с частотой зондирующего ультразвукового сигнала 2 МГц. Анализ осуществлялся в течение 60 минут и включал определение variability базального ритма сердечных сокращений плода, количество и амплитуду акцелераций и децелераций, а также показатель состояния плода (ПСП), который вычисляется по формуле предложенной В.Н. Демидовым (1991). Значение ПСП  $\leq 1,0$  указывает на отсутствие нарушения; 1,0 - 2,0 – начальные проявления нарушения; 2,0 - 3,0 – выраженные нарушения и более 3,0 – резко выраженные нарушения состояния плода.

## Специальные методы исследования

### Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме крови матери

Для количественного определения внеклеточной фетальной ДНК были собраны образцы по 5 мл венозной крови беременных в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Обработка образцов производилась в течение 60 минут после забора биологического материала. Выделение плазмы происходило после двухэтапного центрифугирования при 4 °С: на первом этапе в течение 10 минут при ускорении 200 g, на втором – в течение 10 минут при ускорении 4500 g. Хранение образцов плазмы осуществлялось при температуре -80 °С. Выделение внеклеточной фетальной ДНК производилось в два этапа. Определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК основано на данных о том, что в геноме плода промотор гена RASSF1A гиперметилирован, что означает, что концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц внеклеточной фетальной ДНК. На первом этапе с помощью количественного ПЦР-анализа концентрации промотора гена RASSF1A был определен уровень общей внеклеточной ДНК. Для этого из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия), согласно рекомендациям изготовителя, выделяли общую внеклеточную ДНК. Полученную ДНК после предварительной очистки хлороформом переосаждали этанолом с соосадителем нуклеиновых кислот «Satellite Red» («Евроген», Россия) разводили в 13 мкл воды. С целью выделения гиперметилированного промотора гена RASSF1A применялась реакция метилчувствительной рестрикции со 10 мкл раствора ДНК. В работе была использована эндонуклеаза рестрикции BstUI («New England Biolabs», США) 60 Е (единиц активности). Реакция рестрикции проводилась в течение 6 ч при температуре 60°С. После предварительного удаления рестриктаз с помощью хлороформа проводилось осаждение ДНК этанолом и ее дальнейшее

растворение в 10 мкл воды. Для контроля рестрикции 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР с праймерами к гену АСТВ. При отсутствии ответа оставшийся раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к RASSF1A. ПЦР-анализ проводился одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, изготовленного с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия). Концентрация стандарта ДНК была определена с помощью спектрофотометра «DeNovix» (США). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 («BioRad», США). Программа ПЦР: 95 °С - 3 мин, 45 циклов: 95 °С 10 с, 60 °С, 30 с 72 °С.

### **Морфологические методы исследования**

При морфологическом исследовании на первом этапе были изучены 232 последа (плацента, оболочки, пуповина), полученных от 232 родов.

Были использованы такие методы исследования, как:

1. Макроскопический – осмотр и описание пуповины, плодных оболочек и ворсинчатой части плаценты.
2. Морфометрический – определение общей массы плаценты с плодными оболочками и пуповиной до фиксации. Исследование пуповины включало определение длины, диаметра, места отхождения, количества сосудов, степени извитости, наличия патологических очагов. При исследовании оболочек обращали внимание на их цвет и прозрачность, место разрыва. Осмотр ворсинчатой части включал оценку размеров котиледонов, определение наличия патологических очагов, а также подсчет ворсин с различной степенью васкуляризации.

Для морфологического исследования на втором этапе были исследованы 93 последа, полученных от 93 родов с использованием следующих методов:

3. Флуоресцентная иммуногистохимия (иммунофлуоресцентный анализ).

При проведении непрямого метода флуоресцирующих антител использовались образцы плацент, полученные не позднее 10 минут после родоразрешения. Острым путем производился забор небольших фрагментов ткани плаценты размерами 2,0 x 1,0 x 0,5 см из парацентральной зоны (включающей ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки). Плацентарный материал освобождали от примесей путем отмывания в физиологическом растворе. Хранение подготовленных фрагментов производилось в стерильных маркированных криопробирках при температуре -80 С. Далее из полученного материала с помощью криостата изготавливались срезы толщиной 8 мкм. Сначала проводилось окрашивание криосрезов раствором антител против виментина (маркер клеток стромальной части плаценты) и Е-кадгерина (маркер клеток трофобласта), затем конъюгированным с флуоресцентным красителем вторых антител против первых антител и флуоресцентным интеркалирующим красителем для окрашивания нуклеиновых кислот 4',6-диамиидно-2-фенилиндолом (DAPI). Полученные срезы изучались при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на микроскопе «Leica SP5» («Leica Microsystems», Германия), что позволило изучить особенности строения ворсин при ЗРП.

#### 4. Гистохимическое исследование.

TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyltransferase — mediated dUTP—biotin Nick—End Labeling), или терминальное дезоксиуридиновое мечение концов — это метод, направленный на идентификацию и количественное определение подвергшихся апоптозу клеток, при котором происходит распад ДНК под действием эндонуклеаз с образованием кратных размеру одной нуклеосомы фрагментов. При использовании TUNEL-метода происходит специфическое связывание с 3'- концом разорванной нити ДНК дУТФ, меченого биотином в присутствии фермента дезоксирибонуклеотидтрансферазы. Для проведения исследования ткань плаценты фиксировали в течение 24 ч в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (PBS) при температуре 4 °С. С



последующим переносом без отмывания в 30% сахарозу еще на 24 ч при температуре 4 °С. После этого ткань подвергалась заморозке в специальной среде «Tissue-Tek O.C.T. Compound» («Sakura Finetek», США). Срезы толщиной 8 мкм изготавливали на криостате «Microm HM 525» («Thermo Scientific», США). Реакцию TUNEL проводили с использованием набора «In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein» («Roche», Германия) согласно рекомендациям производителя, с последующим окрашиванием пропидий йодидом в концентрации 2 мкм на PBS всей ДНК. Срезы исследовали на конфокальном микроскопе «Leica SP5» («Leica Microsystems», Германия).

### **Исследование уровня метилирования генов с помощью анализа кривых плавления с высоким разрешением.**

С целью исследования уровня метилирования генов в плаценте были применены образцы плацент, полученные в течение 10 минут после родоразрешения. Забор фрагментов плацентарной ткани размерами 2,0 x 1,0 x 0,5 см производился из парацентральной зоны и обязательно включал ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки. Обработанные фрагменты хранились в криопробирках при температуре -80 С. Для исследования уровня метилирования генов в плазме материнской крови были собраны образцы периферической крови объемом по 5 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). В течение 60 минут после забора производилась обработка полученных образцов. После проведения двухэтапного центрифугирования при 4 °С (1 этап – продолжительность 10 минут, ускорение 200g; 2 этап – продолжительность 10 минут, ускорение 4500g) выделяли образцы плазмы, которые хранили при температуре - 80 °С. Из полученных образцов плацент и плазмы материнской крови проводилось выделение ДНК с применением наборов «QIAamp DNA Mini Kit» («Quiagen», США) согласно протоколу изготовителя. На следующем этапе производилась бисульфитная конверсия ДНК при помощи

набора «EpiJET Bisulfite Conversion Kit» («Thermo Scientific», США), которая приводила к конвертированию всех неметилованных цитозинов в урацилы. При этом метилированные цитозины не подвергались изменению. Перед проведением ПЦР был проведен отбор праймеров по факту отсутствия динуклеотидов CpG. Далее проводилась ПЦР с праймерами к фрагменту CpG-островков исследуемых генов с использованием следующей программы амплификации: 1-й этап - 95° - 5 мин; 2-й этап - 95° - 15 с., 60° - 30 с., 72° - 45 с (30 циклов); 3-й этап - 95° - 15 с., 50° - 30 с., 72° - 45 с (25 циклов), в результате чего происходила замена урацилов на тимины. Для детектирования полученных продуктов ПЦР добавлялся специфичный к двухцепочечной ДНК интеркалирующий флуоресцентный краситель «EvaGreen» («Синтол», Россия). Для построения кривой плавления была использована следующая программа: 1-й этап – 95° - 30 с; 2-й этап – 60° - 10 мин., 3-й этап – 60°- 90° с шагом 0,2°.

Определение уровня метилирования проводилось с помощью методы анализа кривых плавления с высоким разрешением (methylation-specific high resolution melts, MS-HRM) с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis Software, версия 3 («BioRad», США) [290]. В результате анализа кривые плавления распределились следующим образом: от кривой с наименьшим метилированием – нижняя, до кривой с максимальным метилированием – верхняя (рисунок 4). Количественная оценка метилирования проводилась с использованием относительных единиц интенсивности флуоресценции (RFU) при температуре максимального расхождения кривых (на рисунке 6 - 76,5 °C). Для проведения ПЦР и MS-HRM использовали амплификатор CFX-96 («BioRad», США).

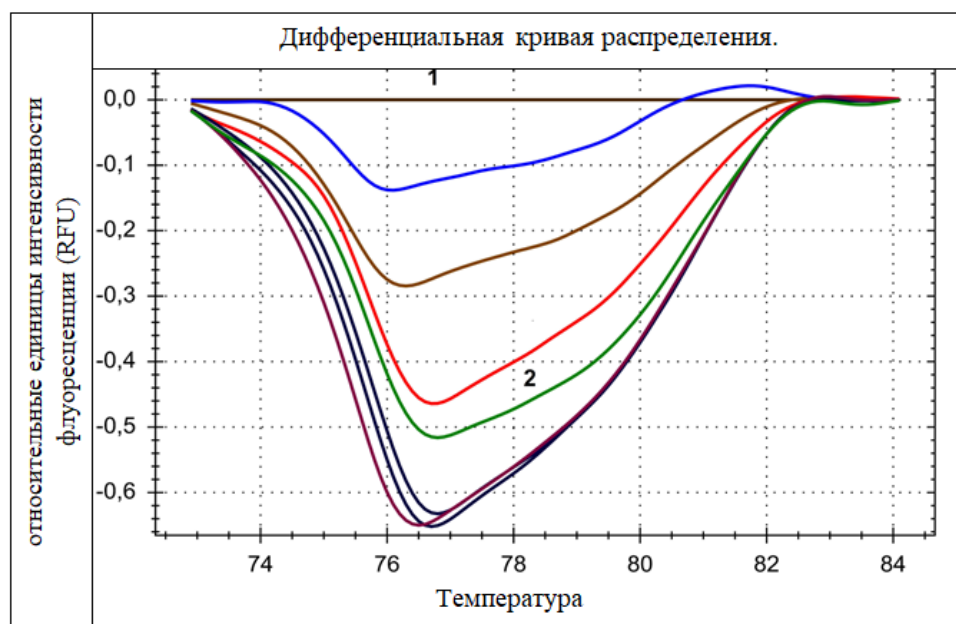


Рисунок 4. Расчет относительного уровня метилирования по относительным флуоресцентным единицам (RFU) при температуре максимальных пиков кривых HRM ( $T_{\max \text{ peak}} 76,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

1 – кривая образца со стопроцентным метилированием, по которой нормированы результаты.

2 – оптимальная пороговая кривая, разделяющая образцы ткани основной и контрольной групп.

### **Исследование уровня метилирования генов методом пиросеквенирования**

Для определения уровня метилирования генов в пуповинной крови образцы собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, затем центрифугировали при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут при ускорении  $300g$ , затем в течение 10 минут при ускорении  $14000g$ . Пиросеквенирование проводилось с использованием пиросеквенатора «PyroMark Q48» («Qiagen», Германия). Пиросеквенирование представляет собой метод, включающий определенную последовательность реакций (рисунок 7). На первом этапе проводится амплификация фрагмента ДНК и

биотинилирование цепи - матрицы для пиросеквенирования с последующей денатурацией, изоляцией и гибридизацией биотинилированного одноцепочечного ампликона. Далее в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ-сульфуриказы, люциферазы, апиразы, и субстратов: аденозин - 5'-фосфосульфата (АФС) и люциферина осуществляется инкубация праймера и одноцепочечной матрицы. На следующем этапе производится добавление первого дезоксирибонуклеотид трифосфата (dNTP), которое сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквивалентном количеству встроившихся нуклеотидов. Под воздействием АТФ-сульфуриказы в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата происходит превращение пирофосфата в АТФ, которая запускает реакцию окисления люциферина в оксильюциферин и образование видимого света. После выявления видимого света CCD-камерой на пирограмме регистрируются изображения в виде пиков. При этом высота пиков пропорциональна количеству встроившихся в матрицу нуклеотидов. В результате построения комплементарной цепи ДНК формируется пирограмма, позволяющая определить уровень метилирования каждого CpG-сайта исследуемого образца

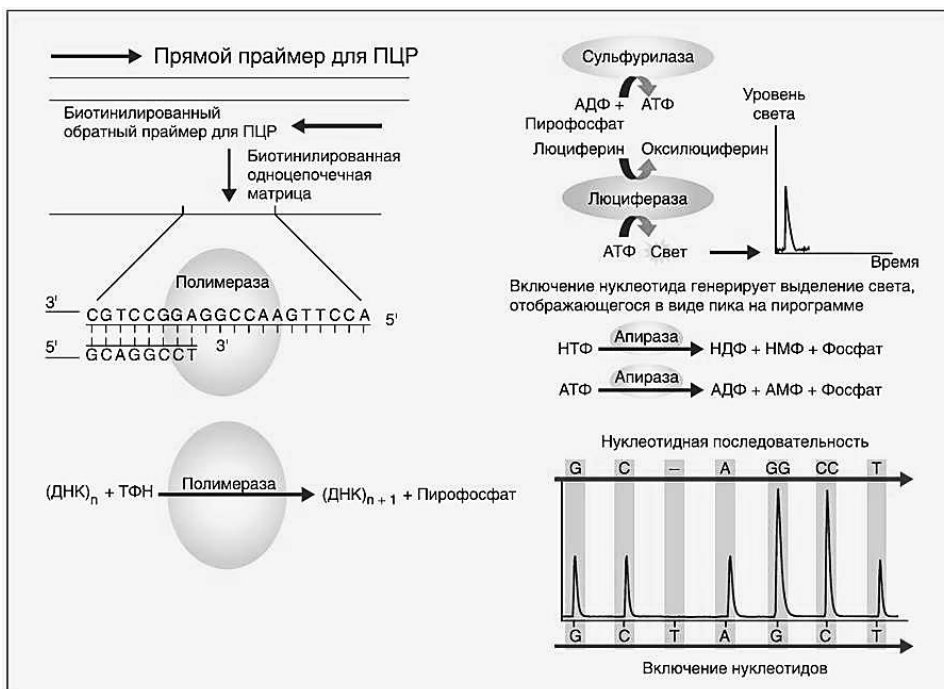


Рисунок 5. Схема процесса пиросеквенирования «PyroMark Q48» («Qiagen», Германия).

## **Изучение перинатальных исходов**

Изучение здоровья детей в раннем и позднем неонатальном периоде является одним из главных показателей эффективности применения различных методов профилактики и лечения на антенатальном этапе. Оценка раннего и позднего неонатального периода была проведена у 232 новорожденных. После рождения все дети были осмотрены врачом-неонатологом. Младенцам проводились оценка состояния по шкале Апгар, измерение антропометрических показателей – массы, роста, окружности головки, плеч и грудной клетки. Постнатальная оценка массо-ростовых показателей проводилась с помощью кривых роста Т. Fenton (2013 год) для мальчиков и девочек [96]. Антропометрические показатели считаются соответствующими гестационному возрасту при их нахождении между 10-ым и 90-ым перцентилями. Диагноз маловесного к сроку гестации устанавливался при показателях массы и длины новорожденного меньше 10-ого перцентиля. В дальнейшем изучались динамика антропометрических показателей, течение раннего адаптационного периода, нутритивный статус, динамика состояния новорожденных при возникновении осложнений в раннем неонатальном периоде.

### **Статистические методы**

Все полученные результаты в ходе исследования вносились в специально разработанную для данного исследования тематическую карту и в электронные таблицы MSExcel for windows.

Статистический анализ проводился с помощью программных обеспечений «Attestat» (Россия), «OriginPro 8.5» (США), «SPSS Statistics 23.0» и Statistica for Windows v.11 (США).

Для оценки нормальности распределения изучаемой выборки проводился тест Шапиро-Уилка. Для описания категориальных бинарных

данных использовали абсолютные числа  $N$  и процентные доли от общего числа пациенток в группе  $P$  в формате  $N (P\%)$ . Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $SD$ ) в формате  $M (SD)$ . Для определения различий в группах по средним значениям использовался  $T$ -критерий Стьюдента и дисперсионный анализ. При распределении признаков, отличающихся от нормального, их описывали в виде медианы ( $Me$ ) и квартилей  $Q1$  и  $Q3$  в формате  $Me (Q1; Q3)$ . Качественные показатели были представлены как в абсолютных, так и в относительных величинах (%). Данные считались статистически значимыми при доверительном интервале  $p < 0,05$ .

Статистический анализ проводили с помощью  $\chi^2$ -теста для сравнения категориальных данных, методом теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения.

Также для каждого количественного параметра были определены ошибка среднего ( $t$ ), и 95% доверительный интервал, для бинарных данных определяли отношение шансов ( $OR$ ) и его доверительный интервал ( $CI$ ). Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена. 95% доверительный интервал для коэффициента корреляции определяли с помощью преобразования Фишера. Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05.

Для оценки потенциальной прогностической значимости исследуемых параметров разработали модель логистической регрессии. При построении бинарной логистической регрессионной модели применялся прямой метод Вальда. Качество приближения регрессионных моделей при каждом последующем шаге оценивалось с применением функции подобия – отрицательного удвоенного значения логарифма этой функции ( $-2LL$ ). Объяснимая с помощью логистической регрессии часть дисперсии вычислялась по методу Наделькеркса. Для оценки удельного веса

предикторов, включенных в модель, проводился дискриминантный анализ с принудительным включением полученных предикторов. Удельный вес предиктора вычисляли как частное от деления абсолютной величины соответствующего нормированного коэффициента дискриминантной функции на сумму абсолютных величин всех нормированных коэффициентов.

Оценка качества полученных моделей определяли путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой (AUC), а также расчета чувствительности и специфичности разработанной модели в точке порогового значения. Пороговое значение выбиралось по критерию максимальной суммарной чувствительности и специфичности.

## Результаты собственных исследований

### ГЛАВА 3. ИСХОДНАЯ КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ С ЗАДЕРЖКОЙ РОСТА ПЛОДА

На первом этапе в данную работу согласно критериям включения и исключения были включены 219 пациенток, родоразрешенных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2017 по 2019 год.

Согласно наличию осложнения беременности в виде ЗРП, были сформированы две группы: группа I – основная, состоящая из 105 женщин, беременность которых осложнилась ЗРП, и группа II – контрольная, состоящая из 114 условно здоровых беременных.

У включенных в исследование пациенток были изучены данные анамнеза с особым акцентом на наличие заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыделительной и эндокринной систем, нарушений гемостаза, вредных привычек. При анализе акушерско-гинекологического анамнеза особый анализ проводился по наличию задержки роста плода, преэклампсии и преждевременных родов в анамнезе у повторнородящих. Были изучены социально-экономический статус, исходная клиническая характеристика, течение беременности, особенности и исходы родов, а также состояние плода и новорожденного. Был проведен тщательный анализ семейного анамнеза, в том числе на наличие тромботических и метаболических нарушений.

До начала участия в исследовании пациентками было подписано добровольное информированное согласие на участие. Включение в исследование проводилось по обращаемости.

Критериями включения в исследование для основной группы являлись срок беременности 22-40 недель, возраст беременных от 18 до 45 лет, одноплодная беременность, осложнившаяся ЗРП. Критериями включения в исследование для группы сравнения являлись отсутствие ЗРП, одноплодная



беременность при сроке от 22 до 40 недель, возраст беременных от 18 до 45 лет.

Критерии исключения беременных во всех группах исследования послужили тяжелая экстрагенитальная патология, многоплодная беременность, наступившая после донации ооцита, внутриутробные пороки развития плода, генетические заболевания матери и плода, острая фаза или обострение хронических инфекционных заболеваний у матери, миома матки больших размеров.

#### **Анализ соматического и акушерско-гинекологического анамнеза**

Возраст, включенных в исследование беременных варьировал в пределах от 18 до 44 лет и составил 33 (28; 39) года в основной группе и 30 (26; 31) лет в группе сравнения. Для точной оценки возраста как фактора риска ЗРП, было проведено распределение женщин по возрасту (таблица 4).

Таблица 4. Распределение пациенток исследуемых групп по возрасту (n, %).

Группы/Возраст	18-23 лет		24-29 лет		30-35 лет		36 и более лет	
Группа 1 (n=105)	18	17,1 %	27	25,7 %	37	35,2 %	23	21,9 %
Группа 2 (n=114)	29	25,4 %	41	36 %	30	26,3 %	14	12,3 %

\*статистически значимые различия между группами  $p < 0,05$

Анализ возраста и антропометрических показателей пациенток не выявил статистически значимых различий между группами. Масса тела в основной группе составила 68 (60;78) кг, а в группе сравнения 69 (66;80) кг. Показатели ИМТ также не были статистически значимо различны в исследуемых группах, составив 25,5 (23,0;27,0) в основной группе и 24,5 (22,8;26,0) в группе сравнения.

Анализ социально-экономической характеристики и не показал различий в исследуемых группах. Оценка и анализ вредных привычек также не показал различий в исследуемых группах.

Анализ генетических факторов риска включал в себя учет наследственных факторов риска – наличие заболеваний сердечно-сосудистой системы, тромбозов и тромбоэмболических осложнений в возрасте до 50 лет

у родственников первой и второй линии. Согласно полученным данным у пациенток основной группы наследственность была чаще отягощена сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с группой контроля ((n=35, 33,3%) (OR=0,8 (0,4-1,6)), p>0,05).

На втором этапе с целью оценки генетических факторов риска был проведен анализ носительства полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска, который включал в себя либо носительство гомозиготного варианта полиморфизма 1691 G->A (R506Q) гена F5 либо носительство гомозиготного варианта полиморфизма коагуляционного фактора II (F2: 20210 G>A), сочетание носительства гетерозиготной формы полиморфизма данных генов, дефицит антитромбина III, дефицит протеина C, дефицит протеина S согласно клиническим рекомендациям "Профилактика венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений акушерстве и гинекологии". Согласно полученным данным у пациенток основной группы риск тромбофилических состояний был выше по сравнению с пациентками контрольной группы, что было обусловлено дефектами в генах II и V факторов свертывания крови (n=6, 5,7%) (OR= 2,5 (1,4-9,2)), p<0,01). Анализ дефицита антитромбина III, дефицита протеина C, и дефицита протеина S не показал статистически значимых различий в исследуемых группах.

На третьем этапе был проведен анализ на наличие антифосфолипидного синдрома у пациенток в исследуемых группах. Диагноз был подтвержден врачом-гематологом с учетом диагностических критериев антифосфолипидного синдрома:

- клинические критерии: один или более эпизод тромбоза венозных, артериальных или мелких внутриорганных сосудов любой локализации, подтвержденный морфологическими или инструментальными методами исследования;

- лабораторные критерии: наличие антител IgG и/или IgM к кардиолипину в средних или высоких титрах, выявленных путем стандартизованного иммуноферментного метода дважды с интервалом не

менее 12 недель; наличие антител IgG и/или IgM к  $\beta 2$  гликопротеину-1, выявленных с помощью стандартизованного иммуноферментного метода дважды с интервалом не менее 12 недель; волчаночный антикоагулянт, выявленный дважды с интервалом не менее 12 недель стандартизованным коагулологическим методом.

- акушерские критерии: один или более эпизод гибели нормального плода после 10 недель беременности при отсутствии причин; одни или более преждевременные роды (нормальным новорождённым) до 34 недель беременности осложненной преэклампсией или тяжёлой плацентарной недостаточностью; наличие трех и более спонтанных аборт до 10 недель беременности. Анализ данных показал, что у пациенток основной группы частота антифосфолипидного синдрома была выше по сравнению с пациентками контрольной группы, в которой данная патология не встречалась (n=5, 4,8 %) (OR= 2,1 (1,2 – 18,4)), p<0,01).

На следующем этапе исследования был проведен анализ структуры соматической патологии в группах исследования. Частота и структура соматических заболеваний представлена в таблице 5 и на рисунке 6.

Таблица 5. Структура соматической заболеваемости в группах (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Мигрень	12 (11,4%)	10 (8,7%)
Хроническая артериальная гипертензия	12 (11,4%) *	5 (4,4%)
Варикозное расширение вен нижних конечностей	29 (27,6 %)	27 (23,7%)
Пролапс митрального клапана	12 (11,4%)	10 (8,8%)
Антифосфолипидный синдром	5 (4,8 %)*	0 (0%)
Носительство полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска	10 (9,5%)*	2 (1,75%)
Бронхиальная астма	7 (6,6%)	5 (4,4%)
Хронический цистит	24 (22,9%)	18 (15,8 %)
Хронический пиелонефрит	26 (24,7%)*	8 (7,0%)
Аутоиммунный тиреоидит	6 (5,7%)	4 (3,5%)
Узловой и диффузный зоб	11 (10,5%)	9 (7,9%)
Нарушение жирового обмена	5 (4,8 %)	4 (3,5%)
Хронический тонзиллит	16 (15,2%)	14 (12,3%)

\*статистически значимые различия между группами p <0,05

Сравнительный анализ исходной анамнестической характеристики женщин исследуемых групп позволил установить следующие закономерности: у беременных с задержкой роста плода была отмечена статистически значимая более высокая частота заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно хронической артериальной гипертензии по сравнению с группой контроля ( $n=12$ , 11,4%) ( $OR= 2,3$  (1,6-8,5)),  $p<0,01$ ). Статистически значимых различий в частоте пролапса митрального клапана, варикозного расширения вен нижних конечностей и других заболеваний сердечно-сосудистой системы установлено не было.

Анализ заболеваний носо- и ротоглотки показал, что в основной группе частота хронического тонзиллита ( $n=16$ , 15,2 % ( $OR= 2,3$  (1,9-18,6)),  $p>0,05$ ) не различалась с группой сравнения.

Анализ заболеваний желудочно-кишечного тракта установил, что в основной группе частота хронического поверхностного гастрита ( $n=22$ , 20,9 % ( $OR=4,0$  (1,8-19,4)),  $p>0,05$ ), хронического атрофического гастрита ( $n=1$ , 0,95%  $OR=0,8$  (0,05-13,8)  $p>0,05$ ), хронического холецистита ( $n=4$ , 3,8% ( $OR=1,7$  (0,1-19,4)),  $p>0,05$ ) статистически значимо не различалась с группой сравнения.

