На правах рукописи

КАРАПЕТЯН

Анна Овиковна

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ (ПРЕЭКЛАМПСИИ, ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ) НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЛОДА В МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2019

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

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор Баев Олег Радомирович

кандидат биологических наук Красный Алексей Михайлович

Официальные оппоненты:

Шалина Раиса Ивановна - доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии, профессор

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

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

Защита диссертации состоится «19» марта 2019 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

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

Автореферат разослан «___» _____2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Наиболее актуальными проблемами современного акушерства в настоящее время являются преэклампсия (ПЭ) и преждевременные роды (ПР), которые определяют наибольшее число неблагоприятных исходов беременности и родов (Сидорова И.С. и соавт., 2013; Ходжаева З.С. и соавт., 2013; Серов В.Н. и соавт., 2014; Шалина Р.И. и соавт., 2017). Диагностика этих осложнений нередко оказывается запоздалой (Савельева Г.М. и соавт., 2015; Панова И.А. и соавт., 2017). Эффективность использования известных прогностических маркеров остается низкой.

В 1997-1998 гг. Lo и соавторами впервые было продемонстрировано наличие последовательностей внеклеточной ДНК плода (пДНК) в материнской крови (Lo Y.M.D. et al., 1998). Основным источником пДНК являются клетки трофобласта, которые подвергаются апоптозу и находящиеся внутри нуклеиновые кислоты, включая РНК и ДНК, попадают в кровоток женщины. Известными маркерами пДНК являются *SRY* и *DYS-14* гены Y-хромосомы, *RHD* ген, а также *maspin (SERPINB5), DSCR3, RASSF1A* гены. Однако часть маркеров ограничивают выборку по полу плода (*SRY, DYS-14*), резус-принадлежности (*RHD*) и могут подвергаться деградации (более 90% пДНК) при определении (*maspin (SERPINB5)*).

В ряде исследований было показано, что осложнения беременности, ассоциированные с плацентарной дисфункцией, такие как ПЭ и ПР, сопровождаются изменениями концентрации пДНК в материнской крови (AbdelHalim R. et al., 2016; El-Garf W. et al., 2013). Однако имеющиеся на сегодняшний день данные о прогностическом значении пДНК противоречивы. Ряд авторов выявили повышение концентрации пДНК при развитии ПЭ, в то время как другие обнаружили снижение (Jakobsen T. et al., 2013). Нет единого мнения относительно прогнозирования ПР (Poon L. et al., 2013; Quezada M. et al., 2015; Dugoff L. et al., 2016). Расхождения имеются

также в сроках беременности, при которых изменяется концентрация пДНК, влиянии материнских и плодово-плацентарных факторов. Следовательно, изучение изменений уровня пДНК в материнской крови с учетом срока беременности, материнских и плодово-плацентарных факторов при помощи методики, не ограничивающей выборку, представляет актуальный интерес.

Цель исследования

Разработать систему прогнозирования осложнений беременности (преэклампсии, преждевременных родов) на основе определения внеклеточной пДНК в материнской крови.

Задачи исследования

1. Определить зависимость изменений концентрации пДНК в плазме крови женщины от срока беременности при неосложненном ее течении.

2. Оценить влияние материнских (возраст, паритет, индекс массы тела, курение) и плодово-плацентарных факторов (масса плода, плаценты) на концентрацию пДНК в материнской крови в течение беременности.

3. Определить зависимость между концентрацией пДНК в плазме крови женщины и развитием осложнений беременности (ПЭ, ПР).

4. Выявить корреляцию между концентрацией пДНК в материнской крови и общепринятыми клинико-лабораторными маркерами осложнений беременности (PAPP-A, b-ХГЧ, sFlt-1, PlGF, ультразвуковое и допплерометрическое исследование кровотока в маточном и плодово-плацентарном бассейнах, длина шейки матки).

5. Определить прогностическую ценность измерения концентрации пДНК в плазме крови беременной женщины для прогнозирования и ранней диагностики осложнений беременности (ПЭ, ПР).

Научная новизна

Впервые методом определения гиперметилированной части *RASSF1A* гена в крови у женщин исследовано содержание и динамика изменений внеклеточной плодовой, материнской и общей ДНК в течение I, II и III триместров неосложненной беременности, при развитии ПЭ и ПР.

Полученные данные составили основу для разработки прогностических моделей развития ПЭ и ПР.

Анализ полученных данных показал отсутствие корреляции между концентрацией внеклеточной ДНК и возрастом, ИМТ женщины, паритетом родов, полом, массой и длинной тела новорожденного, а также массой плаценты, что позволяет исключить влияние этих факторов на уровень ее содержания.