Среди заболеваний мочевыводящей системы статистически значимым были различия в частоте хронического пиелонефрита ( $n=26$  (24,7%) ( $OR=4,6$  (1,8-18,3)),  $p<0,01$ ). В основной группе частота цистита ( $n=24$  (22,9%) ( $OR=5,4$  (1,6-46,3)  $p>0,05$ ) и мочекаменной болезни ( $n=1$ , 1,2%) ( $OR=0,8$  (0,05-13,8)  $p>0,05$ )) была выше, чем в группе сравнения.

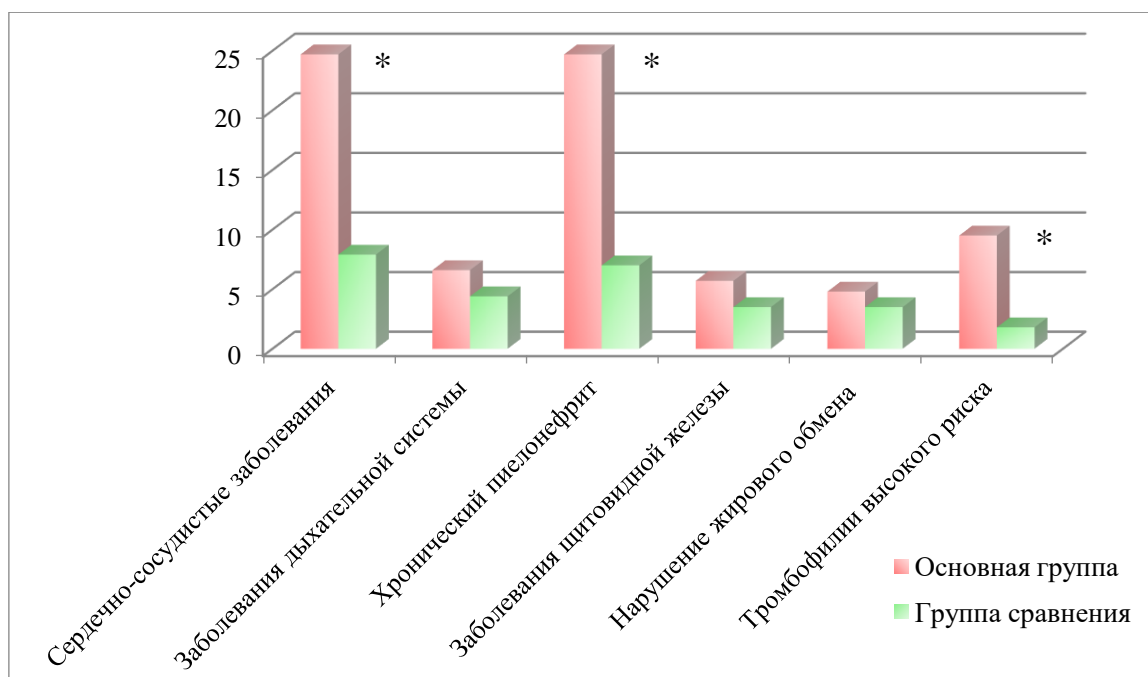


Рисунок 6. Частота встречаемости экстрагенитальной патологии в исследуемых группах.

Анализ заболеваний эндокринной системы не показал статистически значимых различий в частоте аутоиммунного тиреоидита ( $n=6$ , 5,7%) ( $OR=3,4$  (1,6-21,4)),  $p>0,05$ ), узлового и диффузного зоба ( $n=11$ , 10,5%) ( $OR=5,3$  (2,1-16,4)),  $p>0,05$ ), нарушений жирового обмена ( $n=5$ , 4,8%) ( $OR=2,3$  (1,1-17,2)),  $p>0,05$ ), и других эндокринных патологий в исследуемых группах.

Анализ соматического анамнеза показал статистически значимые различия в частоте хронической артериальной гипертензии, хронического пиелонефрита, носительстве полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска и антифосфолипидного синдрома у беременных с задержкой роста плода.

С целью изучения состояния репродуктивного здоровья женщин, был проведен анализ акушерско-гинекологического анамнеза. Частота гинекологической заболеваемости представлена в таблице 6 и на рисунке 7.

Таблица 6. Структура гинекологической заболеваемости у пациенток в группах исследования (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Миома матки малых размеров	12 (11,4%)	10 (8,8%)
Аденомиоз	9 (8,6%)	7 (6,1%)
Наружный генитальный эндометриоз	7 (6,6%)	5 (4,4%)
Гиперплазия эндометрия	2 (1,9%)	2 (1,8%)
Полип эндометрия	6 (5,7%)	3 (2,6%)
Хронический цервицит	14 (13,3%)*	5 (4,4%)
Хронический эндометрит	6 (5,7%)	4 (3,5%)
Хронический сальпингит и оофорит	4 (3,8%)	3 (2,6%)
Бесплодие I и II	8 (7,6%)	3 (2,6%)

\*Статистически значимые различия между группами  $p < 0,05$

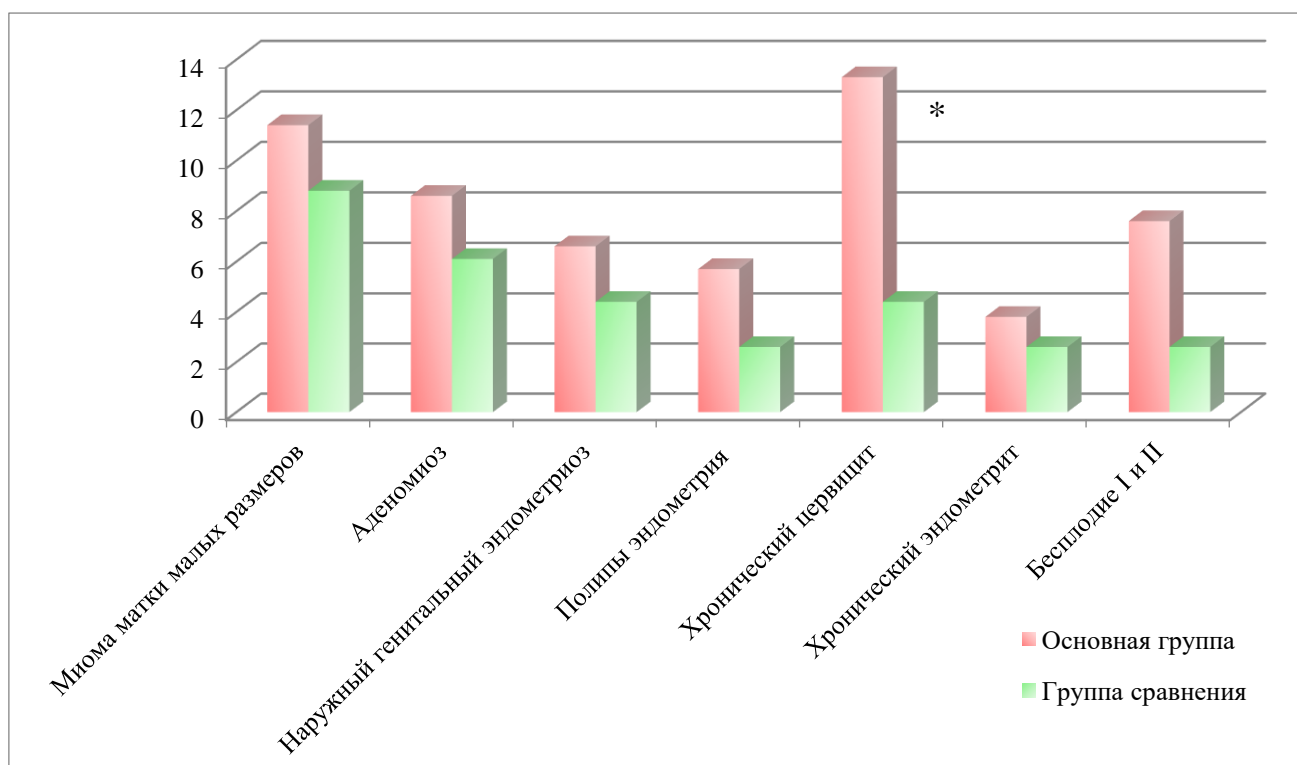


Рисунок 7. Частота встречаемости гинекологических заболеваний в исследуемых группах.

Анализ менструальной функции не выявил различий по группам и соответствовал популяционным нормам.

Среди гинекологических заболеваний в группе 1 было отмечено увеличение частоты миомы матки малых размеров (n=12, 11,4%) (OR=0,6 (2,0-18,3)),  $p > 0,05$ ), полипов эндометрия (n=6, 5,7%) (OR=1,5 (1,4-12,2)),  $p > 0,05$ ) и бесплодия (n=7, 7,6%) (OR= 0,5 (0,5-18,0)),  $p > 0,05$ ). В основной

группе было отмечено статически значимое увеличение хронического цервицита (n=14, 13,3%) (OR=1,6 (0,8-16,3)), p<0,05).

Анализ воспалительных заболеваний генитального тракта не выявил различий по заболеваемости в исследуемых группах.

В основной группе число первобеременных составило 41 (39%), повторобеременных 64 (61%), первородящих 62 (59,0%), а повторнородящих 38 (41%); в группе сравнения первобеременные составили 51 (44,7%), повторобеременные первородящие составили 62 (54,4%), повторнородящие 52 (45,6%).

Анализ исходов предыдущих беременностей показал, что в основной группе было отмечено статистически значимое увеличение частоты неразвивающейся беременности (n=9, 14,0%) (OR=2,6 (0,8-12,3)), p<0,05) и задержки роста плода (n= 12, 18,8 %) (OR=2,5 (1,2-13,4)), p<0,01), (таблица 7, рисунок 8). Статистически значимых различий по частоте преэклампсии (n= 2, 3,1 %) (OR= 1,3 (0,7-11,4)), p>0,05) и преждевременных родов (n=6, 9,4%) (OR=1,2 (0,6-15,1)), p>0,05) получено не было.

Таблица 7. Исходы предыдущих беременностей у пациенток в группах исследования (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=64 (%)	Группа 2 n=62 (%)
Искусственный аборт медикаментозный	5 (7,8%)	6 (9,7%)
Искусственный аборт хирургический	4 (6,25%)	3 (4,8%)
Неразвивающаяся беременность	9 (14,0%)*	2 (3,2%)
Самопроизвольный выкидыш	6 (9,4%)	4 (6,5%)
Преждевременные роды	6 (9,4%)	3 (4,8%)
Задержка роста плода	12 (18,8%)*	1 (1,6%)
Преэклампсия	2 (3,1 %)	0 (0%)
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	1 (1,6%)	1 (1,6%)

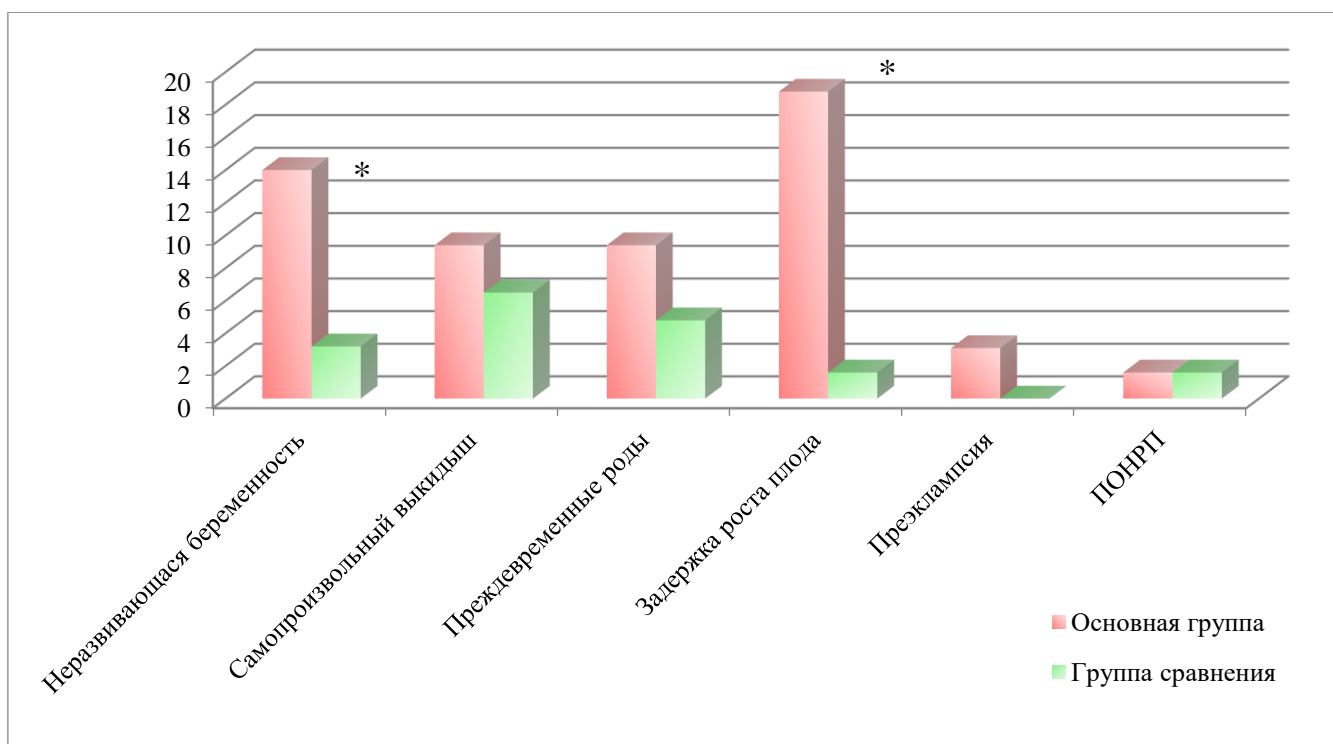


Рисунок 8. Исходы предыдущих беременностей у пациенток в группах исследования.

Таким образом, комплексный анализ клинико-анамнестических данных, течения гестационного периода и перинатальных исходов при задержке роста плода выявил следующие закономерности:

1. У пациенток с задержкой роста плода был отмечен высокий тромбогенный риск, обусловленный носительством полиморфизма генов высокого тромбогенного риска и антифосфолипидному синдрому.
2. При задержке роста плода среди соматических заболеваний статистически значимые различия отмечены только в отношении хронической артериальной гипертензии и хронического пиелонефрита.
3. Высокая частота гинекологических заболеваний в виде хронического цервицита у беременных с задержкой роста плода указывает на ее значимость в качестве факторов риска развития данного осложнения.
4. Анализ акушерского анамнеза позволил выделить задержку роста плода и нерезвивающуюся беременность в исходе предыдущих беременностей в качестве факторов риска задержки роста плода.



## ГЛАВА 4. ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ЕЕ ИСХОДЫ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФЕТАЛЬНОЙ ДНК И МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ

### Анализ течения беременности, родов и послеродового периода

Принимая во внимание высокую частоту осложнений при беременностях с задержкой роста плода, был проведен анализ течения беременности в исследуемых группах.

Анализ наступления беременности показал, что в основной группе беременность наступила в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий в 11,4% (n=12), (OR=2,6 (0,9-2,8), а группе сравнения в 5,3 % случаев (n=6), (p>0,05), что связано с более отягощенным гинекологическим анамнезом пациенток основной группы.

Анализ течения I триместра беременности показал, что беременность, осложнившаяся задержкой роста плода чаще, сопровождалась рвотой беременных легкой или умеренной степени (n=26, 24,7%), (OR=1,3 (1,6-1,9), p>0,05)). У пациенток с задержкой роста плода частота угрозы прерывания беременности (n=28, 26,7%), (OR=1,6 (0,9-2,3), p>0,05) была выше, чем у группы сравнения. При этом частота кровотечения, осложнившего угрозу прерывания беременности, была статистически значимо выше (n=18, 17,1%), (OR=2,1 (0,6-4,2), p<0,01) у основной группы.

Во II триместре в основной группе чаще течение беременности осложнялось угрозой прерывания (n=16, 15,2%), (OR=1,6 (0,6-7,1), p>0,05), с формированием истмико-цервикальной недостаточности, потребовавшей хирургической коррекции (n=3, 2,9%) OR=2,3 (0,6-21,1), p>0,05) и установки акушерского пессария (n=4, 2,8%) OR=1,8 (0,4-18,4), p>0,05). У пациенток с ЗРП II триместр беременности чаще осложнялся анемией легкой или средней степени (n=22, 20,9%) (OR= 1,6 (0,4-8,5), p>0,05), острым кольпитом (n=11, 10,4 %) (OR= 1,2 (0,2-4,5, p>0,05) и обострением хронического цистита (n=8, 7,6%) (OR= 0,9 (0,1-5,2, p>0,05).

В III триместре беременности выявлялась более высокая частота гестационной артериальной гипертензии ( $n=5$ , 4,8%) ( $OR=1,2$  (1,2-10,1),  $p>0,05$ ) и маловодия по данным УЗИ ( $n=51$ , 48,6%) ( $OR=4,6$  (0,6-15,2),  $p<0,01$ ). У пациенток с ЗРП III триместр беременности также как и II чаще осложнялся анемией легкой или средней степени ( $n=32$ , 30,5%) ( $OR= 3,6$  (0,9-9,6),  $p>0,05$ ) и острым кольпитом ( $n=13$ , 12,4 %) ( $OR=1,3$  (1,1-5,5),  $p>0,05$ ). Статистически значимых различий в частоте угрозы преждевременных родов не выявлено.

Не были получены статистически значимые различия по частоте острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей и обострений вирусных инфекций во всех триместрах беременности, однако анализ данных показал, что у беременных основной группы частота острых респираторных инфекций был выше, чем у беременных из группы сравнения ( $n=38$ , 36,1 %) ( $OR=2,4$  (0,9-6,3),  $p>0,05$ ).

Структура осложнений настоящей беременности представлена в таблице 8 и на рисунке 9.

Таблица 8. Осложнения гестационного периода у пациенток в группах исследования (n, %).

Осложнение беременности	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Рвота беременных легкой или умеренной степени	26 (24,7%)	20 (17,5%)
Угрожающий аборт в I триместре	28 (26,7%)	22 (19,3%)
в II триместре	16 (15,2%)	11 (9,6%)
Угрожающий аборт с ретрохориальной гематомой	18 (17,1%)*	2 (1,75%)
Острый кольпит в II триместре	11 (10,4 %)	7 (6,1%)
в III триместре	13 (12,4 %)	8 (7,0%)
Анемия легкой или средней степени в II триместре	22 (20,9%)	16 (14,0%)
в III триместре	32 (30,5%)	25 (21,9 %)
Острые респираторные инфекции верхних дыхательных путей	38 (36,1 %)	26 (22,8%)
Гестационная артериальная гипертензия	5 (4,8%)	2 (1,8%)
Маловодие по данным УЗИ	51 (48,6%)*	11 (9,6%)

\*Статистически значимые различия между группами  $p < 0,05$

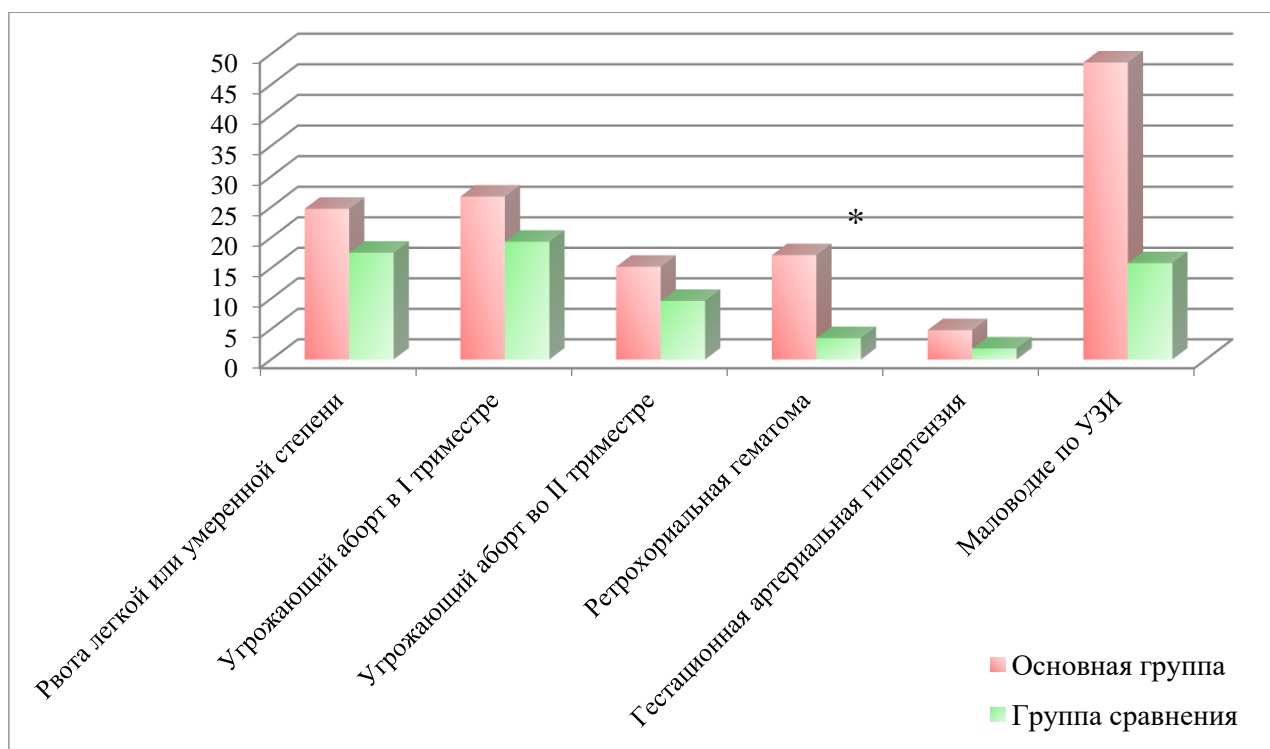


Рисунок 9. Осложнения гестационного периода у пациенток в группах исследования

Принимая во внимание патогенетические и клинические особенности ЗРП, большой интерес представляло изучение показателей доплерометрии в основной группе. Нарушение маточно-плацентарного кровотока было зафиксировано у 21,9% беременных ( $n=23$ , 21,9%  $p<0,05$ ), нарушение фето-плацентарного кровотока 18,1% ( $n=19$ , 18,1%  $p<0,01$ ), сочетанное нарушение маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока было отмечено у 41,9% беременных ( $n=44$ , 41,9%  $p<0,01$ ). При этом нарушение фето-плацентарного кровотока с наличием нулевого и обратного диастолического кровотока в артериях пуповины было зафиксировано у 15,2% беременных ( $n=16$ , 15,2%  $p<0,01$ ), а нарушение церебро-плацентарного отношения в 7,6% ( $n=8$ , 7,6%  $p<0,01$ ). Нормальные показатели кровотока были отмечены у 18,1% ( $n=19$ , 18,1%  $p<0,01$ ) беременных. Структура показателей доплерометрии в основной группе представлена на рисунке 10.

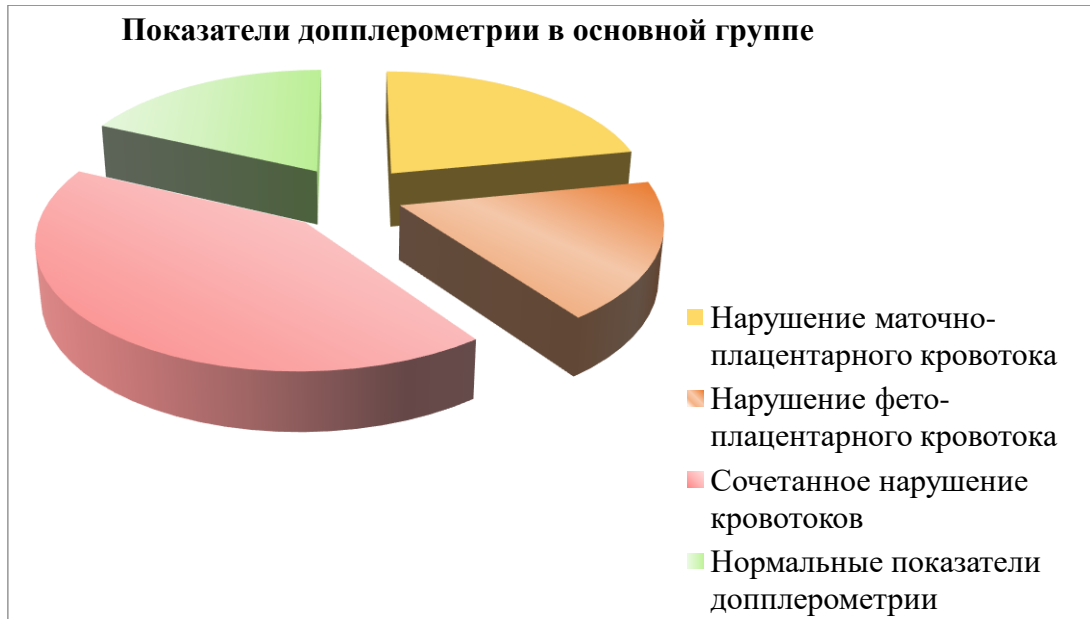


Рисунок 10. Структура нарушений кровотока в основной группе.

В связи с различными клинико-патогенетическими аспектами ранней и поздней формы задержки роста плода закономерные различия были получены и в показателях доплерометрии маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока. Так в группе ранней формы ЗРП не было отмечено изолированного нарушения маточно-плацентарного кровотока. Сочетанное нарушение кровотока в данной группе беременных достигало 73,5% (n=36, 73,5%)  $p<0,01$ ), нарушение фетоплацентарного кровотока 26,5% (n=13, 26,5%)  $p<0,01$ ) с наличием нулевого и обратного диастолического кровотока в артериях пуповины у 24,4 % (n=12, 24,4%)  $p<0,01$ ) и нарушением церебро-плацентарного отношения у 12,2 % (n=6, 12,2%)  $p<0,01$ ) беременных.

В группе поздней формы ЗРП изолированное нарушение маточно-плацентарного кровотока было отмечено у 41,1 % беременных (n=23, 41,1%)  $p<0,01$ ), сочетание нарушений маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока у 14,3 % (n=8, 14,3%)  $p<0,01$ ), изолированное нарушение фето-плацентарного кровотока у 10,7% (n=6, 10,7%)  $p<0,01$ ) со снижением до нулевого или реверсного диастолического кровотока в артериях пуповины в 7,1% (n=4, 7,1 %)  $p<0,01$ ) и нарушением церебро-плацентарного отношения в 3,6 % (n=2, 3,6%)  $p<0,01$ ) случаев. Структура

показателей доплерометрии при ранней и поздней форме ЗРП представлена на рисунке 11А и 11Б.



Рисунок 11. Структура показателей доплерометрии при ранней (А) и поздней (Б) форме ЗРП.

Как известно, ранняя форма ЗРП сопровождается более неблагоприятными перинатальными исходами, что часто вызвано воздействием с ранних сроков различных материнских и плацентарных факторов и развитием требующих досрочного родоразрешения осложнений. Так, сроки родоразрешения в группе ранней формы ЗРП составили 33,1 (29;35,6) недель, в группе поздней формы ЗРП 37,6 (36,1;40,3) недель (OR=3,2 (1,1-12,1),  $p < 0,001$ )).

При анализе родоразрешений была установлена статистически значимая более высокая частота (70,4%) ( $n=74$ , 70,4%)  $OR=3,5$  (1,1-10,6),  $p<0,05$ ) абдоминального родоразрешения у беременных основной группы. При этом частота кесарева сечения в группе ранней формы ЗРП составила 100%. Показаниями к операции кесарева сечения в основной группе в преобладающем числе случаев послужили задержка роста плода, ухудшение состояния плода в виде острой и прогрессирующей гипоксии по данным функциональных методов исследования и наличие рубца на матке после операции кесарева сечения. Ножное положение плода, периферическая витреохориоретинальная дистрофия, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты и предлежание плаценты также послужили показаниями для абдоминального родоразрешения. Структура показаний к операции кесарева сечения в исследуемых группах представлена в таблице 9. Структура показаний к операции кесарева сечения в основной группе представлена на рисунке 12.

Таблица 9. Структура показаний к абдоминальному родоразрешению (n, %).

Показание	Группа 1 n= 74 (%)	Группа 2 n= 32 (%)
Задержка роста плода	35 (47,3%)	-
Острая гипоксия плода	7 (9,5%)	3 (9,4%)
Прогрессирующая гипоксия плода	6 (8,1%)	7 (21,9%)
Рубец на матке после операции кесарева сечения	15 (20,3%)	9 (28,1%)
Ножное предлежание плода	2 (2,7%)	6 (18,6%)
Периферическая витреохориоретинальная дистрофия	1 (1,4%)	4 (12,5%)
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	4 (5,4%)	1 (3,1%)
Предлежание плаценты	4 (5,4%)	2 (6,3%)

\*Статистически значимые различия между группами  $p < 0,05$

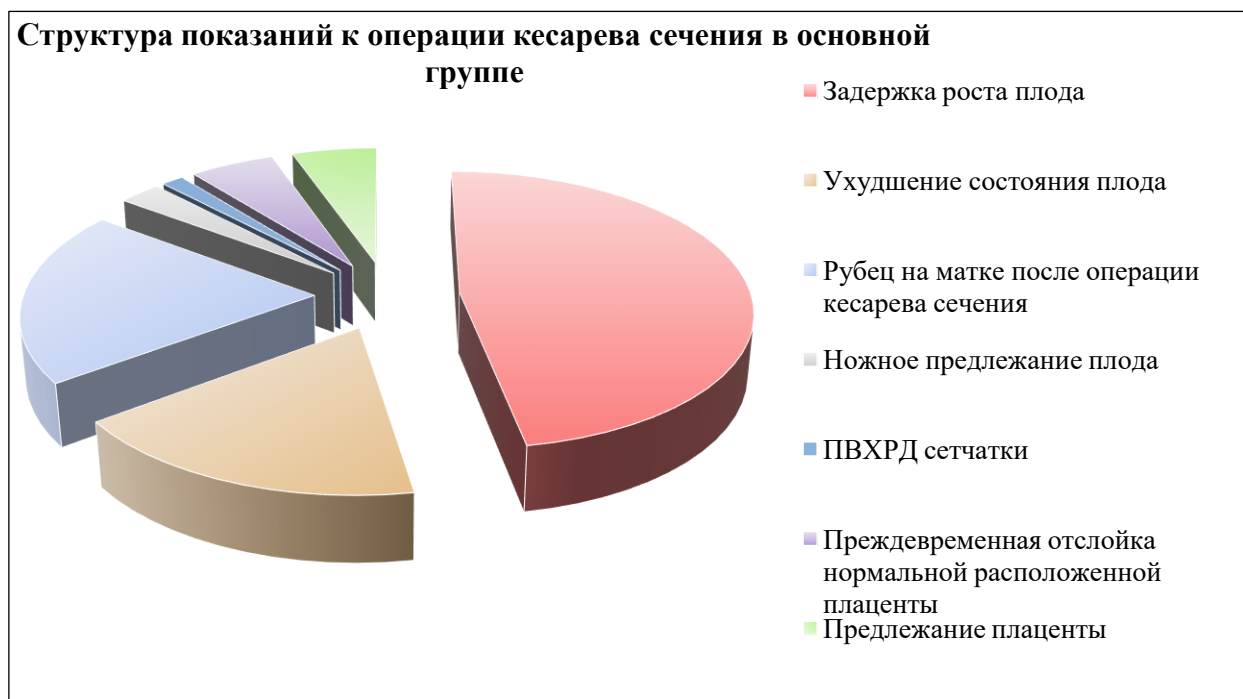


Рисунок 12. Структура показаний к операции кесарева сечения в основной группе.

Анализ послеродового периода не показал статически значимых осложнений у пациенток основной группы.

#### **Анализ перинатальных исходов**

Анализ массо-ростовых показателей выявил, что в основной группе масса новорожденных составила 2210,4 (1790,5; 2505,8) г, рост 46,0 (42,0; 49,0) см, а в группе сравнения 3286 (3010,5; 3670,4) и 51,0 (50,0; 54,0) соответственно ( $p < 0,001$ ). При этом в основной группе 10,5% составили дети с экстремально низкой массой тела при рождении ( $n=11$ , 10,5%) ( $OR=5,2$  (1,1-11,1),  $p < 0,001$ ), а 14,3 % с очень низкой массой тела при рождении ( $n=15$ , 14,3%) ( $OR=6,3$  (1,8-12,3),  $p < 0,001$ ). Оценка новорожденного по шкале Апгар на 1-ой минуте составила в основной группе 6 (5;7), а в группе сравнения 8 (7;8) ( $p < 0,001$ ), на 5-ой минуте жизни 7 (6;8) и 9 (8;9) баллов соответственно ( $p < 0,001$ ).

Общая неонатальная заболеваемость закономерно выше была у новорожденных основной группы. В структуре заболеваемости у детей в основной группе статистически значимо встречались врожденная пневмония

(n=34, 32,4%) (OR=3,6 (1,9-10,1), p<0,01), ДВС-синдром (n=12, 11,4%) (OR=2,6 (1,8-11,3), p<0,001), ВЖК I и II степени тяжести (n=18, 17,1%) (OR=1,6 (0,8-9,6), p<0,01), НЭК (n=6, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), p<0,001), бронхолегочная дисплазия (n=8, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), p<0,001), ретинопатия (n=5, 4,8%) (OR=2,2(0,8-12,3), p<0,01), респираторный дистресс-синдром (n=8, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), p<0,001).

В основной группе чаще встречались церебральная депрессия (n=9, 8,6%) (OR=3,6 (0,9-14,2), p<0,05), неонатальная желтуха (n=29, 27,6%) (OR=5,6 (0,3-17,4), p<0,05), анемия новорожденных (n=34, 32,3%) (OR=1,6 (1,4-14,2), p<0,05), полицитемия (n=2, 1,9%) (OR=1,2 (0,6-9,2), p<0,01), тромбоцитопения (n=5, 4,8%) (OR=3,2 (0,9-10,2), p<0,01), срыгивания и руминация (n=15, 14,3%) (OR=4,6 (0,7-15,6), p<0,01), кровоизлияние в кожу (n=16, 15,2%) (OR=6,3 (1,4-21,1), p<0,01), дискинезия желудочно-кишечного тракта (n=7, 6,7%) (OR= 6,2 (0,3-15,4), p<0,01), неонатальная гипогликемия (n=5, 4,8%) (OR=2,4 (1,6-12,4), p<0,01), транзиторная лактазная недостаточность (n=7, 6,7%) (OR= 6,2 (0,3-15,4), p<0,01) преобладали в основной группе чем в группе сравнения.

В основной группе частота асфиксии различной степени тяжести (n=16, 15,2%) (OR=4,3 (1,4-17,5), p<0,01) статистически значимо выше, чем в группе сравнения. При этом в основной группе у новорожденных была диагностирована асфиксия легкой степени (n=10, 9,5%) (OR=2,3 (0,9-12,4), p<0,05) и асфиксия тяжелой степени (n=6, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), p<0,001), тогда как в группе сравнения лишь асфиксия легкой степени (n=6, 5,3%) (OR=1,6 (0,4-16,2), p<0,05). Структура осложнений раннего неонатального периода представлена в таблице 10.



Таблица 10. Структура осложнений раннего неонатального периода

Нозологические формы	Группа 1 n= 105 (%)	Группа 2 n= 114 (%)
Врожденная пневмония	34 (32,4%)	6 (5,3%)
ДВС-синдром	12 (11,4%)	-
ВЖК I и II степени тяжести	18 (17,1%)	7 (6,1%)
НЭК	6 (5,7%)	-
Асфиксия легкой степени	10 (9,5%)	6 (5,3%)
Асфиксия тяжелой степени	6 (5,7%)	-
Респираторный дистресс-синдром	8 (7,6%)	-
Ретинопатия	5 (4,8%)	-
Бронхолегочная дисплазия	8 (7,6%)	-
Церебральная депрессия	9 (8,6%)	4 (12,5%)
Неонатальная желтуха	29 (27,6%)	4 (3,5%)
Анемия новорожденных	34 (32,3%)	6 (5,3%)
Полицитемия	2 (1,9%)	6 (0,9%)
Тромбоцитопения	5 (4,8%)	2 (1,8%)
Срыгивания и руминация	15 (14,3%)	8 (7,0%)
Кровоизлияние в кожу	16 (15,2%)	9 (7,9%)
Неонатальная гипогликемия	5 (4,8%)	1(0,9%)
Транзиторная лактазная недостаточность	7 (6,7%)	1(0,9%)
Дискинезия желудочно-кишечного тракта	7 (6,7%)	1(0,9%)

При внутригрупповом анализе было установлено, что масса тела детей в подгруппе IA ранней формы ЗРП составила 1122,6 (930;1803) г, а в подгруппе IB поздней формы ЗРП 2130 (1537;2662) г ( $p<0,001$ ). Отличия были получены и в оценке состояния по шкале Апгар, которая на 1-ой минуте в подгруппе IA составила 5 (4;6), а в подгруппе IB 6 (5;7) ( $p<0,001$ ) баллов, на 5-ой минуте 6 (5;7) в подгруппе ранней формы и 7 (6;8) баллов в подгруппе поздней формы ЗРП ( $p<0,001$ ). Дети, рожденные с ЭНМТ были в 100% случаев в подгруппе ранней формы ЗРП ( $n=11$ , 22,4%) ( $OR=8,4$  (1,5-16,7),  $p<0,001$ ), а с ОНМТ составили 16,3 % ( $n=8$ , 16,3%) ( $OR=8,4$  (1,5-16,7),  $p<0,001$ ). В IA подгруппе частота врожденной пневмонии ( $n=26$ , 53,2%)

(OR=6,1 (1,1-16,2),  $p<0,001$ ), ДВС-синдрома (n=8, 16,3%) (OR=7,2 (0,9-19,6),  $p<0,01$ ), ВЖК (n=10, 20,4%) (OR=3,6 (0,4-17,2),  $p<0,05$ ), НЭК (n=5, 10,2%) (OR=6,0 (1,3-13,4),  $p<0,01$ ), асфиксии тяжелой степени (n=5, 10,2%) (OR=6,0 (1,3-13,4),  $p<0,01$ ), бронхолегочной дисплазии (n=7, 14,3%) (OR=4,6 (1,2-18,4),  $p<0,001$ ), ретинопатии (n=5, 10,2%) (OR=7,6 (0,9-19,2),  $p<0,001$ ) были статистически значимо выше, чем в IB подгруппе. Данные внутригруппового анализа представлены на рисунке 13.

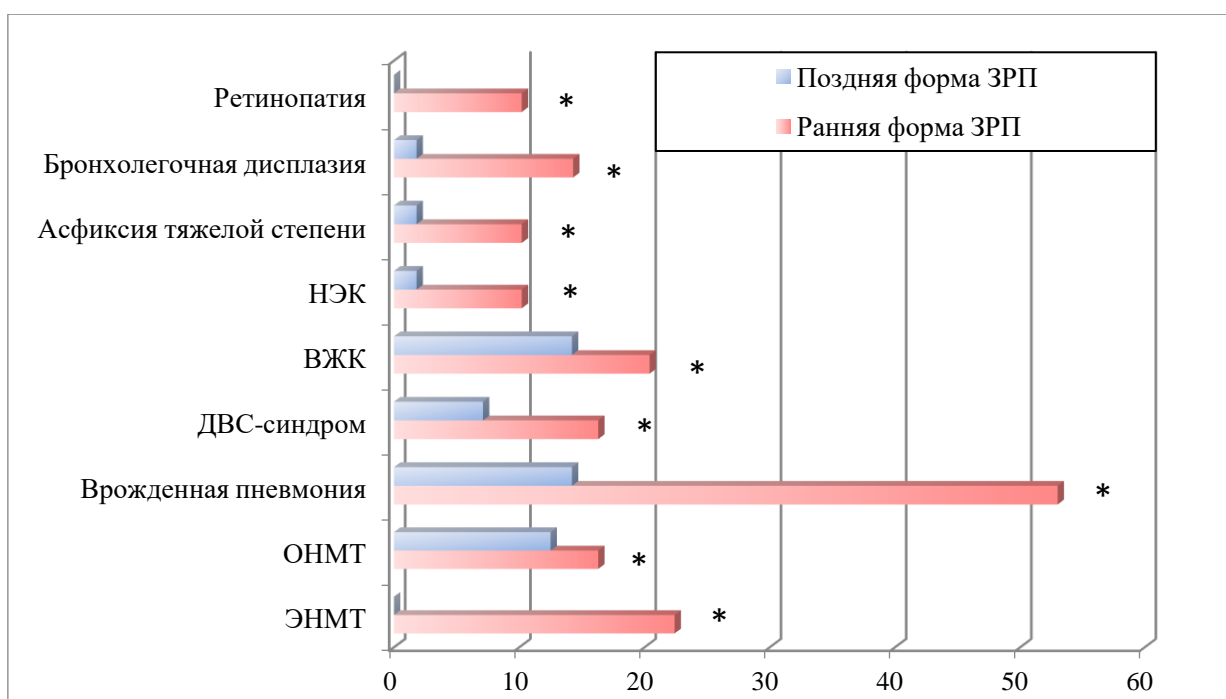


Рисунок 13. Осложнения раннего неонатального периода при ранней и поздней форме ЗРП

Таким образом, комплексный анализ клинико-anamнестических данных, течения гестационного периода и перинатальных исходов при задержке роста плода выявил следующие закономерности:

1. Анализ течения гестационного периода показал, что фактором риска развития задержки роста плода послужил угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности. В группе задержки роста плода также отмечалось статистически значимое увеличение частоты маловодия по данным ультразвукового исследования.

2. Анализ перинатальных исходов показал статистически значимую высокую частоту осложнений раннего неонатального периода при ранней форме задержки роста плода.

3. В основной группе 10,5% составили дети с экстремально низкой массой тела при рождении, а 14,3 % с очень низкой массой тела при рождении.

4. Общая неонатальная заболеваемость закономерно выше была у новорожденных с задержкой роста плода. В структуре заболеваемости у детей в основной группе статистически значимо встречались врожденная пневмония, ДВС-синдром, ВЖК I и II степени тяжести, НЭК, бронхолегочная дисплазия, респираторный дистресс-синдром и ретинопатия.

На основании анализа клинико-anamnestических данных и данных об особенностях течения беременности, применив метод бинарной логистической регрессии, определена вероятность развития задержки роста плода по формуле:

$$P=1/(1+e^{-z}), \text{ где}$$

$e$  – основание натурального логарифма и имеет значение 2,71828182845904;

$$Z = 0,146 * \text{Возраст} - 1,863 * X1 - 2,243 * X2 - 1,734 * X3 - 1,895 * X4 + 2,508$$

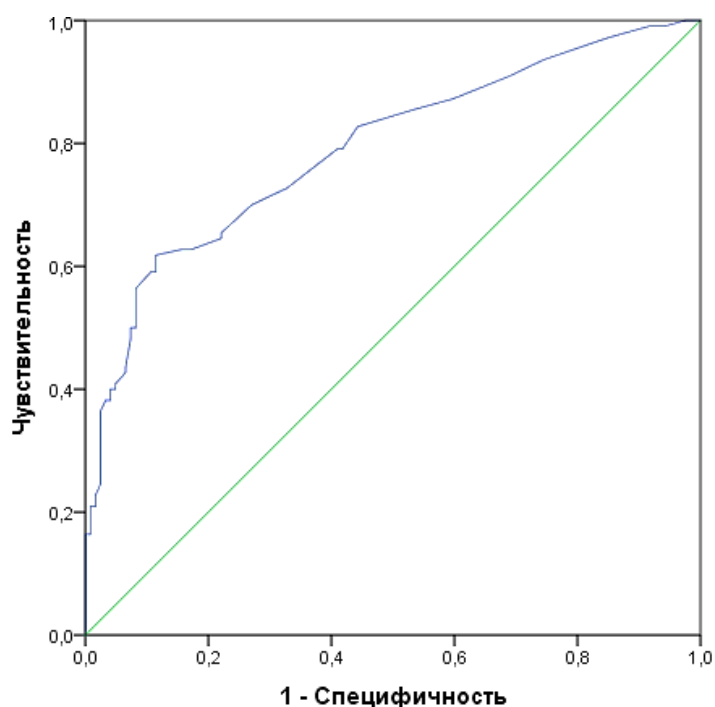
$X1$  – Хронический пиелонефрит

$X2$  – Задержка роста плода в анамнезе

$X3$  – Угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы

$X4$  – Хронический цервицит

С целью оценки полученной модели был проведен ROC-анализ с площадью под кривой 0,79 (ДИ 0,73-0,85). Оптимальный порог составил 0,50 с чувствительностью 73% и специфичностью 74% (рисунок 14).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 14. ROC-кривая для полученной предсказательной модели.

#### **4.1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови**

##### **4.1.1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода**

Внедрение исследований, основанных на применении ПЦР с целью количественного определения внеклеточной фетальной ДНК позволило сосредоточиться на клиническом применении данного маркера не только в качестве скринингового метода генетических патологий плода, но и в роли прогностического маркера осложнений беременности. Однако, в мировой литературе данные о значении вфДНК в прогнозировании и диагностике ЗРП противоречивы.

С целью количественного определения внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови в подгруппе IA ранней формы ЗРП, подгруппе IB поздней формы ЗРП и в группе контроля нами было проведено исследование концентрации гиперметилированной части промотора гена RASSF1A.

Принимая во внимание данные о том, что уровень вфДНК увеличивается со сроком беременности, пациентки были включены в исследование по методу подбора пар с учетом гестационного срока. Таким образом, медиана сроков в исследуемых группах была сопоставима, что позволило в дальнейшем оценить полученные результаты (таблица 2).

Концентрация вфДНК в зависимости от срока беременности, на котором был осуществлен забор биоматериала, при ранней и поздней формах ЗРП, а также в группе сравнения представлена на графике (рисунок 15).

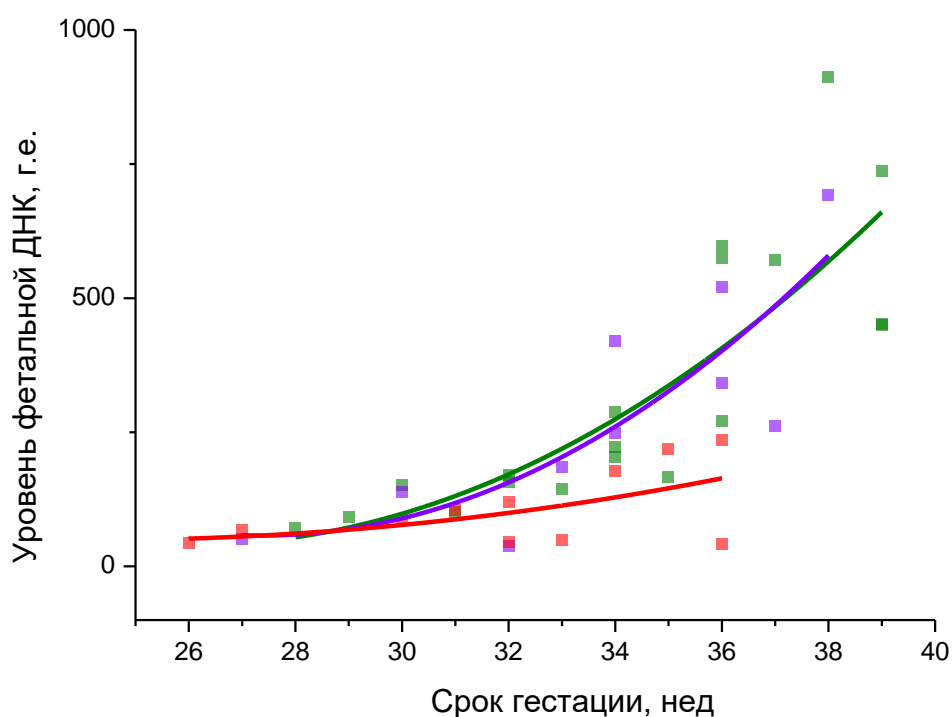


Рисунок 15. Концентрация внеклеточной фетальной ДНК при ранней, поздней формах ЗРП и в группе контроля.

Были получены данные, согласно которым уровень вфДНК в группе ранней формы ЗРП составил 89,03 (44,52; 178,32) ГЕ/мл и был статистически значимо ниже показателей в группе поздней формы ЗРП 244,14 (145,23; 422,47) ГЕ/мл и в группе сравнения 211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл ( $p < 0,001$ ). При

этом статически значимых различий между поздней формой ЗРП и группой сравнения получено не было ( $p > 0,05$ ). Результаты исследования представлены на рисунке 16.

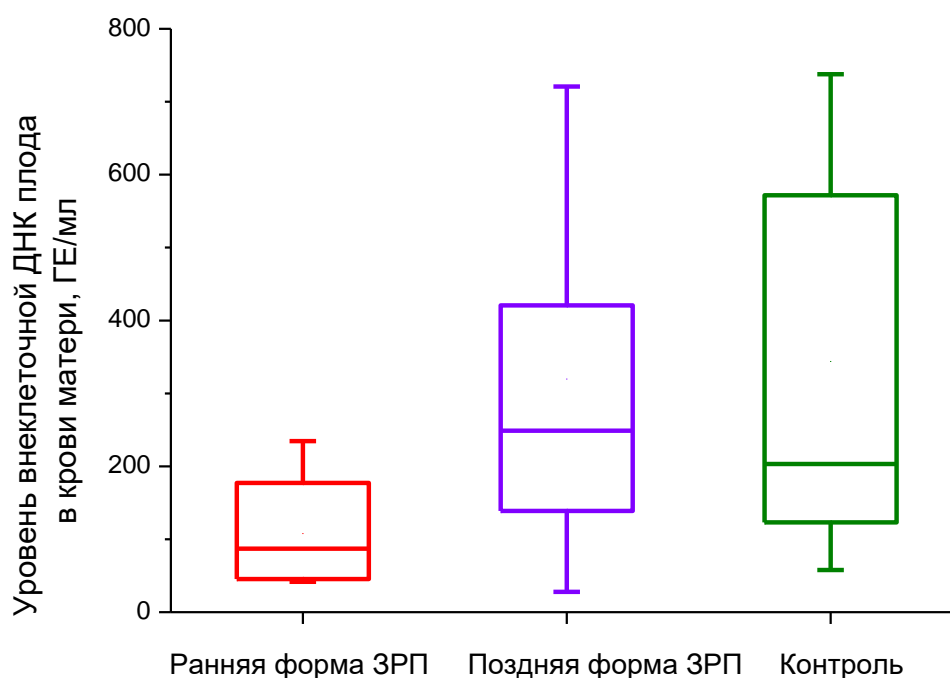


Рисунок 16. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в при ранней и поздней форме ЗРП.

Принимая во внимание данные мировой литературы о взаимосвязи между уровнем вфДНК и массой плаценты, а также полученные данные о статистически значимом снижении уровня вфДНК исключительно в группе ранней формы ЗРП, следующим этапом исследования было подтверждение взаимосвязи между уровнем внеклеточной фетальной ДНК и клиническими критериями с использованием непараметрического метода ранговой корреляции по Спирмену. В качестве порога значимости использовали значение  $p\text{-value} < 0,05$ . Данные представлены в таблице 10.

Масса плацент в группе ранней формы ЗРП составила 248 (228; 307) граммов, что было статистически значимо ниже данного показателя в группе поздней формы ЗРП 335 (305; 380,  $p < 0,05$ ) граммов и группе сравнения 432 (340; 471,  $p < 0,001$ ) грамма. Анализ установил прямую сильную корреляционную связь между уровнем вфДНК, массой плаценты ( $r=0,79$ ;  $p < 0,001$ ), массой ( $r=0,72$ ;  $p < 0,001$ ) и ростом ( $r=0,71$ ;  $p < 0,001$ ) новорожденного в группе ранней формы ЗРП. Сильная обратная корреляционная связь была получена с неонатальными исходами – с врожденной пневмонией ( $r=-0,73$ ;  $p=0,03$ ), ВЖК II степени ( $r=-0,74$ ;  $p=0,03$ ), НЭК ( $r=-0,72$ ;  $p=0,03$ ) и асфиксией тяжелой степени ( $r=-0,75$ ;  $p=0,03$ ).

Таблица 11. Оценка корреляционной связи между концентрацией вфДНК и клиничко-анамнестическими параметрами в группе ранней формы ЗРП.

Параметры		p-value	Коэффициент $r_s$
Концентрация вфДНК	Масса плаценты	<0,001	0,79
	Масса новорожденного	<0,001	0,72
	Рост новорожденного	<0,001	0,71
	Врожденная пневмония	0,03	-0,73
	ВЖК II степени тяжести	0,03	-0,74
	НЭК	0,03	-0,72
	Асфиксия тяжелой степени	0,03	-0,75

С целью оценки диагностической эффективности количественного определения вфДНК для ранней формы ЗРП был проведен ROC анализ, который продемонстрировал, что измерение концентрации вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении вфДНК 119,11 ГЕ/мл, позволяет с высокой чувствительностью (73%) и специфичностью (79%) ( $AUC=0.81$ , (95% ДИ 0,63-0,98)) диагностировать раннюю форму ЗРП и предсказывать вероятность развития таких осложнений раннего неонатального периода как врожденная пневмония, ВЖК II степени, НЭК и асфиксия тяжелой степени у новорожденных с ранней формой ЗРП (рисунок 16).