Выявлено, что у женщин с ПЭ концентрация общей ДНК (оДНК) и ее фракций выше по сравнению с неосложненным течением беременности. При этом она не меняется в первой ее половине, но значительно возрастает к 30-32 неделям. У женщин с ПЭ обнаружена обратная зависимость между содержанием внеклеточной оДНК и ее фракций с уровнем b-ХГЧ, сроком родов, массой и длиной тела новорожденного. Уровень пДНК находился в прямой зависимости от уровня систолического АД, но был обратно пропорционален сроку манифестации преэклампсии.

В конце I триместра беременности уровень внеклеточной оДНК и ее фракций у женщин с ПР был достоверно выше, чем при неосложненном течении беременности. Обнаружено, что увеличение концентрации пДНК характерно для ПР со спонтанным началом родовой деятельности при интактных оболочках и не характерно для родов, которые начались с преждевременного разрыва плодных оболочек. У женщин с ПР концентрация пДНК обратно пропорциональна длине шейки матки.

На всех сроках беременности уровень внеклеточной пДНК в группе женщин с ПЭ был достоверно выше, чем при ПР.

Практическая значимость

В процессе данной работы разработана модифицированная методика определения пДНК с помощью исследования гиперметилированной части гена *RASSF1A*. Разработаны нормативные значения содержания внеклеточной ДНК и представлена динамика изменения её концентрации при неосложненной беременности. Разработаны модели прогнозирования и

ранней диагностики осложнений беременности, ассоциированных с плацентарной дисфункцией.

В результате исследования создан алгоритм прогнозирования и ранней диагностики осложнений беременности, основанный на определении концентрации внеклеточной пДНК в материнской крови.

Положения, выносимые на защиту

1. С увеличением срока неосложненной беременности концентрация внеклеточной пДНК достоверно повышается, что обусловлено процессами апоптоза в плаценте. Уровень внеклеточной материнской ДНК (мДНК) достоверно возрастает со второй половины беременности, что отражает усиление оксидативного стресса и иммунного воспалительного ответа.

2. Начиная с ранних сроков гестации концентрация внеклеточной пДНК у беременных с преэклампсией значительно выше, чем при неосложненной беременности, что указывает на нарушение инвазии трофобласта с формированием плацентарной дисфункции. Увеличение концентрации пДНК прогрессирует со сроком беременности и наиболее выражено при ранних и тяжелых формах преэклампсии. Внеклеточная мДНК также повышена на всех сроках гестации и значительно нарастает во второй половине беременности, что отражает характерное для преэклампсии повышение уровня оксидативного стресса.

3. Концентрация внеклеточной пДНК у женщин с преждевременными родами значительно превышает норму в 11-14 недель беременности, что свидетельствует о нарушении инвазии трофобласта. В течение беременности концентрация пДНК повышается к 30-32 неделям. При этом у женщин со спонтанным преждевременным развитием родовой деятельности при интактных плодных оболочках уровень пДНК в динамике беременности повышается незначительно, тогда как в группе женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек относительно невысокий исходный уровень достоверно возрастает во второй половине беременности.

4. У женщин с преэклампсией содержание внеклеточной пДНК превышает соответствующее значение в группе женщин с преждевременными родами на всех сроках, а уровень внеклеточной мДНК только во второй половине беременности, что свидетельствует о более тяжелой степени плацентарной дисфункции при преэклампсии.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении тематики научной работы, постановке цели и задач, разработке дизайна, заборе биологического материала, анализе клинико-анамнестических данных, статистической обработке полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

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

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы представлены на XVIII Всероссийском форуме «Мать и Дитя», XIII Мировом конгрессе по перинатальной медицине (Белград, Сербия), XXVI Европейском конгрессе «European Board & College of Obstetrics and Gynecology» (Париж, Франция), XXVI Европейском конгрессе по перинатальной медицине (Санкт-Петербург, Россия), конгрессе «Birth. Clinical challenges in labor and delivery» (Венеция, Италия). Работа обсуждена на межклинической конференции (13.06.2018 г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (18.06.2018 г., протокол № 7).

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанные на основании полученных результатов модели прогнозирования преэклампсии и преждевременных родов внедрены и

используются в практической деятельности акушерских отделений ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 76 рисунками. Использованная литература включает 27 источников на русском и 174 источника на английском языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В соответствии с целью и задачами исследования в ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2016 по 2017 гг. было обследовано 1012 беременных женщин.