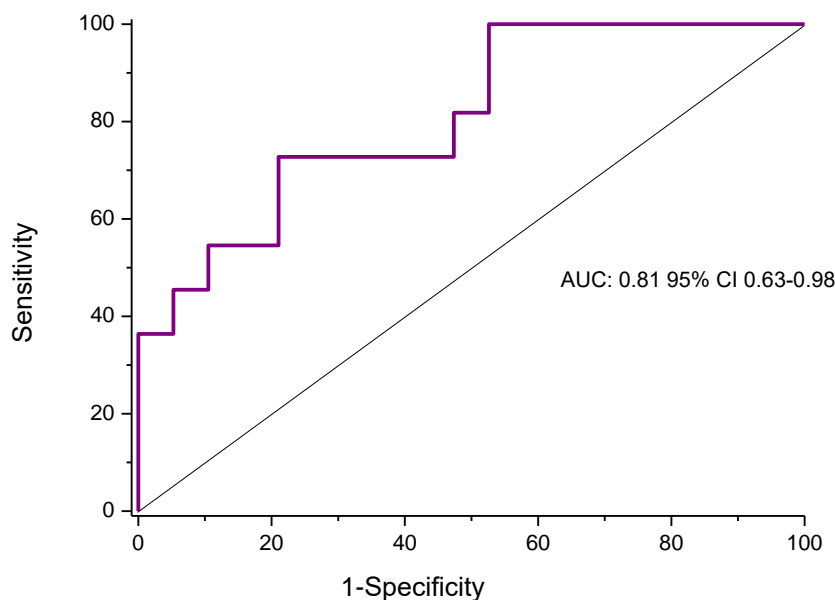


Рисунок 16. Оценка диагностической эффективности определения уровня вфДНК в плазме крови для выделения беременных женщин с ранней формой задержки роста плода.

Для того, чтобы расширить понимание механизмов, лежащих в основе полученных изменений следующим этапом исследования выступил иммунофлуоресцентный анализ плацент при ранней и поздней формах ЗРП, а также при физиологической беременности (рисунок 17).

Анализ плацент при ранней форме ЗРП показал преобладание обширных зон с увеличением количества трофобласта, но отсутствием нормальной архитектоники. Отмечались тесно расположенные по отношению друг к другу промежуточные незрелые ворсины и промежуточные зрелые ворсины с доминированием стромального компонента и гипоплазией капилляров. Избыточное отложение перивиллезного фибриноида способствовало формированию афункциональных зон и уменьшению объема межворсинчатого



пространства. В периваскулярных зонах была установлена мононуклеарная и нейтрофильная инфильтрация. Помимо этого, отмечались хаотичные склерозированные ворсины с увеличенным количеством стромальных клеток и единичными микрососудами. Описанные изменения гипоплазии дистальных отделов ворсин ассоциированы с неполной гестационной трансформацией спиральных артерий и являются проявлением материнской мальперфузии. (рисунок 17, А). Исследование плацент при поздней форме ЗРП показало сохранение дифференцировки ворсин. В зрелых ворсинах были выражены компенсаторно-приспособительные реакции. Повышение активности синцитиотрофобласта приводило к образованию крупных синцитиальных узлов, которые располагались на ножке и состояли из плотно расположенных ядер синцитиотрофобласт, а также увеличению объема капилляров. При этом были зафиксированы небольшие фокусы фибриноида, которые не приводили к снижению интервиллезного объема. Было отмечено небольшое количество промежуточных незрелых, промежуточных зрелых и хаотичных склерозированных ворсин (рисунок 17, Б). Плаценты в группе контроля характеризовались преобладанием терминальных и зрелых промежуточных ворсин, а также свободным от инкрустирующих депозитов фибриноида. Было отмечено, что доля терминального ворсинчатого эндотелия превосходила стромальный компонент (рисунок 17, В).

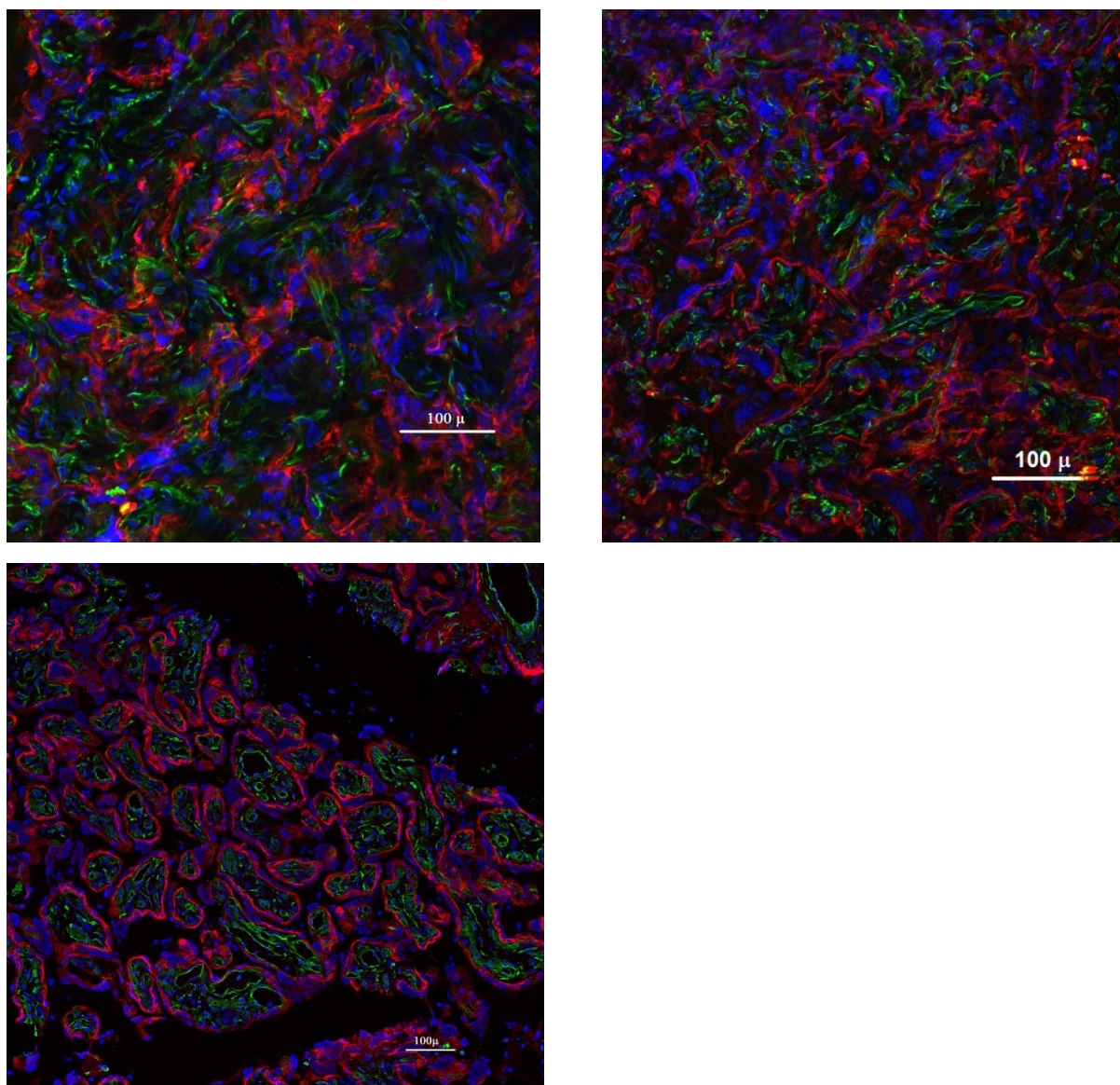


Рисунок 17. Иммунофлюоресцентный анализ плацент при ранней форме ЗРП (А), поздней форме ЗРП (Б), физиологической беременности (В).

Обозначения: красный – E-cadherin; синий – DAPI; зеленый – виментин

#### **4.1.2. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в материнской плазме при сочетании задержки роста плода и преэклампсии.**

Общеизвестно, что ЗРП и ПЭ, являясь плацента-ассоциированными осложнениями беременности, нередко сопутствуют друг другу. В связи с этим интерес представляло изучение уровня внеклеточной фетальной ДНК и оценка ее диагностической значимости при сочетании данных осложнений. Для этого в исследование согласно критериям включения и исключения,

были включены дополнительные группы беременных. Группу I составили пациентки с ЗРП и ПЭ (n=32), группу II (n=32) – сравнения – пациентки с физиологически протекающей беременностью. Все пациентки были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям. Группа пациенток, беременность которых осложнилась ПЭ и ЗРП, была разделена на две подгруппы: подгруппа IA (n=20) – беременные с нарушением фето-плацентарного кровотока по данным доплеромерии и подгруппа IB (n=12) – беременные с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока.

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).

Согласно полученным результатам в группе ЗРП и ПЭ было отмечено статистически значимо более высокое значение вфДНК, которое составило 2440 (1456; 3696) ГЕ/мл. При этом концентрация вфДНК в подгруппе IA с нарушением фето-плацентарного кровотока составила 2272,12 (1096,09; 4928,23) ГЕ/мл, а в подгруппе IB без доплерометрических нарушений – 2712,31 (1608, 25; 2800,17) ГЕ/мл. В группе сравнения была получена концентрация вфДНК равная 200,72 (112,63; 352,59,  $p < 0,01$ ) ГЕ/мл.

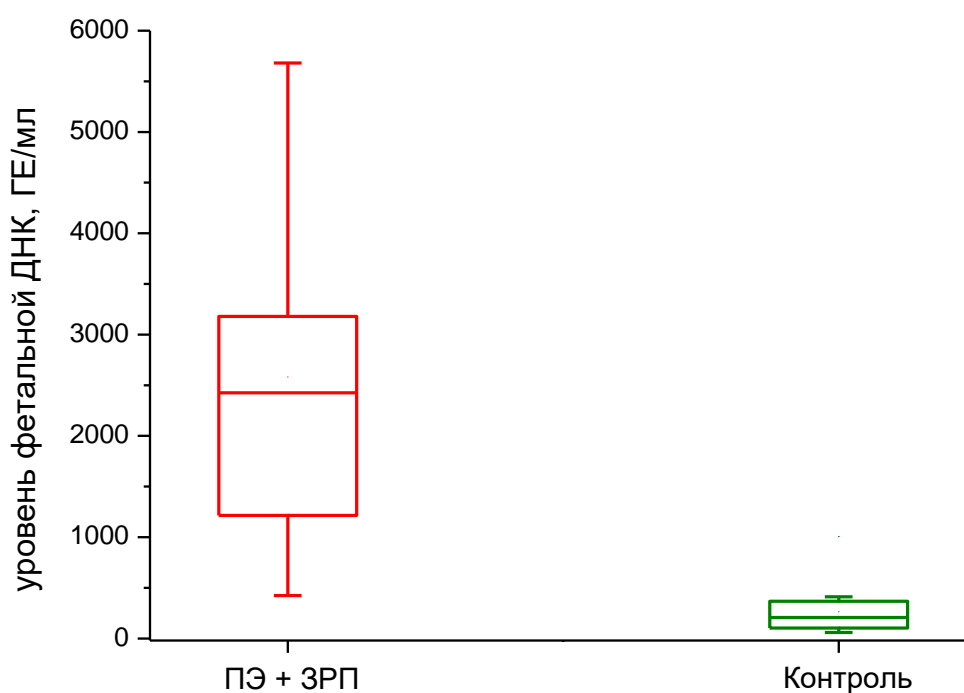


Рисунок 18. Исследование внеклеточной фетальной ДНК при задержке роста плода и преэклампсии.

Для оценки диагностической эффективности количественного определения вФДНК при ЗРП и ПЭ без нарушений фето-плацентарного кровотока был проведен ROC-анализ. Оценка площади под ROC-кривой составила 89.5, 95%, ДИ (70-100). При пороговом значении ДНК 1608,23 GE/мл, чувствительность составила 80%, специфичность 89%. (рисунок 19).

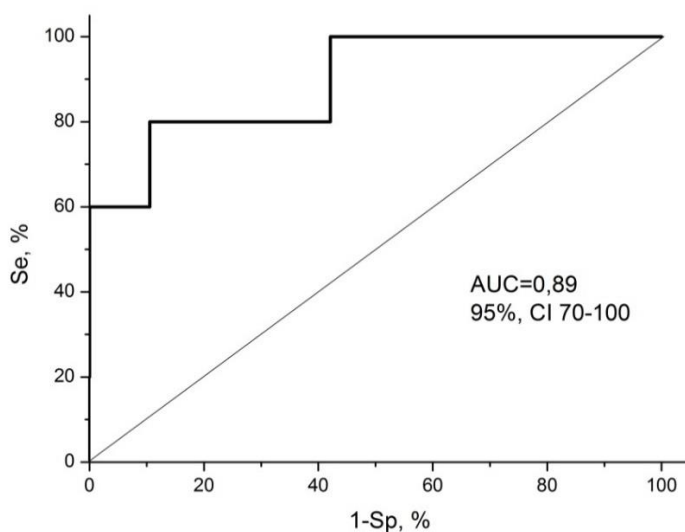


Рисунок 19. Оценка диагностической значимости определения концентрации вфДНК у беременных с ЗРП и ПЭ с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока.

Проведенный корреляционный анализ не выявил зависимости уровня вфДНК от массы плаценты при сочетании ЗРП и ПЭ, что послужило причиной для проведения гистологического исследования, целью которого было уточнение патогенетических звеньев плацентарных изменений при сочетанном развитии данных осложнений. Было проведено гистохимическое исследование плацент с применением терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) в плацентах при нормальной беременности (рисунок 20А) и сочетании ЗРП и ПЭ (рисунок 20Б). Применение в качестве меток виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей для идентификации мезенхимальных клеток, цитокератина-7 с целью определения клеток трофобласта, интеркалирующего красителя для окрашивания нуклеиновых кислот 4',6-диамиидно-2-фенилиндола (DAPI) и терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) для идентификации апоптоза, продемонстрировало выраженный апоптоз в плацентах при ПЭ и ЗРП по сравнению с группой контроля.



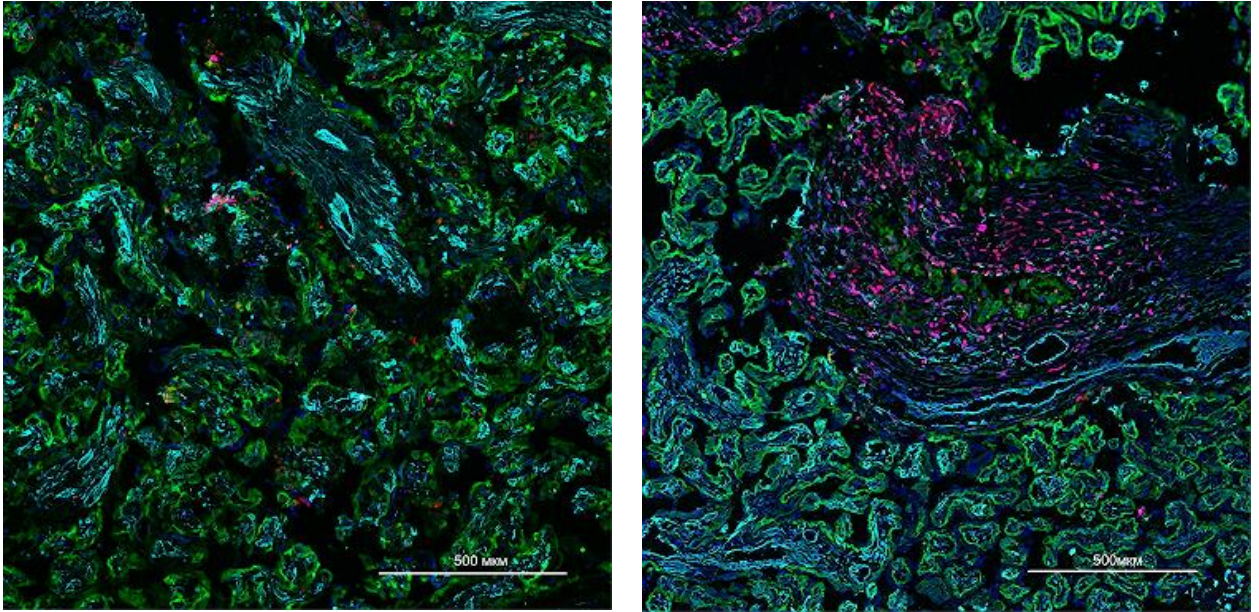


Рисунок 20А - исследование степени апоптоза в плаценте при нормальной беременности

Рисунок 20Б - исследование степени апоптоза в плаценте при ЗРП и ПЭ.

Обозначения: красный – TUNEL; синий – DAPI; зеленый – цитокератин-7; бирюзовый – виментин

Согласно полученным результатам в плацентах при физиологически протекающей беременности наблюдается слабовыраженный апоптоз клеток трофобласта. При сочетании ЗРП и ПЭ наблюдается значительное усиление апоптоза не только клеток трофобласта, но и стромы створчатых ворсин.

## 4.2 Исследование метилирования генов при задержке роста плода

### 4.2.1. Исследование метилирования генов в плаценте при задержке роста плода

Несмотря на проводимые фундаментальные исследования по изучению механизмов, лежащих в основе ЗРП, до сих пор недостижимым остается применение универсального прогностического и раннего диагностического маркера данного осложнения беременности. В последнее время внимание ученых направлено на изучение эпигенетических изменений, которые возникают в ответ на факторы окружающей среды и приводят к изменению

специфической деятельности клеток. Плацента как важнейший транзитный орган является уникальной основой для изучения взаимодействия внешних и генетических факторов, а также оценки их вклада в развитие осложнений беременности. Изучение эпигенетических изменений ДНК плаценты представляет большой интерес в связи с перспективностью разработки новых диагностических тестов на основании определения эпигенетических меток в других биологических субстратах. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов, осуществляющих контроль генной экспрессии, является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК.

На основании литературных данных, с целью исследования уровня метилирования, были отобраны гены с потенциальной ролью в патогенезе ЗРП – CDO 1, MMP2, СЕВРА, LEP, HLAG, VEGF, MEST, CDH1, TLR2, BMP 6, GNA12, DAPK3, DFNA 5, ICR (импринтинг контролирующая область) IGF2/H19.

Изучение метилирования генов в плаценте выявило статически значимые изменения в гене TLR2 и ICR (импринтинг контролирующей области) IGF2/H19. Было получено снижение относительного уровня метилирования гена TLR2 в группе ЗРП 0,26 (0,14; 0,30) по сравнению с группой сравнения 0,31 (0,26;0,34,  $p=0,01$ ) (рисунок 21).

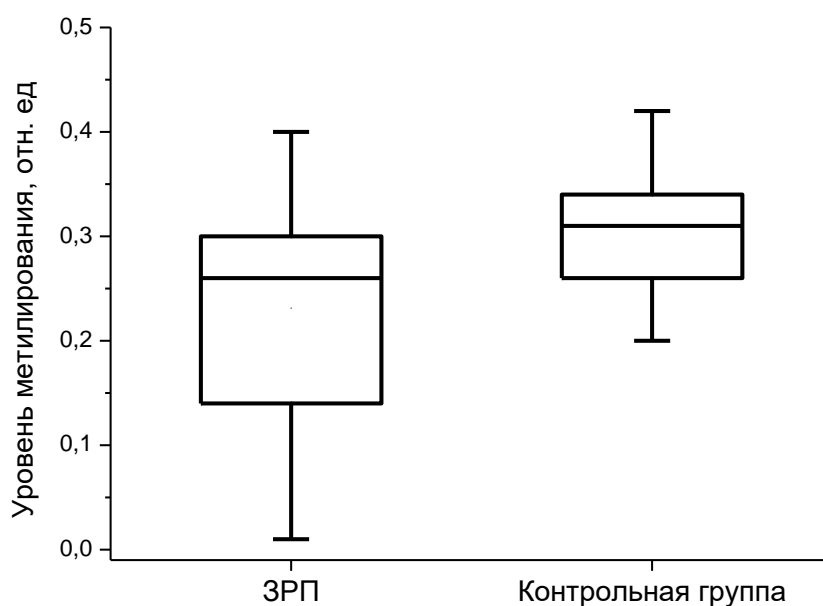


Рисунок 21. Относительный уровень метилирования гена TLR2 в плацентах.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 также показало статистически значимое снижение относительного уровня метилирования в плацентах с ЗРП 0,17 (0,06; 0,24) по сравнению с группой контроля 0,33 (0,30; 0,37,  $p < 0,001$ ) (рисунок 22).



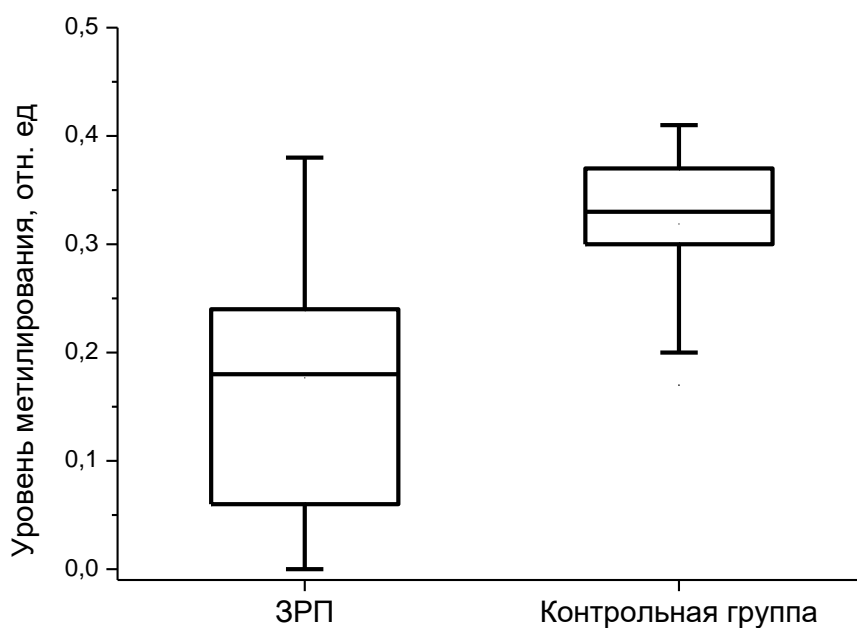


Рисунок 22. Относительный уровень метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19.

#### 4.2.2. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в плазме материнской крови при задержке роста плода

Изучение метилирования профиля генов в плаценте и выделение генов-кандидатов нашло дальнейшее продолжение в исследовании плазмы беременных женщин. Согласно полученным данным уровень метилирования гена TLR2 в плазме материнской крови в группе ранней формы ЗРП составил 0,01 (0,0; 0,45) и был статистически значимо ниже уровня метилирования в группе сравнения 0,43 (0,05;0,53,  $p=0,02$ ). Относительный уровень метилирования TLR2 в плазме женщин в группе поздней формы ЗРП составил 0,39 (0,0;0,55) и значимо не различался с группой сравнения 0,43 (0,05;0,53,  $p=0,87$ ) (рисунок 23).

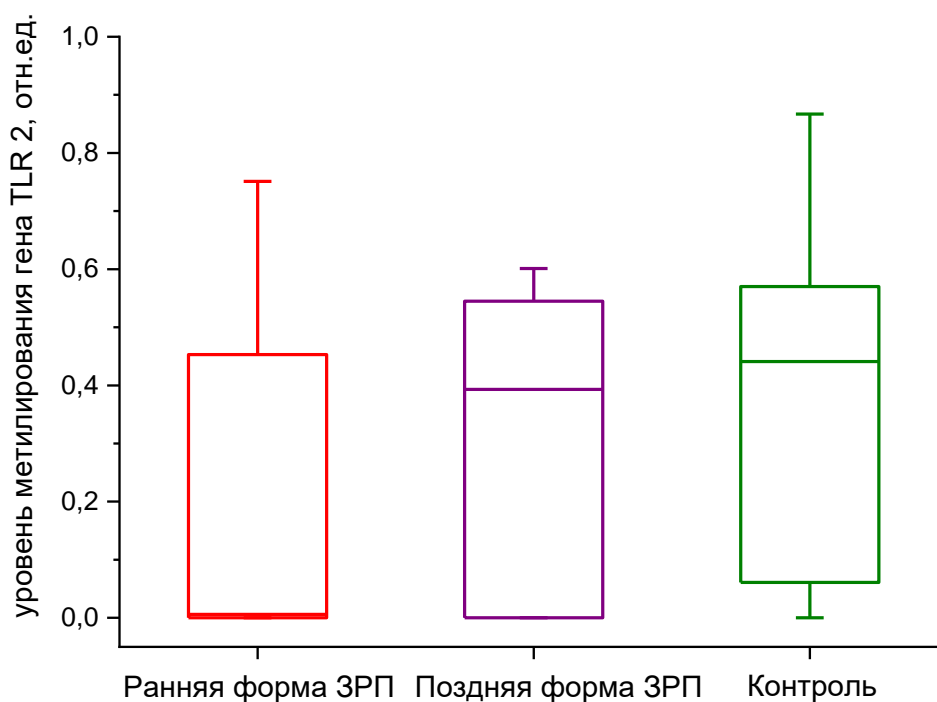


Рисунок 23. Относительный уровень метилирования гена TLR2 в плазме материнской крови в исследуемых группах.

Принимая во внимание полученные данные с целью определения значимости данного исследования в качестве диагностического теста при ранней форме ЗРП был проведен ROC-анализ, который охарактеризовал полученную модель как хорошую, и обосновал перспективность его использования для выявления групп беременных с ранней формой ЗРП с  $AUC=0,72$  (95% ДИ 0,56-0,88), При пороговом значении относительного уровня метилирования гена TLR2 0,012 чувствительность метода составила 88%, а специфичность 60 % (рисунок 24).

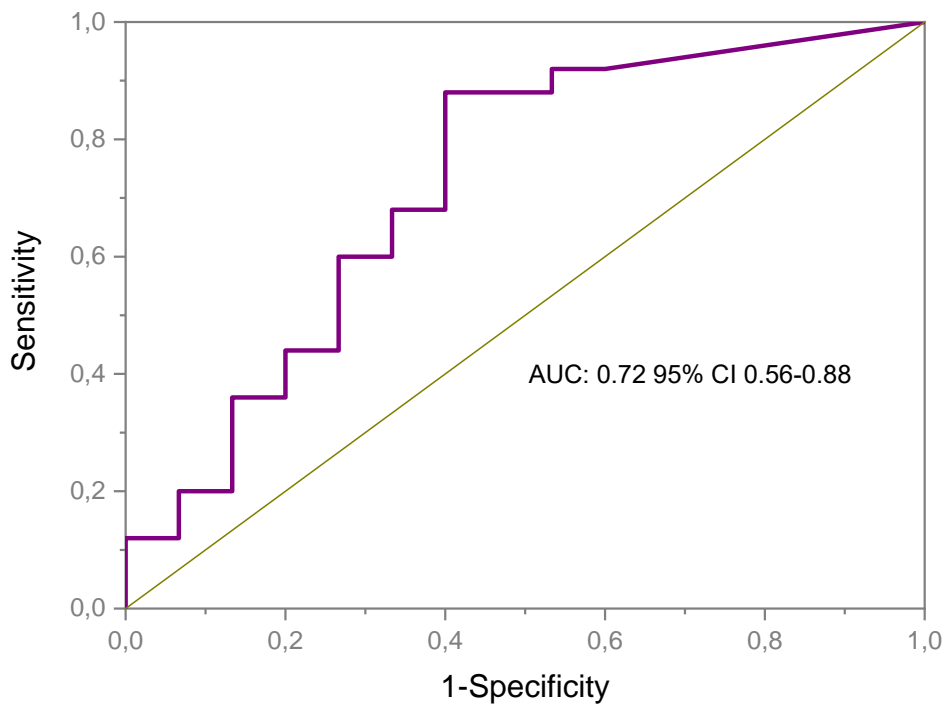


Рисунок 24. Анализ ROC-кривой уровня метилирования гена TLR2 для дифференциации групп беременных с ранней формой ЗРП.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 показало снижение относительного уровня метилирования в группе ранней форме ЗРП, которое составило 0,22 (0,18;0,32) и было статистически значимо ниже относительного уровня метилирования в группе сравнения 0,49 (0,44;0,65,  $p=0,03$ ). Измерение относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в группе поздней формы ЗРП не показало статистически значимых различий с группой сравнения и составило 0,48 (0,32,0,52,  $p = 0,53$ ). Полученные данные представлены графически на рисунке 25.

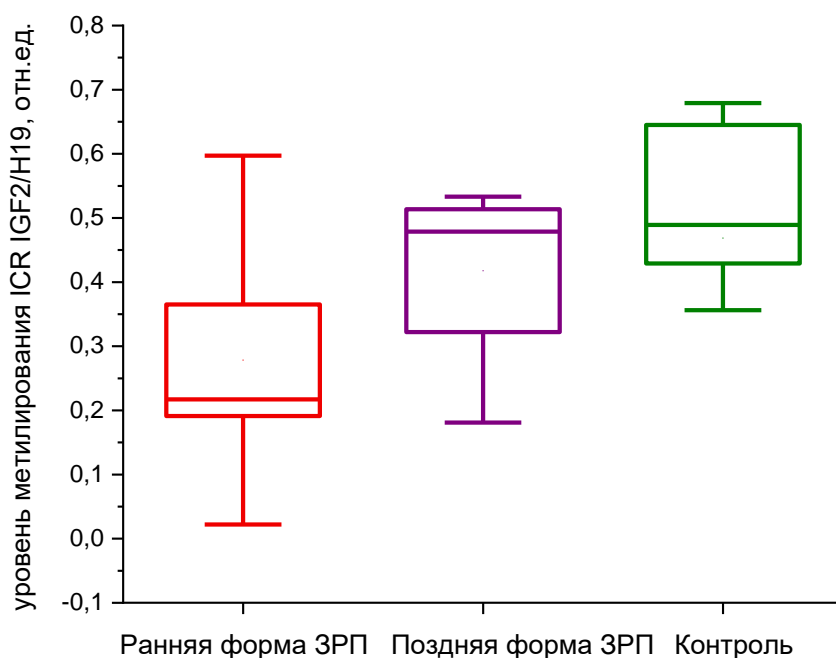


Рисунок 25. Относительный уровень метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови в исследуемых группах.

Для определения значимости определения относительного уровня импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови в качестве диагностического теста при ранней форме ЗРП был проведен ROC-анализ, который охарактеризовал полученную модель как хорошую, и обосновал перспективность его использования для выявления групп беременных с ранней формой ЗРП с  $AUC=0,79$  (95% ДИ 0,62-0,87). При пороговом значении относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 0,2 чувствительность метода составила 80%, специфичность 80 % (рисунок 26)

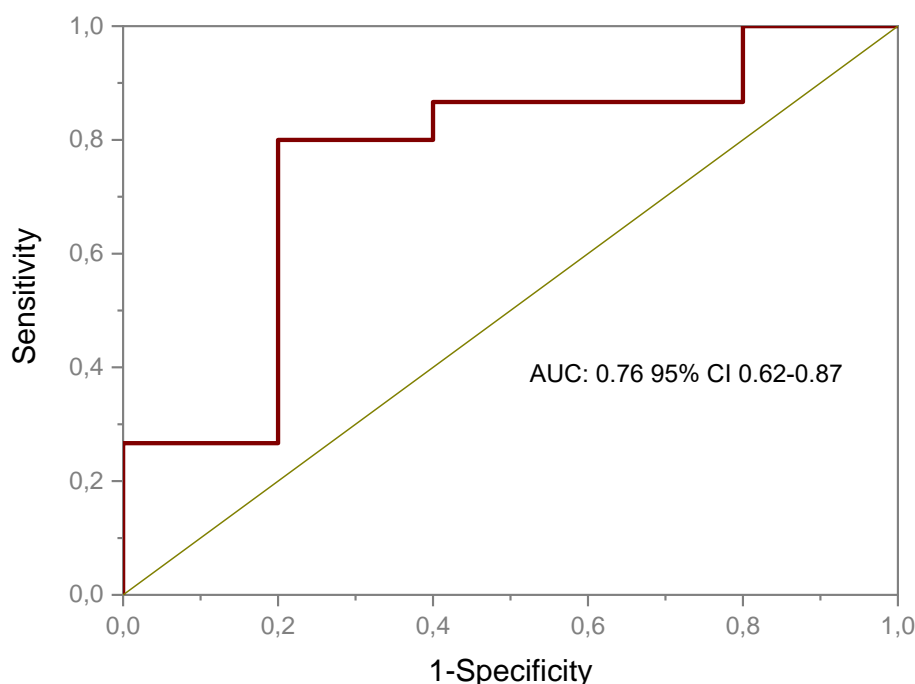


Рисунок 26. Анализ ROC-кривой уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 для дифференциации групп беременных с ранней формой ЗРП.

#### 4.2.3. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в пуповинной крови при задержке роста плода

С целью оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования импринтинг-контролирующей области IGF2/H19 в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования. Для проведения метилирования IGF2/H19 (11p15.5) был проанализирован шестой участок связывания ICR IGF2/H19 с регулятором генной транскрипции CTCF – фактором, связывающимся с последовательностью CCCTC.

Шестой участок связывания ICR IGF2/H19 представляет собой следующую последовательность: TcgGAAGTGGTcgcgcgGcgGTAGT, которая

состоит из 5 сайтов. В результате окончания последнего этапа пиросеквенирования – построения комплементарной цепи ДНК, была сформирована пириграмма (рисунок 27).

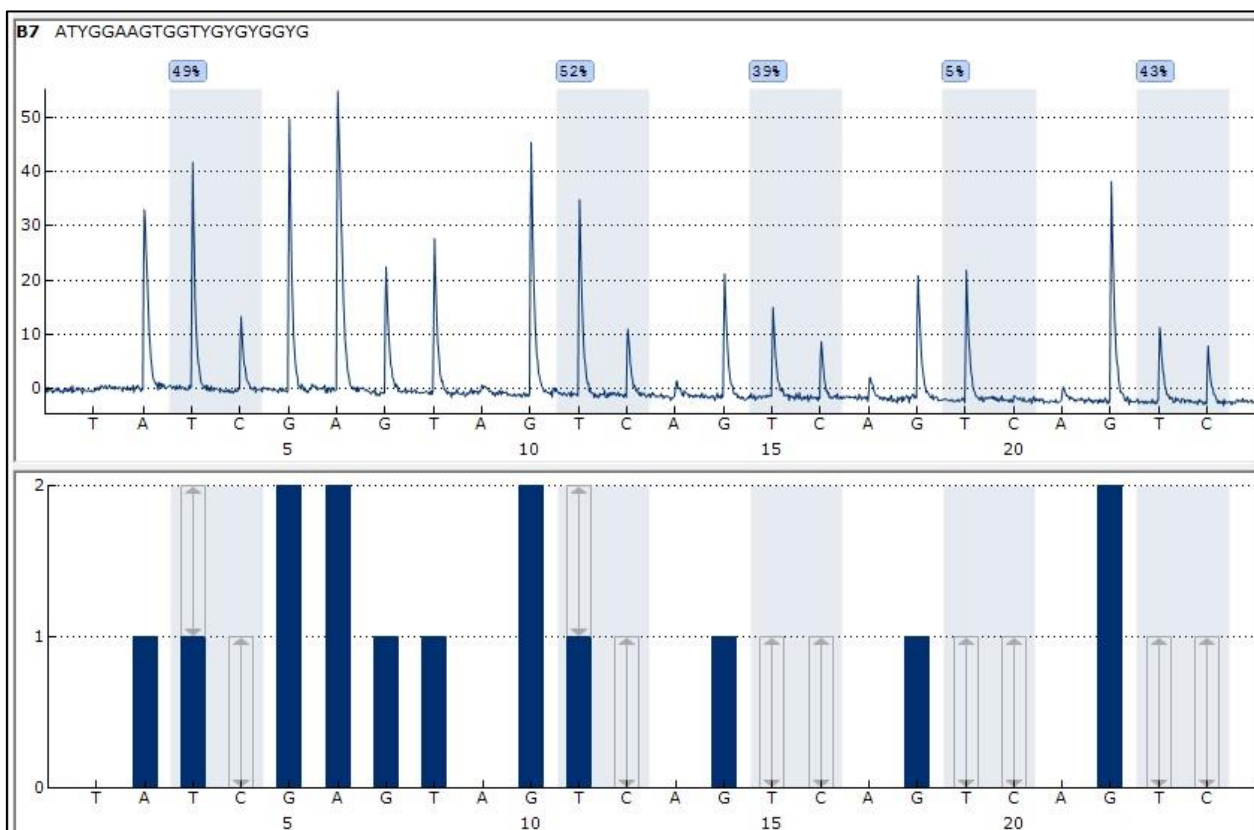


Рисунок 27. Пириграмма оценки метилирования ICR IGF2/H19. Выделены все CpG-сайты и показан уровень метилирования каждого в процентах.

Данные пириграммы позволили определить уровни метилирования каждого CpG-сайта (таблица 11). Были получены статистически значимые изменения уровня метилирования 2-ого CpG-сайта данной последовательности: TcgGAAGTGGTcgcgcgGcgGTAGT. Уровень метилирования данного сайта при ЗРП составил 42 (38,5;45) %, что было ниже значений, полученных в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5),  $p = 0,02$ ) (рисунок 28).

Таблица 11. Результаты уровня метилирования CpG-сайтов в шестом участке связывания ICR IGF2/H19

№ сайта	Задержка роста плода			Группа сравнения			
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	p-value
1	44	40.5	46	45	43	48	0,066
2	42	38.5	45	45.5	41.75	48.5	<b>0,017</b>
3	37	35.5	39	37.5	35	41	0,44
4	31	5.5	34.5	33.5	6.5	36.25	0,46
5	39	36.5	46.5	39	37	42.25	0,93

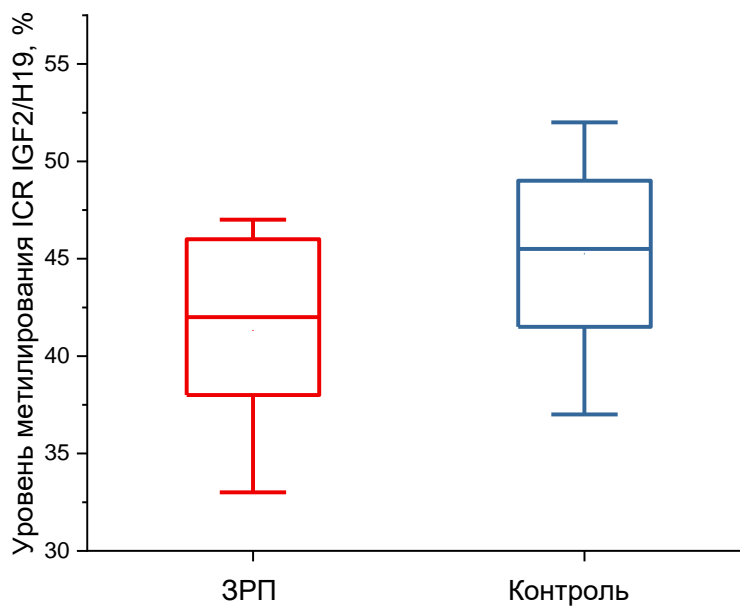


Рисунок 28. Определение уровня метилирования 2-ого сайта в шестом участке связывания ICR IGF2/H19 методом пиросеквенирования.

## ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Задержка роста плода (ЗРП), занимая важное место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности, остается одной из ведущих проблем акушерства и неонатологии [6, 7, 100, 110]. Данные о частоте данного осложнения беременности неоднородны. Так согласно нескольким источникам, частота ЗРП в России составляет от 5 до 18% [6, 8]. Важным фактом являются низкие показатели антенатальной диагностики ЗРП, которые составляют лишь 25 % от всех случаев [2, 100].

При этом отмечаются вариации частоты ЗРП в зависимости от популяций. Согласно эпидемиологическим данным ЗРП является более распространённой патологией в странах с ограниченными ресурсами. Так, если доля детей, рожденных маловесными к сроку гестации в развитых странах составляет 10 %, то в развивающихся странах, она уже достигает 20% [170, 207]. Исследовательская группа по эпидемиологии детского здоровья провела исследование, которое включило 14 когорт новорожденных с использованием данных Международного консорциума по росту плода и новорожденного в 21-ом веке (INTERGROWTH-21). Были получены данные, согласно которым доля маловесных к сроку гестации новорожденных составила 19,3 % живорождённых детей в странах с ограниченными ресурсами [170]. Стоит отметить, что в данном отчете доля маловесных к сроку гестации новорожденных в структуре неонатальной смерти составила 22 % [170].

Общеизвестным являются данные о взаимосвязи между низкой массой тела при рождении и риском развитию перинатальных осложнений. Высокий риск антенатальных осложнений, в том числе антенатальной гибели плода, объясняет ассоциацию ЗРП с ятрогенными преждевременными родами [19, 24, 96, 117]. Недоношенные маловесные к сроку гестации дети подвержены риску развития таких осложнений как некротический энтероколит, респираторный дистресс-синдром, бронхолегочная дисплазия и ретинопатия



недоношенных по сравнению с недоношенными детьми, имеющими нормальные массо-ростовые показатели [39, 42, 221].

Помимо высокой заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, дети с ЗРП входят в группу риска по развитию сердечно-сосудистых, метаболических заболеваний при достижении ими зрелого возраста [193]. Анализ эпидемиологическим данных, опубликованных в последние четыре десятилетия, продемонстрировал, что низкая масса тела при рождении была связана с повышенным риском смерти от ишемической болезни сердца [31, 32], гипертонической болезни [30, 236], инсульта [30], а также метаболических нарушений [122]. Эти данные согласуются с концепцией внутриутробного программирования Баркера, согласно которой недостаточное поступление питательных веществ, дефицит энергии и изменение механизмов регуляции влияют на метаболизм плода и осложняют не только перинатальный период, но и имеют отдаленные последствия [56, 184, 246].

До сих пор в мировой практике нет единого термина, обозначающего состояние плода, при котором наблюдается изменение массо-ростовых показателей по сравнению с нормативными для срока гестации [98, 100, 112]. В структуре детей, рожденных с массой тела меньше 10-ого перцентиля 50% составляют дети, низкая масса при рождении которых обусловлена конституциональными особенностями, в 40% случаев низкая масса при рождении является исходом плацентарной недостаточности, а в 10% случаев малый вес обусловлен различными плодовыми факторами. Крайне важным является тот факт, что масса плода более 10 перцентиля необязательно свидетельствует о нормальном росте плода, поэтому оценка состояния плода должна быть комплексной. В литературе и практике можно встретить термины «маловесный к сроку гестации» и «задержка роста плода». Данные термины не являются синонимичными. Маловесный к сроку гестации (Small for gestational age) – это плод с предполагаемой массой менее 10 перцентиля, обусловленной его конституциональными особенностями, а не задержкой

роста [21, 112]. Задержка роста плода (Intrauterine growth restriction/retardation) – это патологическое ограничение генетически запрограммированного роста плода, свидетельствующее о его страдании [266, 278]. При этом нет доказательств, что в случае малого к сроку гестации плода нет задержки его роста, даже в случае благоприятных перинатальных исходов.

Маловесный к сроку гестации плод характеризуется: умеренно малыми размерами, нормальными темпами роста в течение беременности, нормальным объемом околоплодных вод, нормальными показателями доплерометрии пупочной артерии и размерами, соответствующими таким характеристикам матери как рост, масса, раса/этническая принадлежность [74, 80, 131, 149].

В мировом сообществе стремление к поиску новых факторов риска не сопровождается непрерывным совершенствованием прогностических и диагностических моделей с их внедрением в клиническую практику. Так, например, Королевское общество акушеров-гинекологов выделяет различные факторы риска ЗРП, при этом используя ранжирование с целью демонстрации значения каждого из них в развитии данной патологии. К факторам риска, имеющим большее значение относят: материнский возраст старше 40 лет, курение более 11 сигарет в день [191, 256], употребление кокаина [107], ежедневные чрезмерные физические нагрузки [242], рождение маловесного ребенка в исходе предыдущей беременности [182], преждевременные роды в анамнезе [191], рождение матери маловесной к сроку гестации, хроническая артериальная гипертензия [15, 88, 167], диабет с развитием диабетической ангиопатии [171], почечная недостаточность [103], антифосфолипидный синдром [132]. К факторам риска относят такие осложнения беременности как угрожающий выкидыш с обильным кровотечением, развитие гестационной артериальной гипертензии тяжелой степени [167], преэклампсию [88], гиперэхогенный кишечник плода по

данным УЗИ [115], малую прибавку веса матерью, а также снижение ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы (РАРР-А) ниже 0,4 МоМ [85, 152, 224]. К малым факторам риска сообществом отнесены: курение менее 10 сигарет в день [191], наступление беременности в результате ВРТ, недостаточное потребление фруктов в предгравидарном периоде, наличие преэклампсии в исходе предыдущей беременности [88], интергравидарный период менее 6 и более 60 месяцев, развитие умеренной гестационной артериальной гипертензии, отслойку плаценты, потребление кофеина в дозировке, превышающей 300мг в день в третьем триместре беременности [47, 256].

Американское общество акушеров-гинекологов выделяет следующие материнские факторы риска: существовавший до беременности сахарный диабет [133, 177], почечная недостаточность [17], аутоиммунные заболевания, ишемическая болезнь сердца, гипертензия, АФС, употребление алкоголя, наркотиков, курение, применение препаратов с тератогенным эффектом, повторные роды, инфекционные заболевания [78, 82], генетические и хромосомные аномалии, врожденные пороки развития плода, патология плаценты и пуповины [90].

Данные факторы риска являются широко известными, однако, вклад каждого отдельного фактора риска оценивается разными авторами неодинаково. Анализ эпидемиологических и клинических данных показывает, что задержку роста плода следует относить скорее к полиэтиологическим заболеваниям, нежели к патологиям с моногенной природой. Таким образом, в каждом случае возможно уникальное сочетание материнских, плацентарных и плодовых факторов и оценка вклада каждого из них практически не представляется возможной.

Принимая во внимание многообразие данных о факторах риска развития ЗРП, особенностях течения беременности и родов, состоянии плода и новорожденных при ЗРП, на первом этапе исследования был проведен

подробный клинико-anamнестический анализ с целью выделения факторов риска задержки роста плода.

Анализ антропометрических данных не показал статистически значимых различий между группами. Анализ соматического анамнеза показал, что у пациенток основной группы риск тромбофилических состояний был выше по сравнению с пациентками контрольной группы, что было обусловлено дефектами в генах II и V факторов свертывания крови ( $n=6$ , 5,7%) ( $OR= 2,5$  (1,4-9,2)),  $p<0,01$ ) и наличием антифосфолипидного синдрома ( $n=5$ , 4,8 %) ( $OR= 2,1$  (1,2-18,4)),  $p<0,01$ ). В группе ЗРП у беременных была отмечена статистически значимая более высокая частота заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно хронической артериальной гипертензии по сравнению с группой контроля ( $n=12$ , 11,4%) ( $OR= 2,3$  (1,6-8,5)),  $p<0,01$ ). Полученные данные косвенно свидетельствуют о наличии эндотелиальной дисфункции, которая вносит вклад в неполное преобразование спиральных артерий [257].

Среди заболеваний мочевыводящей системы статистически значимым были различия в частоте хронического пиелонефрита ( $n=26$  (24,7%) ( $OR=4,6$  (1,8-18,3)),  $p<0,01$ ), что возможно связано с имеющимся дисбалансом ангиогенных и антиангиогенных факторов, который вносит существенный вклад в неполноценную инвазию ворсин трофобласта в спиральные артерии.

Среди гинекологических заболеваний было отмечено статически значимое увеличение хронического цервицита ( $n=14$ , 13,3%) ( $OR=1,6$  (0,8-16,3)),  $p<0,05$ ) в основной группе, что может быть сопровождаться дисбалансом факторов врожденного иммунитета. Согласно данным акушерского анамнеза в группе пациенток в ЗРП наблюдалось статистически значимое увеличение частоты неразвивающейся беременности ( $n=9$ , 14,0%) ( $OR=2,6$  (0,8-12,3)),  $p<0,05$ ), что косвенно может отражать роль гормональных и маточных факторов в формировании задержки роста плода. Как известно, состояния, сопровождающиеся склеротическими изменениями в эндометрии, препятствуют полноценной инвазии трофобласта в

спиральные артерии и выступают в качестве фактора риска развития ЗРП. Процесс децидуализации эндометрия и полноценной гестационной перестройки сосудистой системы матки является прогестеронозависимым, поэтому дефицит данного гормона может являться предрасполагающим фактором к развитию задержки роста плода.

На основании анализа клинико-анамнестических данных и данных об особенностях течения беременности, применив метод бинарной логистической регрессии, определена вероятность развития задержки роста плода по формуле:

$$P=1/(1+e^{-z}), \text{ где}$$

$e$  – основание натурального логарифма и имеет значение 2,71828182845904;

$$Z= 0,146 \cdot \text{Возраст} - 1,863 \cdot X1 - 2,243 \cdot X2 - 1,734 \cdot X3 - 1,895 \cdot X4 + 2,508$$

$X1$  – хронический пиелонефрит

$X2$  – Задержка роста плода в анамнезе

$X3$  – Угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы

$X4$  – Хронический цервицит

С целью оценки полученной модели был проведен ROC-анализ с площадью под кривой 0,79 (ДИ 0,73-0,85). Оптимальный порог составил 0,50 с чувствительностью 73% и специфичностью 74%.

Таким образом, проведенный анализ соматических данных, акушерских и перинатальных исходов подтвердил значимость анамнестических данных и их существенный вклад в развитие задержки роста плода. Однако, недостаточная предиктивная способность моделей, основанных на учете факторов риска, вызывает потребность в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях с целью поиска надежных неинвазивных маркеров, которые обладали бы достаточными прогностическими и диагностическими способностями в отношении задержки роста плода.

Рассматривая патофизиологические механизмы, лежащие в основе ЗРП, в первую очередь вызывает интерес изучение плаценты, которая

претерпевает каскад изменений, вызванных воздействием различных регуляторных механизмов. С ранних сроков физиологической беременности наблюдаются процессы ремоделирования и спирализации артерий, которые возникают до начала инвазии цитотрофобласта. При этом возникает снижение тонуса сосудистой стенки в ответ на активность клеток стромы эндометрия [70]. С увеличением срока беременности количество сосудов также увеличивается. Инвазия эндovasкулярного цитотрофобласта в спиральные артерии происходит с формированием цитотрофобластических пробок и замещением мышечно-эластических структур фибриноидом. При этом мышечные, эластические, коллагеновые волокна соединительной ткани, а также эндотелий сосудов подвергается лизису и полному замещению фибриноидной тканью. Фибриноид является специфическим белком, который синтезируется и секретируется эндovasкулярным цитотрофобластом [137]. В современной литературе описываются два механизма инвазии цитотрофобласта. Согласно мнению одних авторов, дилатация сосуда происходит равномерно благодаря постепенной инвазии клеток цитотрофобласта от устья артерий до их миомерального сегмента. Согласно второму мнению, инвазии цитотрофобласта, а соответственно и ремоделированию сосудов, предшествует миграция клеток эндovasкулярного цитотрофобласта по интерстицию в миомерий [148]. Тем не менее гестационная трансформация путем увеличения маточного кровотока обеспечивает увеличивающиеся энергетические потребности плода [258]. Ремоделирование эндометриальных сегментов спиральных артерий заканчивается в 13-18 недель гестации, то есть по завершении второй волны инвазии цитотрофобласта. Задержка формирования внутрисосудистых цитотрофобластических «пробок», а значит и неполноценная инвазия цитотрофобласта, приводит к усиленной скорости материнского кровотока и, как следствие, разрушению терминальных ворсин. При этом наблюдается неполное замещение фибриноидом спиральных артерий и сохранение соединительнотканного компонента.

В течение многих лет считалось, что основной задачей ремоделирования спиральных артерий является увеличение перфузии в межворсинчатом пространстве, которая в определенной степени действительно повышает маточный кровоток от 45 мл/мин вне беременности до 750 мл/мин во время беременности. Однако основным эффектом расширения терминальных отделов спиральных артерий является обеспечение относительного замедления скорости кровотока во избежание разрушения ворсинчатого дерева, часть которого находится в непосредственном контакте с кровотоком [257]. Неполное преобразование спиральных артерий приводит к усиленной скорости материнского кровотока, а, следовательно, разрушению терминальных ворсин и нарушению транспорта питательных веществ. В свою очередь разрушение терминальных ворсин запускает активацию каскада коагуляции, которая приводит к окклюзии сосудов и микроинфарктам плаценты. Данные процессы приводят к нарушению нормального баланса пролиферации, дифференциации и апоптоза клеток, увеличению отложений фибрина в ворсинах трофобласта и, как следствие, ограничению функционального слоя плаценты. При этом важным фактом является отсутствие компенсаторного усиления пролиферации клеток трофобласта [72, 130]. Таким образом, несмотря на кажущееся усиление апоптоза в плаценте, клетки цитотрофобласта не подвергаются компенсаторному увеличению их количества. Важным следствием данных процессов является уменьшение массы плаценты [249].

В настоящее время оценка прогностической и диагностической ценности вфДНК, как одного из наиболее изученных неинвазивных биомаркеров, остается важной задачей современного акушерства, что во многом связано с изменением ее уровня до клинической манифестации различных осложнений беременности. Результаты исследования концентрации гиперметилированной части промотора гена RASSF1A в плазме материнской крови показали снижение концентрации вфДНК в

группе ранней формы ЗРП до 89,03 (44,52; 178,32) ГЕ/мл, которое было статистически значимо ниже показателей в группе поздней формы ЗРП 2244,14 (145,23; 422, 47) ГЕ/мл и в группе сравнения 211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл ( $p < 0,001$ ). С целью оценки диагностической значимости был проведен ROC анализ, который показал, что определение уровня вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении вфДНК 119,11 ГЕ/мл позволяет диагностировать раннюю форму ЗРП с высокой чувствительностью (73%) и специфичностью (79%) ( $AUC=0.81$ ).

Несмотря на противоречивость исследований по оценке вфДНК при задержке роста плода, полученные результаты согласуются с последними работами в данной области. Так, в исследовании I. Krishna и соавт. был оценен уровень фетальной фракции ДНК при проведении неинвазивного пренатального теста и продемонстрирована ассоциация между ее низким уровнем (менее 4%) и малым весом при рождении [123]. D. Rolnik и соавт. расширили исследование уровня вфДНК в первом триместре беременности и, выполнив корреляционный анализ с применением одномерных и многомерных регрессий, показали, что снижение вфДНК ассоциировано с повышенным риском развития не только задержки роста плода, но и преэклампсии [238]. Исследования по оценке концентрации вфДНК во многом противоречивы [147, 164, 180, 267, 285], что может быть связано с различными методологическими подходами, в том числе отсутствием учета ранней и поздней форм задержки роста плода. Так, в проспективном исследовании D. Moga и соавт., целью которого было сравнение уровней фетальной фракции свободной внеклеточной ДНК в первом триместре у женщин, беременность которых в итоге осложнилась рождением маловесных к сроку гестации детей, с группой женщин с физиологическим течением беременности, был проведен углубленный анализ результатов. После учета срока манифестации задержки роста плода, данная группа была разделена на раннюю и позднюю формы, после чего были получены данные о статистически значимом снижении уровня вфДНК при ранней форме



задержки роста плода по сравнению с поздней формой и нормальной беременностью [200].

Дальнейший анализ установил прямую сильную корреляционную связь между уровнем вфДНК, массой ( $r=0,72$ ;  $p<0,001$ ) и ростом ( $r=0,71$ ;  $p<0,001$ ) новорожденных с ранней формой задержки роста плода. Подобные данные были получены в исследовании М.А. Clapp и соавт., целью которого было подтверждение взаимосвязи между уровнем вфДНК и массой новорожденного при рождении. Проведенное когортное ретроспективное исследование с применением многовариантных логистических регрессий показало, что уровень фетальной фракции внеклеточной свободной ДНК менее 5-ого перцентиля был связан с повышенным риском рождения маловесных к сроку гестации детей [123].

Концепция о плацентарном происхождении вфДНК является общепринятой и находит подтверждение во многих исследованиях [180, 267, 285]. Известно, что клетки трофобласта выделяют в материнский кровоток вфДНК в виде фрагментов из 160–170 пар оснований [147]. Кроме того, одним из описанных механизмов повышения уровня вфДНК является прямой перенос ДНК через плаценту или оболочки [115], что доказано путем выявления вфДНК в других биологических тканях матери [156, 178, 182]. Следуя положению о плацентарной природе вфДНК нами было проведено исследование связи между концентрацией вфДНК, морфометрическими показателями и гистологическими особенностями плаценты. Результаты исследования показали сильную корреляционную связь между концентрацией вфДНК и массой плаценты ( $r=0,79$ ;  $p<0,001$ ) и послужили одним из косвенных подтверждений плацентарного происхождения вфДНК. При иммунофлуоресцентном анализе плацент в группе ранней форме ЗРП было обнаружено выраженное нарушение архитектоники с превалированием обширных аваскулярных зон за счет межворсинчатого фибриноида, а также нарушением дифференцировки ворсин. В гипоплазированных ворсинах наряду с облитерацией сосудов отмечалось доминирование стромального

компонента. Описанные патологические изменения, характерные для мальперфузии, служат не только объяснением снижения обменных процессов между матерью и плодом, но и одним из предполагаемых механизмов снижения уровня вфДНК. Важно, что данные инволютивно-дистрофические процессы с преобладанием соединительной ткани и интервиллезного фибриноида могли стать одной из ведущих причин снижения уровня вфДНК при ранней форме задержки роста плода.

Таким образом, наше исследование подтверждает статус вфДНК как многообещающего неинвазивного маркера осложнений беременности. Полученные данные о высокой диагностической значимости вфДНК в отношении ранней форме задержки роста плода обосновывают перспективность применения вфДНК в качестве важного прогностического маркера задержки роста плода с первого триместра беременности.

Особый интерес представляет изучение сочетания таких патологических процессов, как ПЭ и ЗРП. Согласно результатам исследования Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), проведенным J. Villar и соавт., ПЭ в сочетании с ЗРП по сравнению с другими гипертензивными расстройствами ассоциирована с наиболее высоким риском длительного пребывания женщин в отделении интенсивной терапии, а также ранней неонатальной смерти в данной когорте [178]. Было показано, что неблагоприятные перинатальные исходы при сочетании ПЭ и ЗРП находятся в прямой зависимости от массы новорожденного и срока гестации. В другом исследовании E.V. Carter и соавт. проводилось сравнение исходов беременности у женщин с сочетанием тяжелой формы ПЭ и ЗРП с группой беременных с изолированной ЗРП. Анализ данных показал, что в группе с комбинацией патологических состояний отмечались худшие материнские и неонатальные исходы [114]. Согласно другому когортному ретроспективному исследованию, целью которого было изучение перинатальных исходов при ранней форме ЗРП, неонатальная смерть в данной группе новорожденных составила 8% и была связана с наличием и

тяжестью гипертензивных расстройств у матери [165]. Эти данные подтверждают важность изучения не только отдельных патологических состояний, но и их сочетания, которое часто вызывает более негативные перинатальные исходы.

Для оценки диагностической значимости вфДНК при сочетании ЗРП и ПЭ в исследование были включены дополнительные группы беременных. Основная группа I состояла из беременных с ЗРП и ПЭ (n=32), при этом подгруппа IA (n=20) включила беременных с нарушением фето-плацентарного кровотока по данным доплеромерии, а в подгруппу IB (n=12) вошли пациентки с нормальными доплерометрическими показателями. Группу сравнения II (n=32) составили пациентки с физиологически протекающей беременностью. Согласно полученным результатам в группе ЗРП и ПЭ было отмечено статистически значимо более высокое значение вфДНК, которое составило 2440 (1456; 3696) ГЕ/мл. В группе сравнения концентрация вфДНК составила 200,72 (112,63; 352,59,  $p < 0,01$ ) ГЕ/мл.

Полученные результаты не противоречат данным других исследователей. M.S. Alberty и соавт. провели исследование уровня вфДНК при таких плацента-ассоциированных осложнениях беременности, как ПЭ и ЗРП, и показали значительное повышение уровня данного маркера при этих патологиях [98]. В работе Kwak, D.W. и соавт. проводилось исследование с целью выяснения роли вфДНК в качестве предиктора патологических состояний беременности. Были получены данные о повышении уровня вфДНК в группе женщин, беременность которых впоследствии осложнилась ПЭ, а также сочетанием ПЭ и ЗРП, что также согласуется с нашими данными [86].

Как известно, доплерометрическое исследование маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотоков играет важную роль не только в диагностике ранней и поздней форм ЗРП, но и прогнозе перинатальных исходов [125, 165]. Несмотря на то, что доплерометрия

является одним из важнейших показателей состояния плода, существует значительная методологическая неоднородность референсных значений показателей фето-плацентарного кровотока не только в отдельных исследованиях, но и по данным крупных перинатальных центров [6, 7, 8]. Отсутствие в мировой практике общепринятых нормальных диапазонов доплерометрических показателей оказывает существенное влияние на эффективность клинических протоколов по ведению беременных с ЗРП [201]. Решением данной проблемы могут быть новые исследования, направленные на усреднение данных показателей с клинической оценкой не только их значимости в диагностике ЗРП, но и их роли в улучшении перинатальных исходов. Поэтому в настоящее время поиск новых неинвазивных маркеров, которые наряду с такими инструментальными исследованиям как доплерометрия способствовали бы улучшению перинатальных исходов, не теряет актуальности. Для уточнения роли вфДНК в улучшение антенатальной диагностики была проведена оценка ее уровня при ПЭ и ЗРП в зависимости от доплерометрических показателей. Концентрация вфДНК при наличии доплерометрических нарушений составила 2272,12 (1096,09; 4928,23) ГЕ/мл, а при их отсутствии – 2712,31 (1608, 25; 2800,17) ГЕ/мл. С целью оценки диагностической значимости определения вфДНК при сочетании ЗРП и ПЭ с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока был проведен ROC-анализ, который показал, что количественное определение вфДНК при пороговом значении 1608,23 ГЕ/мл с высокой чувствительностью (80%) и специфичностью (89%) (AUC=0.89) позволяет диагностировать ЗРП при ее сочетании с ПЭ даже при отсутствии доплерометрических нарушений.

Учитывая непосредственное влияние плацентарных нарушений на уровни вфДНК, были изучены плаценты после беременностей, осложненных сочетанием ЗРП и ПЭ, и проведено их сравнение с плацентами в исходе нормальных беременностей. Гистохимическое исследование с применением терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) показало в

группе ЗРП и ПЭ выраженный апоптоз не только клеток трофобласта ворсин всех генераций, но также стромы стволовых ворсин. При физиологической беременности наблюдался незначительный апоптоз лишь клеток трофобласта зрелых ворсин. Усиление апоптоза в группе с сочетанием ЗРП и ПЭ объясняет значительное повышение концентрации вфДНК по сравнению с физиологической беременностью. Полученные данные согласуются с другими работами, которые указывают на апоптоз как один из источников вфДНК в материнском кровотоке. Определенный вклад в повышение уровня вфДНК также может вносить снижение его элиминации, которое связано с характерным для ПЭ снижением почечного клиренса. Другим источником вфДНК могут служить некротические процессы в трофобласте.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали хорошую диагностическую значимость вфДНК не только в отношении ранней формы ЗРП, но и при сочетании ЗРП и ПЭ. Было показано, что повышение уровня вфДНК при сочетании ЗРП и ПЭ ассоциировано с усилением апоптоза в плаценте и позволяет диагностировать ЗРП даже при нормальных доплерометрических показателях, что играет важную роль не только в совершенствовании диагностики, но и улучшении перинатальных исходов.

Существуют различные процессы, которые могут вносить существенный вклад в регуляцию патогенетических механизмов и, тем самым, снижать прогностическую и диагностическую значимость маркеров. Одним из вовлеченных в эти процессы механизмов является эпигенетическая регуляция, которая сосредоточена на исследовании экспрессии генов за пределами того, что закодировано в последовательности ДНК. Понимание эпигенетических механизмов может сыграть роль в расширении знаний о патологиях, а в будущем, возможно, и разработке новых методов терапии.

Эпигенетические процессы в плаценте сильно отличаются от других тканей, что связано с ее уникальной ролью в обеспечении внутриутробного роста плода. В настоящее время исследования в области фетального

программирования сосредоточены на выявлении эпигенетических процессов, возникающих в ответ на внешние факторы и вызывающих запуск патогенетических механизмов. Понимание изменений эпигенома находится на стыке между генетическими и внешними факторами. Согласно данным литературы существует взаимосвязь между нарушением регуляции импринтированных генов и плацентарной недостаточностью. Исследование метилирования ДНК, как одного из эпигенетических механизмов, может объяснить некоторые аспекты патогенеза осложнений беременности и стать основой для дальнейших исследований в других биологических тканях.

С целью исследования уровня метилирования в плаценте был произведен отбор генов с потенциальной ролью в патогенезе задержки роста плода – CDO 1, MMP2, СЕВРА, LEP, HLAG, VEGF, MEST, CDH1, TLR2, BMP 6, GNA12, DAPK3, DFNA 5, ICR (импринтинг контролирующая область) IGF2/H19. Данные гены участвуют в поддержании важнейших для внутриутробного роста процессов. Их функции заключаются в регуляции апоптоза, метаболических процессов, иммунных механизмов, жировом обмене, вакулогенезе и ангиогенезе, клеточной адгезии.

Изучение метилирования данного профиля генов в плаценте с помощью с помощью анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) выявило статически значимые изменения в гене TLR2 и ICR (импринтинг контролирующей области) IGF2/H19. В результате исследования было получено снижение относительного уровня метилирования гена TLR2 в группе задержки роста плода до 0,26 (0,14; 0,30) по сравнению с группой сравнения 0,31 (0,26; 0,34),  $p=0,01$ ) и снижение метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 до 0,17 (0,06; 0,24) в группе задержки роста плода по сравнению с группой контроля 0,33 (0,30; 0,37),  $p<0,001$ ).

На следующем этапе было проведено исследование метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови. Было обнаружено, что в группе ранней формы задержки

роста плода уровень метилирования гена TLR 2 составил 0,01 (0,0; 0,45) и был статистически значимо ниже, чем в группе сравнения 0,43 (0,05;0,53),  $p=0,02$ ). При пороговом значении относительного уровня метилирования гена TLR2 0,012 чувствительность метода составила 88%, а специфичность 60 % (AUC=0,72 (95% ДИ 0,56-0,88)).

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 показало снижение относительного уровня метилирования в группе ранней форме задержки роста плода до 0,22 (0,18;0,32), в то время как в группе сравнения он составил 0,49 (0,44;0,65), ( $p=0,03$ ). ROC-анализ показал, что при пороговом значении относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 0,2, чувствительность метода составила 80%, специфичность 80 %.

Измерение относительного уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 при поздней форме задержки роста плода не показало статистически значимых различий по сравнению с ранней формой и физиологической беременностью.

TLR2 – белок из класса толл-подобных рецепторов, который играет ключевую роль во врожденном иммунитете и в патогенезе апоптоза, индуцированного пептидогликаном бактерий. Он определяется в плаценте с ранних сроков беременности и увеличивается в присутствии инфекционных агентов [10, 11]. V.M. Abrahams и соавт. показали, что клетки трофобласта, экспрессирующие TLR2, подвергаются апоптозу после воздействия бактериального пептидогликана и липотейхоевых кислот. В свою очередь активация TLR2 приводит к индукции апоптоза посредством Fas-ассоциированного белка с доменом смерти, инактивации X-сцепленного ингибитора апоптоза и активации каспаз-3,8,9 [12]. Интересно отметить, что активация другого члена семейства толл-подобных рецепторов, TLR4, стимулирует выработку провоспалительных цитокинов клетками трофобласта, что указывает на специфичность проапоптотического эффекта для TLR2. Данные результаты об участии TLR2 в регуляции апоптоза

подтвердились позднее в других исследованиях. Снижение уровня метилирования гена TLR2 может приводить к усилению экспрессии TLR2, и, как следствие, повышенному апоптозу в плаценте, играющему важную роль в патогенезе задержки роста плода. Как известно, нормальное развитие плаценты происходит при обеспечении баланса между процессами пролиферации и апоптоза клеток трофобласта [85, 126]. Так как TLR2 в значительной мере экспрессируется клетками ворсин хориона (клетки Хофбауэра) и фибробластами в плаценте на доношенном сроке гестации, то увеличение экспрессии TLR 2 возможно приводит к доминированию процессов апоптоза и нарушению процессов формирования плаценты.

Геномный импринтинг как один из эпигенетических процессов выражается экспрессией одного из двух аллельных генов, расположенных на отцовской или материнской хромосоме. Молекулярной основой такой моноаллельной экспрессии генов является метилирование регуляторных областей. Одним из наиболее изученных механизмов, лежащих в основе фетального программирования, является метилирование локуса IGF2 / H19. Ген IGF2 и соседняя некодирующая РНК H19 располагаются на коротком плече хромосомы 11. Данный кластер регулируется импринтинг-контролирующей областью (ICR), который содержит несколько сайтов связывания для инсуляторного белка CTCF [31]. Отсутствие метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 на материнской аллели позволяет связывать CTCF, блокируя транскрипцию IGF2 и усиливая экспрессию H19. Наоборот, метилирование импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2 / H19 на отцовской аллели активирует транскрипцию IGF2 и снижает экспрессию H19. Полученные результаты о снижении уровня метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 при ранней форме задержки роста плода могут быть причиной соответствующего снижения экспрессии IGF2. За последние десятилетия были открыты многие биологические эффекты, которыми обладает IGF-1: анаболическая [268], пролиферативная [33], противовоспалительная [36], антиоксидантная [156],



антифиброгенная [106]. В связи с наличием нескольких физиологических ролей, активность IGF-1 должна строго контролироваться белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста. Эти белки имеют высокое сродство к IGF-1 и были идентифицированы, клонированы и секвенированы в начале 1990-х годов благодаря разработке методов вестерн-блоттинга. Белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста, имеют первичную структуру, состоящую из трех разных доменов: консервативный N-концевой домен, высоко вариабельный средний регион и консервативный C-концевой домен [156]. Эти белки продуцируются различными биологическими тканями и могут быть обнаружены в таких биологических средах как фолликулярная жидкость, амниотическая жидкость, стекловидное тело, лимфа, плазма, семенная жидкость, спинномозговая жидкость и желудочно-кишечный секрет [186]. Данные белки выполняют функцию белков-носителей и определяют физиологические концентрации IGF, путем регуляции его транспорта и распределения в тканях.

IGF-1 важную роль во внутриутробном росте, так как необходим для нормального роста и дифференцировки клеток плаценты и плода. Примерно 75% циркулирующего IGF-1 вырабатывается печенью [26], однако, каждая ткань способна секретировать IGF-1 для аутокринных и паракринных целей. В работе оси «соматотропный гормон – инсулиноподобный фактор роста 1», секреция IGF-1 стимулируется соматотропным гормоном (GH), а тот в свою очередь находится в прямой зависимости от уровней либерина и статина [63]. Инсулин также является важным фактором метаболизма плода, поскольку он стимулирует выработку глюкозы и регулирует и обмен аминокислот, необходимую для роста тканей. Дефицит инсулина в матке может привести к развитию ЗРП [36]. IGF-1 и IGF-2 регулируют клеточный цикл, пролиферацию и дифференцировку клеток. Оба гормона контролируют транспортную способность плаценты и опосредуют стимулирующее действие инсулина и гормонов щитовидной железы [36]. В пренатальном периоде различия между GH и IGF-1 четко

показаны. Во время беременности выработка IGF-1 стимулируется соматотропным гормоном плаценты. Согласно исследованиям, нечувствительность к соматотропному гормону, как у людей, так и у животных вызывает лишь незначительную задержку роста [19], тогда как дефицит IGF-1 во внутриутробном периоде приводит к тяжелой задержке роста [59]. Интересным представляются данные экспериментальных исследований на животных, согласно которым у животных с дефицитом IGF-1 были отмечены неврологические нарушения, которые также наблюдались у одного пациента с дефектом в гене IGF-1 [23]. Эти данные свидетельствуют о том, что IGF-1 необходим для нормального развития мозга во внутриутробном периоде [24, 70]. Плацента, посредством производства ряда гормонов и факторов роста играет одну из главенствующих ролей в регуляции роста плода. IGF-1 экспрессируется в клетках синцитиотрофобласта на протяжении всей беременности и участвует в процессах стероидогенеза, транспорта глюкозы и аминокислот, росте и дифференцировке клеток [122]. Эти процессы составляют основу главной функции IGF-1, которая заключается в регуляции роста плаценты и плода. Экспрессия IGF-2 отмечается в клетках трофобласта, особенно в первом триместре беременности, что объясняет ключевую роль IGF-2 в регуляции процессов инвазии вневорсинчатого трофобласта в спиральные артерии, и, соответственно, в развитии плаценты [186].

С ранних сроков гестации IGF 1 и 2, взаимодействуя с рецепторами инсулиноподобного фактора роста 1, 2 и инсулина (IGF-1R, IGF-2R и InsR), регулируют процессы формирования плаценты и роста плода. На этапе внутриутробного развития преобладает IGF-2, однако, было отмечено, что делеция любого гена IGF приводит к ограничению роста плода [28]. Несмотря на разные функции IGF 1 и 2 находятся в тесной взаимосвязи друг с другом. IGF-1 влияет на рост плода, участвуя в процессах транспорта питательных веществ к нему, в то время как IGF-2 регулирует процессы пролиферации и дифференцировки в плаценте [240]. IGF 1 и 2 усиливают

усвояемость глюкозы и аминокислот в клетках трофобласта [252]. Таким образом, можно установить, что низкие уровни IGF могут нарушать транспорт кислорода и питательных веществ через плаценту, вызывая аномальный рост плаценты и окружающую среду, что приводит к аномальному росту и развитию плода. Следовательно, ЗРП можно рассматривать как состояние дефицита инсулиноподобных факторов роста.

Полученные результаты согласуются с результатами других исследований. D.K. Bourque и соавт. провели анализ уровня метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2 / H19 и показали снижение ее уровня при задержке роста плода [33]. В работе O. Koukoura и соавт., обнаружив потерю импринтинга IGF2 в плацентах при задержке роста плода, получили аналогичные результаты [34]. Подобные результаты снижения уровня экспрессии IGF2 в плацентах при задержке роста плода наблюдали и других исследованиях.

В исследовании J. St-Pierre и соавт. была обнаружена отрицательная корреляция между уровнем метилирования IGF2 и массой новорожденных, что послужило основой для следующего этапа исследования [268]. С целью оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования импринтинг-контролирующей области IGF2/H19 в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования. Были получены статистически значимые изменения уровня метилирования 2-ого CpG-сайта, который составил 42 (38,5;45) %, что было ниже значений, полученных в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5),  $p = 0,02$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что развитие эпигенетических механизмов регуляции начинается на этапе внутриутробного развития и продолжает свою реализации уже в организме новорожденного. Снижение уровня метилирования данного сайта в импринтинг-контролирующей области IGF2/H19 приводит к снижению концентрации циркулирующего IGF2 и, соответственно, торможению регулируемых IGF2 многочисленных

метаболических путей. IGF2 путем регуляции пролиферации и апоптоза клеток играет одну из центральных ролей в контроле роста [39]. По-видимому, критическим важным периодом действия IGF2 является антенатальный, поскольку согласно экспериментальным исследованиям на животных, при выраженном ограничении роста плода наблюдается существенный дефицит IGF2 [248, 268]. Помимо прочего IGF2 регулирует уже после рождения процессы роста головного мозга, а позднее жировой обмен [181]. Так, согласно результатам исследования низкие значения циркулирующего IGF2 ассоциированы с повышенным риском ожирения [248]. Таким образом, полученные результаты согласуются с многочисленными ретроспективными исследованиями, согласно которым дети, рожденные с ограничением внутриутробного роста, входят в группу риска по развитию кардиометаболических заболеваний в зрелом возрасте [29 – 32].

## Выводы

1. К факторам риска задержки роста плода относятся: наследственные тромбофилии высокого риска (OR=2,5 (1,4-9,2)), антифосфолипидный синдром (OR=2,1 (1,2-18,4)), хроническая артериальная гипертензия (OR=2,3 (1,6-8,5)), пиелонефрит (OR=4,6 (1,8-18,3)) и цервицит (OR=1,6 (0,8-16,3)), неразвивающаяся беременность (OR=2,6 (0,8-12,3)) и задержка роста плода в анамнезе (OR=2,5 (1,2-13,4)), а также угроза прерывания с образованием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности (OR=2,1 (0,6-4,2)) ( $p<0,05$ ).

2. Разработанная модель, включающая выявленные факторы риска, обладает прогностической ценностью и позволяет определить вероятность формирования задержки роста плода с чувствительностью 82,8% и специфичностью 67,3%.

3. Задержка роста плода ассоциирована с высокой частотой перинатальных осложнений в виде респираторного дистресс-синдрома (OR=5,3 (0,5-18,2)), врожденной пневмонии (OR=3,6 (1,9-10,1)), синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (OR=2,6 (1,8-11,3)), внутрижелудочковых кровоизлияний (OR=1,6 (0,8-9,6)), некротизирующего энтероколита (OR=6,1 (1,9-16,3)), бронхолегочной дисплазии (OR=5,3 (0,5-18,2)) ( $p<0,05$ ).

4. Задержка роста плода сопровождается статистически значимым снижением, а при сочетании с преэклампсией – повышением концентрации внеклеточной фетальной ДНК, что коррелирует со степенью выраженности апоптоза в плаценте и свидетельствует о различном генезе формирования данных осложнений беременности.

5. При ранней форме задержки роста плода установлена прямая корреляционная связь между морфометрическими показателями плаценты, массо-ростовыми параметрами новорожденных и уровнем внеклеточной фетальной ДНК ( $p<0,001$ ).

6. Снижение относительного уровня метилирования генов TLR2 0,01 (0,0;0,45,  $p=0,02$ ) и импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 0,22 (0,18;0,32,  $p=0,03$ ) в плазме материнской крови обосновывает целесообразность их использования в качестве неинвазивных предикторов при ранней форме задержки роста плода.

7. Аберрантное метилирование импринтинг контролирующей области генов IGF2/H19, принимающих участие в регуляции метаболических процессов, со снижением уровня до 42% (38,5;45),  $p=0,02$ ) в пуповинной крови свидетельствует о его роли в развитии задержки роста плода.

8. Задержка роста плода сопровождается выявлено статистически значимым снижением относительного уровня метилирования генов TLR2 до 0,26 (0,14; 0,30) и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 до 0,17 (0,06; 0,24) в плаценте.

9. Разработанный алгоритм, включающий определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК и уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 позволяет оптимизировать диагностику задержки роста плода, снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

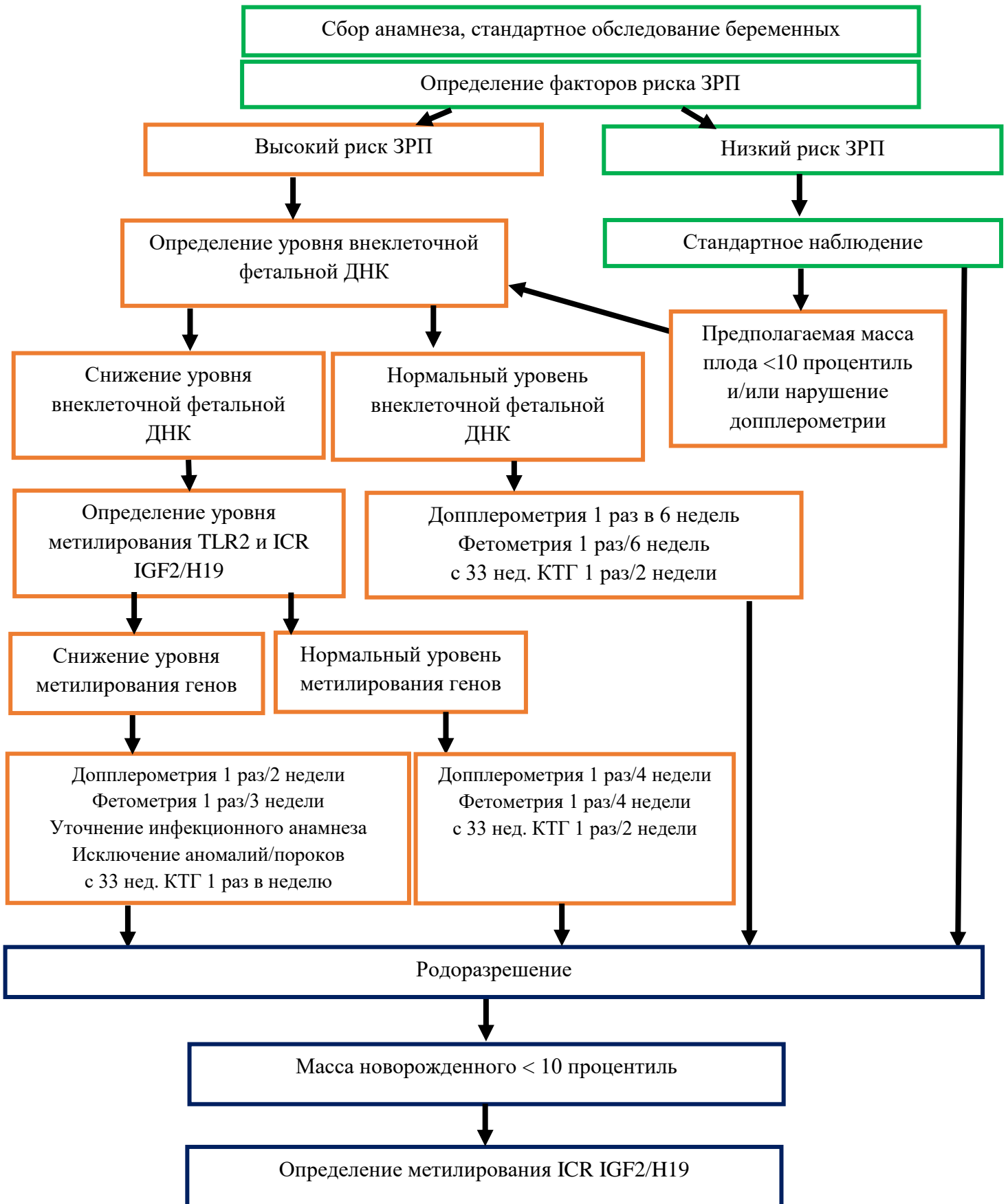
## Практические рекомендации

1. Пациенток с наличием наследственных тромбофилий высокого риска, антифосфолипидного синдрома, хронических артериальной гипертензии, пиелонефрита и цервицита, неразвивающейся беременности и задержки роста плода в анамнезе и угрозой прерывания беременности с отслойкой хориона следует относить в группу риска по развитию задержки роста плода.

2. Беременным из группы риска целесообразно определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК, уровня метилирования генов TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови в качестве диагностического и прогностического маркера, что определяет выбор акушерской тактики.

3. Ведение беременных группы риска рекомендуется согласно разработанному алгоритму диагностики задержки роста плода.

## Алгоритм диагностики задержки роста плода





**Список литературы.**

1. Дегтярева Е. И. и др. Роль импринтинга генов при внутриутробной задержке роста плода //Акушерство и гинекология. – 2015. – №. 12. – С. 5-10.
2. Кан Н. Е. и др. Прогнозирование задержки роста плода у беременных с недифференцированной дисплазией соединительной ткани //Акушерство и гинекология. – 2014. – №. 10. – С. 22-26.
3. Карапетян А. О. и др. Изменение концентрации внеклеточной ДНК во время беременности //Акушерство и гинекология. – 2018. – №. 3. – С. 44-50.
4. Красный А. М. и др. Исследование уровня метилирования гена RASSF1 в плазме и опухоли при раке эндометрия //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167. – №. 2. – С. 223-227.
5. Красный А. М. и др. Комбинированное исследование общей, фетальной ДНК, цитокинов в плазме крови матери при преэклампсии //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – №. 12. – С. 686-691.
6. Макаров И. О., Юдина Е. В., Боровкова Е. И. Задержка роста плода. Врачебная тактика: Учебн. пособие //М.: МЕДпресс-информ. – 2012.
7. Стрижаков А. Н. и др. Антенатальное метаболическое и эндокринное программирование при беременности высокого риска //Акушерство и гинекология. – 2016. – Т. 10. – С. 39-47.
8. Стрижаков А. Н. и др. Прогнозирование синдрома задержки роста плода у беременных высокого риска //Акушерство и гинекология. – 2017. – №. 7. – С. 34-44.
9. Стрижаков А. Н. и др. Синдром задержки роста плода //М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – Т. 120.
10. Тютюнник В. Л. и др. Роль полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в формировании задержки роста плода //Акушерство и гинекология. – 2018. – №. 12. – С. 23-28.

11. Холин А. М., Ходжаева З. С., Гус А. И. Патологическая плацентация и прогнозирование преэклампсии и задержки роста плода в первом триместре //Акушерство и гинекология. – 2018. – №. 5. – С. 12-19.
12. Alberry M. et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast //Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2007. – Т. 27. – №. 5. – С. 415-418.
13. Alberry M. S. et al. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2009. – Т. 200. – №. 1. – С. 98. e1-98. e6.
14. Alejandro Alcázar M. A. et al. Prevention of early postnatal hyperalimentation protects against activation of transforming growth factor- $\beta$ /bone morphogenetic protein and interleukin-6 signaling in rat lungs after intrauterine growth restriction //The Journal of nutrition. – 2014. – Т. 144. – №. 12. – С. 1943-1951.
15. Allen V. M. et al. The effect of hypertensive disorders in pregnancy on small for gestational age and stillbirth: a population based study //BMC pregnancy and childbirth. – 2004. – Т. 4. – №. 1. – С. 17.
16. Al-Mufti R. et al. Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction //Human Reproduction. – 2000. – Т. 15. – №. 1. – С. 218-221.
17. American College of Obstetricians and Gynecologists et al. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction //Obstetrics and gynecology. – 2013. – Т. 121. – №. 5. – С. 1122.
18. Anandakumar C. et al. Early asymmetric IUGR and aneuploidy //Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. – 1996. – Т. 22. – №. 4. – С. 365-370.
19. Ananth C. V. et al. Relationship among placenta previa, fetal growth restriction, and preterm delivery: a population-based study //Obstetrics & Gynecology. – 2001. – Т. 98. – №. 2. – С. 299-306.

20. Ananth C. V. et al. Severe placental abruption: clinical definition and associations with maternal complications //American journal of obstetrics and gynecology. – 2016. – T. 214. – №. 2. – C. 272. e1-272. e9.
21. Ananth C. V., Vintzileos A. M. Distinguishing pathological from constitutional small for gestational age births in population-based studies //Early human development. – 2009. – T. 85. – №. 10. – C. 653-658.
22. Ananth C. V., Wilcox A. J. Placental abruption and perinatal mortality in the United States //American journal of epidemiology. – 2001. – T. 153. – №. 4. – C. 332-337.
23. Avilés A. et al. Growth and development of children of mothers treated with chemotherapy during pregnancy: current status of 43 children //American journal of hematology. – 1991. – T. 36. – №. 4. – C. 243-248.
24. Bada H. S. et al. Low birth weight and preterm births: etiologic fraction attributable to prenatal drug exposure //Journal of Perinatology. – 2005. – T. 25. – №. 10. – C. 631-637.
25. Bahado-Singh R. O. et al. The Doppler cerebroplacental ratio and perinatal outcome in intrauterine growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 1999. – T. 180. – №. 3. – C. 750-756.
26. Bahr B., Galan H. L., Arroyo J. A. Decreased expression of phosphorylated placental heat shock protein 27 in human and ovine intrauterine growth restriction (IUGR) //Placenta. – 2014. – T. 35. – №. 6. – C. 404-410.
27. Baker J. et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth //Cell. – 1993. – T. 75. – №. 1. – C. 73-82.
28. Banister C. E. et al. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas //Epigenetics. – 2011. – T. 6. – №. 7. – C. 920-927.
29. Barker D. J. P. Adult consequences of fetal growth restriction //Clinical obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 49. – №. 2. – C. 270-283.

30. Barker D. J. P. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth //Diabetologia. – 1993. – T. 36. – №. 1. – C. 62-67.
31. Barker D. J. P. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease //The Lancet. – 1989. – T. 334. – №. 8663. – C. 577-580.
32. Barker D. J. P., Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales //The Lancet. – 1986. – T. 327. – №. 8489. – C. 1077-1081.
33. Bartholdi D. et al. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver–Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes //Journal of medical genetics. – 2009. – T. 46. – №. 3. – C. 192-197.
34. Battaglia F. C., Lubchenco L. O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age //The Journal of pediatrics. – 1967. – T. 71. – №. 2. – C. 159-163.
35. Battino D. et al. Intrauterine growth in the offspring of epileptic mothers //Acta neurologica scandinavica. – 1992. – T. 86. – №. 6. – C. 555-557.
36. Baumann M. U. et al. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by insulin-like growth factor I (IGF-I) //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 8.
37. Belizán J. M. et al. Diagnosis of intrauterine growth retardation by a simple clinical method: measurement of uterine height //American Journal of Obstetrics & Gynecology. – 1978. – T. 131. – №. 6. – C. 643-646.
38. Berkley E. et al. Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2012. – T. 206. – №. 4. – C. 300-308.
39. Bernstein I. M. et al. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2000. – T. 182. – №. 1. – C. 198-206.

40. Blössner M. et al. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries //European journal of clinical nutrition. – 1998. – T. 52. – C. S5-15.
41. Boers K. E. et al. Disproportionate intrauterine growth intervention trial at term: DIGITAT //BMC Pregnancy and Childbirth. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 12.
42. Boghossian N. S. et al. Morbidity and mortality in small for gestational age infants at 22 to 29 weeks' gestation //Pediatrics. – 2018. – T. 141. – №. 2. – C. e20172533.
43. Bouwland-Both M. I. et al. DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: the generation R study //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 12. – C. e81731.
44. Bourque D. K. et al. Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia //Placenta. – 2010. – T. 31. – №. 3. – C. 197-202.
45. Burton G. J., Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2018. – T. 218. – №. 2. – C. S745-S761.
46. Cailhol J. et al. Association of low CD4 cell count and intrauterine growth retardation in Thailand //JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2009. – T. 50. – №. 4. – C. 409-413.
47. CARE Study Group et al. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study //The BMJ. – 2008. – T. 337.
48. Chafetz I. et al. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2007. – T. 197. – №. 1. – C. 35. e1-35. e7.
49. Chang T. C. et al. Identification of fetal growth retardation: comparison of Doppler waveform indices and serial ultrasound measurements of abdominal circumference and fetal weight //Obstetrics and gynecology. – 1993. – T. 82. – №. 2. – C. 230-236.

50. Chang T. C. et al. Prediction of perinatal morbidity at term in small fetuses: comparison of fetal growth and Doppler ultrasound //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1994. – T. 101. – №. 5. – C. 422-427.
51. Chantalat S. et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin //Genome research. – 2011. – T. 21. – №. 9. – C. 1426-1437.
52. Chapman M. G. et al. Significance of the ultrasound location of placental site in early pregnancy //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1979. – T. 86. – №. 11. – C. 846-848.
53. Chauhan S. P. et al. Prediction of small for gestational age newborns using ultrasound estimated and actual amniotic fluid volume: published data revisited //Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2008. – T. 48. – №. 2. – C. 160-164.
54. Chauhan S. P. et al. Suspicion of intrauterine growth restriction: use of abdominal circumference alone or estimated fetal weight below 10% //The journal of maternal-fetal & neonatal medicine. – 2006. – T. 19. – №. 9. – C. 557-562.
55. Chauhan S. P., Magann E. F. Screening for fetal growth restriction //Clinical obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 49. – №. 2. – C. 284-294.
56. Chauvin S. et al. Aberrant TGF $\beta$  signalling contributes to dysregulation of sphingolipid metabolism in intrauterine growth restriction //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2015. – T. 100. – №. 7. – C. E986-E996.
57. Chen P. Y. et al. Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression //Physiological genomics. – 2013. – T. 45. – №. 14. – C. 565-576.
58. Chen X. et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death //Cell research. – 2014. – T. 24. – №. 1. – C. 105-121.
59. Chia D. J., Varco-Merth B., Rotwein P. Dispersed chromosomal Stat5b-binding elements mediate growth hormone-activated insulin-like growth factor-I

- gene transcription //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – T. 285. – №. 23. – C. 17636-17647.
60. Chien P. F. W., Owen P., Khan K. S. Validity of ultrasound estimation of fetal weight //Obstetrics & Gynecology. – 2000. – T. 95. – №. 6. – C. 856-860.
61. Chitty L. S. et al. Charts of fetal size: 3. Abdominal measurements //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1994. – T. 101. – №. 2. – C. 125-131.
62. Christians J. K., Leavey K., Cox B. J. Associations between imprinted gene expression in the placenta, human fetal growth and preeclampsia //Biology letters. – 2017. – T. 13. – №. 11. – C. 20170643.
63. Clerico E. M. et al. Hsp70 molecular chaperones: multifunctional allosteric holding and unfolding machines //Biochemical Journal. – 2019. – T. 476. – №. 11. – C. 1653-1677.
64. Chattingius S., Axelsson O., Lindmark G. Symphysis-fundus measurements and intrauterine growth retardation //Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 1984. – T. 63. – №. 4. – C. 335-340.
65. Cnossen J. S. et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis //Cmaj. – 2008. – T. 178. – №. 6. – C. 701-711.
66. Committee on Practice Bulletins—Obstetrics A. et al. Practice Bulletin No. 132: Antiphospholipid syndrome //Obstetrics and gynecology. – 2012. – T. 120. – №. 6. – C. 1514.
67. Conde-Agudelo A., Rosas-Bermúdez A., Kafury-Goeta A. C. Birth spacing and risk of adverse perinatal outcomes: a meta-analysis //Jama. – 2006. – T. 295. – №. 15. – C. 1809-1823.
68. Conrad M. et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities //Nature reviews Drug discovery. – 2016. – T. 15. – №. 5. – C. 348.
69. Costa S. L. et al. Screening for placental insufficiency in high-risk pregnancies: is earlier better? //Placenta. – 2008. – T. 29. – №. 12. – C. 1034-1040.

70. Craven C. M., Morgan T., Ward K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts //Placenta. – 1998. – T. 19. – №. 4. – C. 241-252.
71. Cruz-Martinez R. et al. Longitudinal brain perfusion changes in near-term small-for-gestational-age fetuses as measured by spectral Doppler indices or by fractional moving blood volume //American journal of obstetrics and gynecology. – 2010. – T. 203. – №. 1. – C. 42. e1-42. e6.
72. Crocker I. P. et al. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction //The American journal of pathology. – 2003. – T. 162. – №. 2. – C. 637-643.
73. Dane B. et al. Correlation between first-trimester maternal serum markers, second-trimester uterine artery doppler indices and pregnancy outcome //Gynecologic and obstetric investigation. – 2010. – T. 70. – №. 2. – C. 126-131.
74. DeChiara T. M., Efstratiadis A., Robertsen E. J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting //Nature. – 1990. – T. 345. – №. 6270. – C. 78-80.
75. De Jong C. L. D. et al. Customized fetal weight limits for antenatal detection of fetal growth restriction //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2000. – T. 15. – №. 1. – C. 36-40.
76. De Jong C. L. D. et al. Fetal weight gain in a serially scanned high-risk population //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 1998. – T. 11. – №. 1. – C. 39-43.
77. Denbow M. L. et al. Placental angioarchitecture in monochorionic twin pregnancies: relationship to fetal growth, fetofetal transfusion syndrome, and pregnancy outcome //American journal of obstetrics and gynecology. – 2000. – T. 182. – №. 2. – C. 417-426.
78. Desai M. et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy //The Lancet infectious diseases. – 2007. – T. 7. – №. 2. – C. 93-104.



79. Devaskar S. U., Chu A. Intrauterine growth restriction: hungry for an answer //Physiology. – 2016. – T. 31. – №. 2. – C. 131-146.
80. Doctor B. A. et al. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation //American journal of obstetrics and gynecology. – 2001. – T. 185. – №. 3. – C. 652-659.
81. Dodington D. W., Desai H. R., Woo M. JAK/STAT–emerging players in metabolism //Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2018. – T. 29. – №. 1. – C. 55-65.
82. Donner C. et al. Prenatal diagnosis of 52 pregnancies at risk for congenital cytomegalovirus infection //Obstetrics and gynecology. – 1993. – T. 82. – №. 4 Pt 1. – C. 481-486.
83. Du M. et al. The KCNQ1OT1 promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15. 5 //Genomics. – 2004. – T. 84. – №. 2. – C. 288-300.
84. Dugoff L. et al. First trimester uterine artery Doppler abnormalities predict subsequent intrauterine growth restriction //American journal of obstetrics and gynecology. – 2005. – T. 193. – №. 3. – C. 1208-1212.
85. Dugoff L. et al. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial) //American journal of obstetrics and gynecology. – 2004. – T. 191. – №. 4. – C. 1446-1451.
86. DUNN P. M. The search for perinatal definitions and standards //Acta Paediatrica. – 1985. – T. 74. – C. 7-11.
87. Duvekot J. J. et al. Maternal volume homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction //Obstetrics & Gynecology. – 1995. – T. 85. – №. 3. – C. 361-367.
88. Eche S., Mackraj I., Moodley J. Circulating fetal and total cell-free DNA, and sHLA-G in black South African women with gestational hypertension and pre-eclampsia //Hypertension in pregnancy. – 2017. – T. 36. – №. 4. – C. 295-301.

89. Erboga M., Kanter M. Trophoblast cell proliferation and apoptosis in placental development during early gestation period in rats //Analytical and quantitative cytopathology and histopathology. – 2015. – T. 37. – №. 5. – C. 286-294.
90. Eydoux P. et al. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment //Prenatal diagnosis. – 1989. – T. 9. – №. 4. – C. 255-269.
91. Faa G. et al. Fetal programming of neuropsychiatric disorders //Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. – 2016. – T. 108. – №. 3. – C. 207-223.
92. Facco F., You W., Grobman W. Genetic thrombophilias and intrauterine growth restriction: a meta-analysis //Obstetrics & Gynecology. – 2009. – T. 113. – №. 6. – C. 1206-1216.
93. Farag K., Hassan I., Ledger W. L. Prediction of preeclampsia: can it be achieved? //Obstetrical & gynecological survey. – 2004. – T. 59. – №. 6. – C. 464-482.
94. Farina A. et al. Total cell-free DNA ( $\beta$ -globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening //Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2004. – T. 24. – №. 9. – C. 722-726.
95. Feil R., Fraga M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications //Nature reviews genetics. – 2012. – T. 13. – №. 2. – C. 97-109.
96. Fenton T. R., Kim J. H. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants //BMC pediatrics. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 59.
97. Ferguson A. C. Prolonged impairment of cellular immunity in children with intrauterine growth retardation //The Journal of pediatrics. – 1978. – T. 93. – №. 1. – C. 52-56.
98. Figueras F. et al. Predictiveness of antenatal umbilical artery Doppler for adverse pregnancy outcome in small-for-gestational-age babies according to

- customised birthweight centiles: population-based study //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2008. – T. 115. – №. 5. – C. 590-594.
99. Figueras F. et al. Revealed versus concealed criteria for placental insufficiency in an unselected obstetric population in late pregnancy (RATIO37): randomised controlled trial study protocol //BMJ open. – 2017. – T. 7. – №. 6. – C. e014835.
100. Figueras F., Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management //American journal of obstetrics and gynecology. – 2011. – T. 204. – №. 4. – C. 288-300.
101. Figueras F., Gratacos E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol //Fetal diagnosis and therapy. – 2014. – T. 36. – №. 2. – C. 86-98.
102. Filippi E. et al. Uterine artery Doppler and adverse pregnancy outcome in women with extreme levels of fetoplacental proteins used for Down syndrome screening //Ultrasound in obstetrics & gynecology. – 2011. – T. 37. – №. 5. – C. 520-527.
103. Fink J. C. et al. Increased risk of adverse maternal and infant outcomes among women with renal disease //Paediatric and perinatal epidemiology. – 1998. – T. 12. – №. 3. – C. 277-287.
104. Fox N. S., Shalom D., Chasen S. T. Second-trimester fetal growth as a predictor of poor obstetric and neonatal outcome in patients with low first-trimester serum pregnancy-associated plasma protein-A and a euploid fetus //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2009. – T. 33. – №. 1. – C. 34-38.
105. Frankel S. et al. Birthweight, adult risk factors and incident coronary heart disease: the Caerphilly Study //Public health. – 1996. – T. 110. – №. 3. – C. 139-143.
106. Fu Q. et al. Intrauterine growth restriction disrupts developmental epigenetics around distal growth hormone response elements on the rat hepatic IGF-1 gene //The FASEB Journal. – 2015. – T. 29. – №. 4. – C. 1176-1184.

107. Fulroth R., Phillips B., Durand D. J. Perinatal outcome of infants exposed to cocaine and/or heroin in utero //American Journal of Diseases of Children. – 1989. – T. 143. – №. 8. – C. 905-910.
108. Gagnon A. et al. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes //Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. – 2008. – T. 30. – №. 10. – C. 918-932.
109. Galan H. L. Timing delivery of the growth-restricted fetus //Seminars in perinatology. – WB Saunders, 2011. – T. 35. – №. 5. – C. 262-269.
110. Gardosi J. et al. Analysis of birthweight and gestational age in antepartum stillbirths //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1998. – T. 105. – №. 5. – C. 524-530.
111. Gardosi J. et al. Maternal and fetal risk factors for stillbirth: population based study //Bmj. – 2013. – T. 346. – C. f108.
112. Gardosi J., Francis A. Adverse pregnancy outcome and association with small for gestational age birthweight by customized and population-based percentiles //American journal of obstetrics and gynecology. – 2009. – T. 201. – №. 1. – C. 28. e1-28. e8.
113. Gardosi J., Francis A. Controlled trial of fundal height measurement plotted on customised antenatal growth charts //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1999. – T. 106. – №. 4. – C. 309-317.
114. Ghi T. et al. Persistence of increased uterine artery resistance in the third trimester and pregnancy outcome //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2010. – T. 36. – №. 5. – C. 577-581.
115. Goetzinger K. R. et al. Echogenic bowel on second-trimester ultrasound: evaluating the risk of adverse pregnancy outcome //Obstetrics and gynecology. – 2011. – T. 117. – №. 6. – C. 1341.
116. 130
117. Gordijn S. J. et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure //Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2016. – T. 48. – №. 3. – C. 333-339.

118. Greene M. F. et al. Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice E-Book. – Elsevier Health Sciences, 2008.
119. Guo L. et al. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae //Developmental biology. – 2008. – T. 320. – №. 1. – C. 79-91.
120. Hadlock F. P. et al. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements—a prospective study //American journal of obstetrics and gynecology. – 1985. – T. 151. – №. 3. – C. 333-337.
121. Hales C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64 //Bmj. – 1991. – T. 303. – №. 6809. – C. 1019-1022.
122. Hales C. N., Barker D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis //Diabetologia. – 1992. – T. 35. – №. 7. – C. 595-601.
123. Hall J. G., Pauli R. M., Wilson K. M. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy //The American journal of medicine. – 1980. – T. 68. – №. 1. – C. 122-140.
124. Hall M. H., Chng P. K., MacGillivray I. Is routine antenatal care worth while? //The Lancet. – 1980. – T. 316. – №. 8185. – C. 78-80.
125. Han Z. et al. Maternal underweight and the risk of preterm birth and low birth weight: a systematic review and meta-analyses //International journal of epidemiology. – 2011. – T. 40. – №. 1. – C. 65-101.
126. Hannan N. J. et al. Key players of the necroptosis pathway RIPK1 and SIRT2 are altered in placenta from preeclampsia and fetal growth restriction //Placenta. – 2017. – T. 51. – C. 1-9.
127. Harlev A. et al. Idiopathic bleeding during the second half of pregnancy as a risk factor for adverse perinatal outcome //The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. – 2008. – T. 21. – №. 5. – C. 331-335.
128. Harper L. M. et al. Effect of placenta previa on fetal growth //American journal of obstetrics and gynecology. – 2010. – T. 203. – №. 4. – C. 330. e1-330. e5.

129. Heifetz S. A. Single umbilical artery. A statistical analysis of 237 autopsy cases and review of the literature //Perspectives in pediatric pathology. – 1984. – T. 8. – №. 4. – C. 345-378.
130. Heijmans B. T. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105. – №. 44. – C. 17046-17049.
131. Holtrop P. C. The frequency of hypoglycemia in full-term large and small for gestational age newborns //American journal of perinatology. – 1993. – T. 10. – №. 02. – C. 150-154.
132. Houlton M. C. C., Marivate M., Philpott R. H. The prediction of fetal growth retardation in twin pregnancy //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1981. – T. 88. – №. 3. – C. 264-273.
133. Howarth C., Gazis A., James D. Associations of Type 1 diabetes mellitus, maternal vascular disease and complications of pregnancy //Diabetic medicine. – 2007. – T. 24. – №. 11. – C. 1229-1234.
134. Huang B. P. et al. Upregulation of heat shock protein 70 and the differential protein expression induced by tumor necrosis factor-alpha enhances migration and inhibits apoptosis of hepatocellular carcinoma cell HepG2 //International journal of medical sciences. – 2017. – T. 14. – №. 3. – C. 284.
135. Huerta-Enochian G., Katz V., Erfurth S. The association of abnormal  $\alpha$ -fetoprotein and adverse pregnancy outcome: does increased fetal surveillance affect pregnancy outcome? //American journal of obstetrics and gynecology. – 2001. – T. 184. – №. 7. – C. 1549-1555.
136. Huppertz B., Kadyrov M., Kingdom J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast //American journal of obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 195. – №. 1. – C. 29-39.
137. Huppertz B. Trophoblast Invasion: Remodelling of Spiral Arteries and Beyond //Preeclampsia. – Springer, Singapore, 2018. – C. 47-62.
138. Illingworth R. S. et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome //PLoS genetics. – 2010. – T. 6. – №. 9.

139. Imdad A. et al. Umbilical cord antiseptics for preventing sepsis and death among newborns //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2013. – №. 5.
140. Iqbal S. N. et al. Predictors of fetal growth in maternal HIV disease //American journal of perinatology. – 2010. – T. 27. – №. 07. – C. 517-523.
141. Jackson R. A. et al. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis //Obstetrics & Gynecology. – 2004. – T. 103. – №. 3. – C. 551-563.
142. Jaddoe V. W. V. et al. Moderate alcohol consumption during pregnancy and the risk of low birth weight and preterm birth. The generation R study //Annals of epidemiology. – 2007. – T. 17. – №. 10. – C. 834-840.
143. Jang H. S. et al. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function //Genes. – 2017. – T. 8. – №. 6. – C. 148.
144. Jaquet D. et al. Significant paternal contribution to the risk of small for gestational age //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2005. – T. 112. – №. 2. – C. 153-159.
145. John R. M. Imprinted genes and the regulation of placental endocrine function: Pregnancy and beyond //Placenta. – 2017. – T. 56. – C. 86-90.
146. Jones B. K., LeVorse J., Tilghman S. M. Deletion of a nuclease-sensitive region between the Igf2 and H19 genes leads to Igf2 misregulation and increased adiposity //Human molecular genetics. – 2001. – T. 10. – №. 8. – C. 807-814.
147. Jorgez C. J., Bischoff F. Z. Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification //Fetal diagnosis and therapy. – 2009. – T. 25. – №. 3. – C. 314-319.
148. Kaufmann P., Black S., Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia //Biology of reproduction. – 2003. – T. 69. – №. 1. – C. 1-7.149.
150. Keikkala E. et al. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum—a marker of early-onset preeclampsia //Placenta. – 2013. – T. 34. – №. 11. – C. 1059-1065.

151. Khoury M. J. et al. Congenital malformations and intrauterine growth retardation: a population study //Pediatrics. – 1988. – T. 82. – №. 1. – C. 83-90.
152. Kirkegaard I., Henriksen T. B., Ulbjerg N. Early fetal growth, PAPP-A and free  $\beta$ -hCG in relation to risk of delivering a small-for-gestational age infant //Ultrasound in obstetrics & gynecology. – 2011. – T. 37. – №. 3. – C. 341-347.
153. Klammt J. et al. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation //Nature communications. – 2018. – T. 9. – №. 1. – C. 1-10.
154. Koga K., Aldo P. B., Mor G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response //Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. – 2009. – T. 35. – №. 2. – C. 191-202.
155. Koide K. et al. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women //Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2005. – T. 25. – №. 7. – C. 604-607.
156. Koukoura O. et al. Loss of imprinting and aberrant methylation of IGF2 in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction //International journal of molecular medicine. – 2011. – T. 28. – №. 4. – C. 481-487.
157. Kramer M. S. et al. Are all growth-restricted newborns created equal (ly)? //Pediatrics. – 1999. – T. 103. – №. 3. – C. 599-602.
158. Kramer M. S. et al. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome //Pediatrics. – 1990. – T. 86. – №. 5. – C. 707-713.
159. Krulewitch C. et al. Does changing paternity contribute to the risk of intrauterine growth retardation? //Paediatric and perinatal epidemiology. – 1997. – T. 11. – №. S1. – C. 41-47.
160. Kwiatkowski S. et al. Maternal endothelial damage as a disorder shared by early preeclampsia, late preeclampsia and intrauterine growth restriction //Journal of perinatal medicine. – 2017. – T. 45. – №. 7. – C. 793-802.



161. Kwon E. J., Kim Y. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health //Obstetrics & gynecology science. – 2017. – T. 60. – №. 6. – C. 506-519.
162. Lambert J. S. et al. Risk factors for preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth retardation in infants born to HIV-infected pregnant women receiving zidovudine //Aids. – 2000. – T. 14. – №. 10. – C. 1389-1399.
163. Larsen T. et al. Normal fetal growth evaluated by longitudinal ultrasound examinations //Early human development. – 1990. – T. 24. – №. 1. – C. 37-45.
164. Lau T. W. et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia //Clinical chemistry. – 2002. – T. 48. – №. 12. – C. 2141-2146.
165. Laurini R., Laurin J., Marsål K. Placental histology and fetal blood flow in intrauterine growth retardation //Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 1994. – T. 73. – №. 7. – C. 529-534.
166. Lausman A. et al. Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis, and management //Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. – 2013. – T. 35. – №. 8. – C. 741-748.
167. Law C. M., Shiell A. W. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature //Journal of hypertension. – 1996. – T. 14. – №. 8. – C. 935-941.
168. Lawlor D. A. et al. Birth weight is inversely associated with incident coronary heart disease and stroke among individuals born in the 1950s: findings from the Aberdeen Children of the 1950s prospective cohort study //Circulation. – 2005. – T. 112. – №. 10. – C. 1414-1418.
169. Lawlor D. A., Smith G. D., Ebrahim S. Birth weight is inversely associated with coronary heart disease in post-menopausal women: findings from the British women's heart and health study //Journal of Epidemiology & Community Health. – 2004. – T. 58. – №. 2. – C. 120-125.
170. Lee A. C. C. et al. Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with

INTERGROWTH-21st standard: analysis of CHERG datasets //bmj. – 2017. – T. 358. – C. j3677.

171. Lees C. et al. The trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE) study: Two year neurodevelopmental and intermediate perinatal outcomes //Lancet. – 2015. – T. 385. – №. 2162. – C. e72.

172. Levy R. et al. Prenatal diagnosis of zygoty by fetal DNA analysis, a contribution to the management of multiple pregnancies //Fetal diagnosis and therapy. – 2002. – T. 17. – №. 6. – C. 339-342.

173. Leung T. Y. et al. Prediction of birth weight by fetal crown–rump length and maternal serum levels of pregnancy-associated plasma protein-A in the first trimester //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2008. – T. 31. – №. 1. – C. 10-14.

174. Li W. et al. Heat shock protein 70 expression is increased in the liver of neonatal intrauterine growth retardation piglets //Asian-Australasian journal of animal sciences. – 2012. – T. 25. – №. 8. – C. 1096.

175. Lillycrop K. A., Burdge G. C. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals //Epigenomics. – 2014. – T. 6. – №. 6. – C. 623-636.

176. Lin S. et al. Uterine artery Doppler velocimetry in relation to trophoblast migration into the myometrium of the placental bed //Obstetrics & Gynecology. – 1995. – T. 85. – №. 5. – C. 760-765.

177. Lithell H. O. et al. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years //Bmj. – 1996. – T. 312. – №. 7028. – C. 406-410.

178. Litton C. et al. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future //Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine. – 2009. – T. 76. – №. 6. – C. 521-528..

179. Litwińska E. et al. Combined screening for early and late pre-eclampsia and intrauterine growth restriction by maternal history, uterine artery Doppler, mean arterial pressure and biochemical markers // *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. – 2017. – T. 26. – №. 3. – C. 439-448.
180. Lo Y. M. D. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // *The lancet*. – 1997. – T. 350. – №. 9076. – C. 485-487.
181. Lui J. C. et al. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2008. – T. 295. – №. 1. – C. R189-R196.
182. Malik S. et al. Association between congenital heart defects and small for gestational age // *Pediatrics*. – 2007. – T. 119. – №. 4. – C. e976-e982.
183. Manolio T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature*. – 2009. – T. 461. – №. 7265. – C. 747-753.
184. Marciniak A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome // *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2017. – T. 56. – №. 2. – C. 133-138.
185. Marsit C. J. Placental epigenetics in children's environmental health // *Seminars in reproductive medicine*. – Thieme Medical Publishers, 2016. – T. 34. – №. 01. – C. 036-041.
186. Martín-Estal I., De La Garza R. G., Castilla-Cortazar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency // *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol. 170*. – Springer, Cham, 2016. – C. 1-35.
187. Mastroiacovo P. et al. Fetal growth in the offspring of epileptic women: results of an Italian multicentric cohort study // *Acta neurologica scandinavica*. – 1988. – T. 78. – №. 2. – C. 110-114.
188. MATHAI M., JAIRAJ P., Muthurathnam S. Screening for light-for-gestational age infants: a comparison of three simple measurements // *BJOG: An*

International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1987. – T. 94. – №. 3. – С. 217-221.

189. Maulik D. E. V. Fetal growth restriction: the etiology //Clinical obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 49. – №. 2. – С. 228-235.

190. McCowan L. M. E. et al. Risk factors for small-for-gestational-age infants by customised birthweight centiles: data from an international prospective cohort study //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2010. – Т. 117. – №. 13. – С. 1599-1607.

191. McMinn J. et al. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction //Placenta. – 2006. – Т. 27. – №. 6-7. – С. 540-549.

192. McKenna D. et al. A randomized trial using ultrasound to identify the high-risk fetus in a low-risk population //Obstetrics & Gynecology. – 2003. – Т. 101. – №. 4. – С. 626-632.

193. Menendez-Castro C., Rascher W., Hartner A. Intrauterine growth restriction-impact on cardiovascular diseases later in life //Molecular and cellular pediatrics. – 2018. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-3.

194. Mifsud W., Sebire N. J. Placental pathology in early-onset and late-onset fetal growth restriction //Fetal diagnosis and therapy. – 2014. – Т. 36. – №. 2. – С. 117-128.

195. Mikolajczyk R. T. et al. A global reference for fetal-weight and birthweight percentiles //The Lancet. – 2011. – Т. 377. – №. 9780. – С. 1855-1861.

196. Mills J. L. et al. Maternal alcohol consumption and birth weight: How much drinking during pregnancy is safe? //Jama. – 1984. – Т. 252. – №. 14. – С. 1875-1879.

197. Mongelli M., Ek S., Tambyrajia R. Screening for fetal growth restriction: a mathematical model of the effect of time interval and ultrasound error //Obstetrics & Gynecology. – 1998. – Т. 92. – №. 6. – С. 908-912.

198. Mongelli M., Gardosi J. Reduction of false-positive diagnosis of fetal growth restriction by application of customized fetal growth standards // *Obstetrics & Gynecology*. – 1996. – T. 88. – №. 5. – C. 844-848.
199. Moore L. D., Le T F. G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2013 [citado 2019 Apr 4]; 38: 23-38.
200. Morano D. et al. Cell-free DNA (cfDNA) fetal fraction in early-and late-onset fetal growth restriction // *Molecular diagnosis & therapy*. – 2018. – T. 22. – №. 5. – C. 613-619.
201. Morris R. K. et al. Serum screening with Down's syndrome markers to predict pre-eclampsia and small for gestational age: systematic review and meta-analysis // *BMC pregnancy and childbirth*. – 2008. – T. 8. – №. 1. – C. 33.
202. Morse K., Williams A., Gardosi J. Fetal growth screening by fundal height measurement // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2009. – T. 23. – №. 6. – C. 809-818.
203. Mullen M. K., Gonzalez-Perez R. R. Leptin-induced JAK/STAT signaling and cancer growth // *Vaccines*. – 2016. – T. 4. – №. 3. – C. 26.
204. Muñoz-Hernández R. et al. Total and fetal circulating cell-free DNA, angiogenic, and antiangiogenic factors in preeclampsia and HELLP syndrome // *American journal of hypertension*. – 2017. – T. 30. – №. 7. – C. 673-682.
205. Naeye R. L. et al. Fetal complications of maternal heroin addiction: abnormal growth, infections, and episodes of stress // *The Journal of pediatrics*. – 1973. – T. 83. – №. 6. – C. 1055-1061.
206. Narayan N. et al. The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis // *Nature*. – 2012. – T. 492. – №. 7428. – C. 199-204.
207. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK et al. *Antenatal care: routine care for the healthy pregnant woman*. – RCOG press, 2008.
208. Neilson J. P. Symphysis-fundal height measurement in pregnancy // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 1998. – №. 1.
209. Nelissen E. C. M. et al. Epigenetics and the placenta // *Human reproduction update*. – 2011. – T. 17. – №. 3. – C. 397-417

210. Nicolaides K. H. et al. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2006. – T. 27. – №. 1. – C. 13-17.
211. Niknafs P., Sibbald J. Accuracy of single ultrasound parameters in detection of fetal growth restriction //American journal of perinatology. – 2001. – T. 18. – №. 06. – C. 325-334.
212. O'Brien J. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation //Frontiers in endocrinology. – 2018. – T. 9. – C. 402.
213. Odibo A. O. et al. Advanced maternal age is an independent risk factor for intrauterine growth restriction //American journal of perinatology. – 2006. – T. 23. – №. 05. – C. 325-328.
214. Ong C. Y. T. et al. First trimester maternal serum free  $\beta$  human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2000. – T. 107. – №. 10. – C. 1265-1270.
215. Ollikainen M. et al. DNA methylation analysis of multiple tissues from newborn twins reveals both genetic and intrauterine components to variation in the human neonatal epigenome //Human molecular genetics. – 2010. – T. 19. – №. 21. – C. 4176-4188.
216. Ollikainen M., Craig J. M. Epigenetic discordance at imprinting control regions in twins //Epigenomics. – 2011. – T. 3. – №. 3. – C. 295-306.
217. Owen P., Khan K. S., Howie P. Single and serial estimates of amniotic fluid volume and umbilical artery resistance in the prediction of intrauterine growth restriction //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 1999. – T. 13. – №. 6. – C. 415-419.
218. Pallotto E. K., Kilbride H. W. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction //Clinical obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 49. – №. 2. – C. 257-269.

219. Pang M. W. et al. Customizing fetal biometric charts //Ultrasound in obstetrics & gynecology. – 2003. – T. 22. – №. 3. – C. 271-276.
220. Papantoniou N. et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia //Prenatal diagnosis. – 2013. – T. 33. – №. 7. – C. 682-687.
221. Peacock J. L. et al. Respiratory morbidity at follow-up of small-for-gestational-age infants born very prematurely //Pediatric research. – 2013. – T. 73. – №. 1. – C. 457-463.
222. PEARCE J. M., CAMPBELL S. A comparison of symphysis-fundal height and ultrasound as screening tests for light-for-gestational age infants //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1987. – T. 94. – №. 2. – C. 100-104.
223. Persson B. et al. Prediction of size of infants at birth by measurement of symphysis fundus height //BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1986. – T. 93. – №. 3. – C. 206-211.
224. Pilalis A. et al. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler and PAPP-A at 11–14 weeks' gestation //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2007. – T. 29. – №. 2. – C. 135-140.
225. Platz E., Newman R. Diagnosis of IUGR: traditional biometry //Seminars in perinatology. – WB Saunders, 2008. – T. 32. – №. 3. – C. 140-147.
226. Pollack R. N., Divon M. Y. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology //Clinical obstetrics and gynecology. – 1992. – T. 35. – №. 1. – C. 99-107.
227. Polykratis A. et al. Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo //The Journal of Immunology. – 2014. – T. 193. – №. 4. – C. 1539-1543.
228. Poon L. C. Y. et al. First-trimester maternal serum a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) and adverse pregnancy outcome //Obstetrics & Gynecology. – 2008. – T. 112. – №. 5. – C. 1082-1090.

229. Poon L. C. Y. et al. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2009. – T. 33. – №. 1. – C. 23-33.
230. Poon L. C. Y. et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes //Fetal diagnosis and therapy. – 2013. – T. 33. – №. 4. – C. 215-223.
231. Powers W. F. et al. The risks confronting twins: a national perspective //American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 1994. – T. 170. – №. 2. – C. 456-461.
232. Prefumo F., Sebire N. J., Thilaganathan B. Decreased endovascular trophoblast invasion in first trimester pregnancies with high-resistance uterine artery Doppler indices //Human Reproduction. – 2004. – T. 19. – №. 1. – C. 206-209.
233. Raynor B. D., Richards D. Growth retardation in fetuses with gastroschisis //Journal of ultrasound in medicine. – 1997. – T. 16. – №. 1. – C. 13-16.
234. Resnik R. Fetal growth restriction: Evaluation and management //UpToDate, Waltham, MA (Accessed on Oct. 20, 2016). – 2013.
235. Resnik R. Intrauterine growth restriction //Obstetrics & Gynecology. – 2002. – T. 99. – №. 3. – C. 490-496.
236. Rich-Edwards J. W. et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976 //Bmj. – 1997. – T. 315. – №. 7105. – C. 396-400.
237. Roberts J. M. Pathophysiology of ischemic placental disease //Seminars in perinatology. – WB Saunders, 2014. – T. 38. – №. 3. – C. 139-145.
238. Rolnik D. L. et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia //Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2018. – T. 52. – №. 6. – C. 722-727.
239. ROSENBERG K., Grant J. M., HEPBURN M. Antenatal detection of growth retardation: actual practice in a large maternity hospital //BJOG: An



- International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 1982. – T. 89. – №. 1. – C. 12-15.
240. Rotwein P. Diversification of the insulin-like growth factor 1 gene in mammals //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 12.
241. Rotwein P. Mapping the growth hormone–Stat5b–IGF-I transcriptional circuit //Trends in Endocrinology & Metabolism. – 2012. – T. 23. – №. 4. – C. 186-193.
242. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and management of the small-for-gestational age fetus //RCOG Green-Top Guidelines. – 2013. – №. 31.
243. Royston P. Calculation of unconditional and conditional reference intervals for foetal size and growth from longitudinal measurements //Statistics in medicine. – 1995. – T. 14. – №. 13. – C. 1417-1436.
244. Said J. M. et al. Inherited thrombophilia polymorphisms and pregnancy outcomes in nulliparous women //Obstetrics & Gynecology. – 2010. – T. 115. – №. 1. – C. 5-13.
245. Salafia C. M. et al. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features //American Journal of Obstetrics & Gynecology. – 1995. – T. 173. – №. 4. – C. 1049-1057.
246. Salam R. A., Das J. K., Bhutta Z. A. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health //Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. – 2014. – T. 17. – №. 3. – C. 249-254.
247. Salvianti F. et al. Prospective evaluation of RASSF1A cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia //Placenta. – 2015. – T. 36. – №. 9. – C. 996-1001.
248. Sandhu M. S. et al. Low circulating IGF-II concentrations predict weight gain and obesity in humans //Diabetes. – 2003. – T. 52. – №. 6. – C. 1403-1408.
249. Scifres C. M., Nelson D. M. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death //The Journal of physiology. – 2009. – T. 587. – №. 14. – C. 3453-3458.

250. Scioscia M. et al. Estimation of birth weight by two-dimensional ultrasonography: a critical appraisal of its accuracy //Obstetrics & Gynecology. – 2008. – T. 111. – №. 1. – C. 57-65.
251. Sekizawa A. et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood //Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. – 2007. – T. 33. – №. 6. – C. 747-764.
252. Sferruzzi-Perri A. N. et al. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth //The Journal of physiology. – 2011. – T. 589. – №. 1. – C. 7-20.
253. Shah P. S., Shah J. Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW Births. Maternal exposure to domestic violence and pregnancy and birth outcomes: a systematic review and meta-analyses //J Womens Health (Larchmt). – 2010. – T. 19. – №. 11. – C. 2017-31.
254. Shah P. S., Shah V., Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW Births. Influence of the maternal birth status on offspring: A systematic review and meta-analysis //Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 2009. – T. 88. – №. 12. – C. 1307-1318.
255. Shanklin D. R. The influence of placental lesions on the newborn infant //Pediatric Clinics of North America. – 1970. – T. 17. – №. 1. – C. 25-42.
256. Shu X. O. et al. Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: results from a prospective study //Epidemiology. – 1995. – C. 115-120.
257. Sibley C. P. Treating the dysfunctional placenta //Journal of Endocrinology. – 2017. – T. 234. – №. 2. – C. R81-R97.
258. Sibley C. P. et al. Placental phenotypes of intrauterine growth //Pediatric research. – 2005. – T. 58. – №. 5. – C. 827-832
259. Silva J. F., Ocarino N. M., Serakides R. Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration //Reproduction, Fertility and Development. – 2017. – T. 29. – №. 9. – C. 1774-1786.

260. Silver R. M. et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications //Obstetrics and gynecology. – 2010. – T. 115. – №. 1. – C. 14.
261. Skovron M. L. et al. Evaluation of early third-trimester ultrasound screening for intrauterine growth retardation //Journal of ultrasound in medicine. – 1991. – T. 10. – №. 3. – C. 153-159.
262. e
263. Snijders R. J. M. et al. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities //American journal of obstetrics and gynecology. – 1993. – T. 168. – №. 2. – C. 547-555.
264. Spencer K. et al. First-Trimester Biochemical Markers of Aneuploidy and the Prediction of Small-for-Gestational Age Fetuses //Obstetrical & Gynecological Survey. – 2009. – T. 64. – №. 6. – C. 370-372.
265. Spencer K. et al. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free  $\beta$ -hCG and with second-trimester uterine artery Doppler //Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2005. – T. 25. – №. 10. – C. 949-953.
266. Stampalija T., Gyte G. M. L., Alfirevic Z. Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. – №. 9.
267. Stein W. et al. Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2013. – T. 166. – №. 1. – C. 10-13.
268. St-Pierre J. et al. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development //Epigenetics. – 2012. – T. 7. – №. 10. – C. 1125-1132.
269. Syddall H. E. et al. Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study //American journal of epidemiology. – 2005. – T. 161. – №. 11. – C. 1074-1080.
270. Tabano S. et al. Epigenetic modulation of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction //Epigenetics. – 2010. – T. 5. – №. 4. – C. 313-324.

271. Tannetta D., Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? //Current hypertension reports. – 2013. – T. 15. – №. 6. – C. 590-599.
272. Thiebaugeorges O. et al. Diagnosis of small-for-gestational-age fetuses between 24 and 32 weeks, based on standard sonographic measurements //Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2000. – T. 16. – №. 1. – C. 49-55.
273. Thummala M. R., Raju T. N. K., Langenberg P. Isolated single umbilical artery anomaly and the risk for congenital malformations: a meta-analysis //Journal of pediatric surgery. – 1998. – T. 33. – №. 4. – C. 580-585.
274. Tikkanen M. Placental abruption: epidemiology, risk factors and consequences //Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 2011. – T. 90. – №. 2. – C. 140-149.
275. Tycko B. Imprinted genes in placental growth and obstetric disorders //Cytogenetic and genome research. – 2006. – T. 113. – №. 1-4. – C. 271-278.
276. Tzschope A. et al. Intrauterine growth restriction (IUGR) is associated with increased leptin synthesis and binding capability in neonates //Clinical endocrinology. – 2011. – T. 74. – №. 4. – C. 459-466.
277. Uerpaiojkit B. et al. Cerebellar Doppler velocimetry in the appropriate-and small-for-gestational-age fetus //Obstetrics & Gynecology. – 1996. – T. 87. – №. 6. – C. 989-993.
278. Unterscheider J. et al. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study //American journal of obstetrics and gynecology. – 2013. – T. 208. – №. 4. – C. 290. e1-290. e6.
279. Vähätalo R. et al. Expression of transcription factor GATA-6 in alveolar epithelial cells is linked to neonatal lung disease //Neonatology. – 2011. – T. 99. – №. 3. – C. 231-240.
280. Vaiman D. Genes, epigenetics and miRNA regulation in the placenta //Placenta. – 2017. – T. 52. – C. 127-133.

281. Varvarigou A. A. Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood //Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. – 2010. – T. 23. – №. 3. – C. 215-224.
282. Vayssière C. et al. Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2015. – T. 193. – C. 10-18.
283. Virji S. K. The relationship between alcohol consumption during pregnancy and infant birthweight: an epidemiologic study //Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. – 1991. – T. 70. – №. 4-5. – C. 303-308.
284. Wallenstein M. B. et al. Fetal congenital heart disease and intrauterine growth restriction: a retrospective cohort study //The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. – 2012. – T. 25. – №. 6. – C. 662-665.
285. Wataganara T. et al. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18 //Human genetics. – 2003. – T. 112. – №. 2. – C. 204-208.
286. Weiss J. L. et al. Threatened abortion: a risk factor for poor pregnancy outcome, a population-based screening study //American journal of obstetrics and gynecology. – 2004. – T. 190. – №. 3. – C. 745-750.
287. Werner H., Le Roith D. New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia //Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2000. – T. 57. – №. 6. – C. 932-942.
288. White H. E. et al. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 9.
289. Wilkins-Haug L., Roberts D. J., Morton C. C. Confined placental mosaicism and intrauterine growth retardation: a case-control analysis of placentas at delivery //American Journal of Obstetrics & Gynecology. – 1995. – T. 172. – №. 1. – C. 44-50.

290. Wojdacz T. K., Dobrovic A., Hansen L. L. Methylation-sensitive high-resolution melting //Nature protocols. – 2008. – T. 3. – №. 12. – C. 1903.
291. Wolstenholme J., Rooney D. E., Davison E. V. Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective UK collaborative survey //Prenatal diagnosis. – 1994. – T. 14. – №. 5. – C. 345-361.
292. World Health Organization et al. Report of a scientific group on health statistics methodology related to perinatal events //Geneva: World Health Organization. – 1974. – C. 1-32.
293. WHO Multicentre Growth Reference Study Group et al. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age //Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement. – 2006. – T. 450. – C. 76.
294. Xiao X. et al. Fetal growth restriction and methylation of growth-related genes in the placenta //Epigenomics. – 2016. – T. 8. – №. 1. – C. 33-42.
295. Xu H., Simonet F., Luo Z. C. Optimal birth weight percentile cut-offs in defining small-or large-for-gestational-age //Acta Paediatrica. – 2010. – T. 99. – №. 4. – C. 550-555.
296. Yamamoto R. et al. Ultrasonographic prediction of antepartum deterioration of growth-restricted fetuses after late preterm //Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. – 2018. – T. 44. – №. 6. – C. 1057-1062.
297. Yasuda M. et al. Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy //Obstetrics & Gynecology. – 1995. – T. 86. – №. 4. – C. 555-559.
298. Ye J. et al. Influences of the gut microbiota on DNA methylation and histone modification //Digestive diseases and sciences. – 2017. – T. 62. – №. 5. – C. 1155-1164.
299. Yi Y. et al. TGF- $\beta$ 1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2 //Placenta. – 2018. – T. 68. – C. 44-51.
300. Zeitlin J. et al. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort //The Journal of pediatrics. – 2010. – T. 157. – №. 5. – C. 733-739. e1.

301. Zhong X. et al. Heat shock protein 70 is upregulated in the intestine of intrauterine growth retardation piglets //Cell Stress and Chaperones. – 2010. – T. 15. – №. 3. – C. 335-342.
302. Zhong Y., Tuuli M., Odibo A. O. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction //Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2010. – T. 30. – №. 4. – C. 293-308.
303. Zhou Z. et al. Independent manipulation of histone H3 modifications in individual nucleosomes reveals the contributions of sister histones to transcription //Elife. – 2017. – T. 6. – C. e30178.