Критериями включения в исследование явились: возраст пациенток от 18 до 45 лет, европеоидная раса, одноплодная беременность, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения: австралоидная, негроидная, монголоидная расы, хромосомные аномалии и пороки развития у плода и плаценты, аномалии прикрепления и расположения плаценты, многоплодная беременность, онкологические заболевания, острая фаза и обострение хронических инфекционных заболеваний, аутоиммунные заболевания, инвазивные пренатальные исследования, трансплантация органов.

В дальнейшем 432 женщины были исключены из исследования (выход из-под наблюдения, отказ продолжения) и в анализ вошли 580 пациенток.

Всем женщинам проведено общеклиническое, клинико-лабораторное, инструментальное, специальное обследование и патоморфологическое исследование плаценты. Специальные методы исследования включали определение концентрации внеклеточной ДНК и ее фракций.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и программных пакетов «MedCalc Statistical», «IBM SPSS Statistics 20». Для определения различий между группами применяли тест Манна-Уитни, Вилкоксона, X^2. Определяя корреляции между количественными показателями рассчитывали ранговый коэффициент Спирмана. При $p \leq 0.05$ выводы считали значимыми. Оценка прогностической значимости проведена по результатам ROC-анализа. Влияние независимых переменных на развитие одного признака оценивали методом регрессионного анализа.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Внеклеточная ДНК в динамике неосложненной беременности

Определение внеклеточной ДНК проведено у 22 женщин с неосложненным течением беременности и родов. Возраст женщин составил в среднем 30.1±4.1 года (24-39 лет), все пациентки имели нормальный исходный ИМТ (в среднем 20.7±2.3 кг/м^2).

Уровень внеклеточной оДНК и мДНК был стабильным до 24-26 недель беременности, но возрастал к 30-32 неделям **(Рис. 1)**.

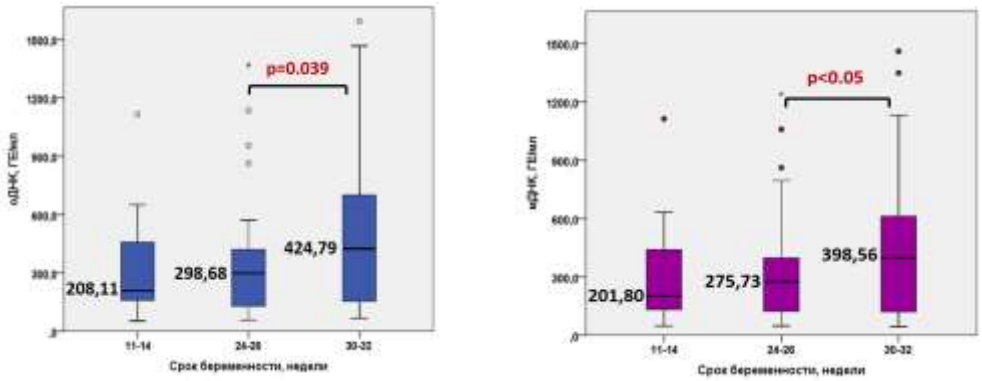


Рисунок 1. Концентрация оДНК и мДНК в динамике неосложненной беременности (ГЕ/мл)

Внеклеточная ДНК появляется в крови путем высвобождения из неповрежденных клеток, в результате апоптоза, а также по завершению дифференцировки эритробластов и в процессе созревания тромбоцитов. При неосложненном течении беременности к III триместру повышается уровень

активных форм кислорода, что приводит к усилению иммунного воспалительного ответа с увеличением количества клеток крови, что объясняет увеличение концентрации мДНК. В 11-14 недель пДНК определялась во всех наблюдениях с последующим повышением уровня в течение беременности, что отражает степень выраженности апоптотических изменений плаценты **(Рис. 2)**.

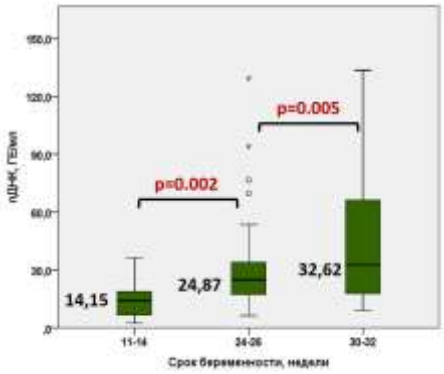


Рисунок 2. Концентрация пДНК в динамике неосложненной беременности (ГЕ/мл)

Не обнаружено различий в концентрации пДНК в динамике беременности в зависимости от пола плода и паритета родов, так как использованный нами маркер *RASSF1A* обладает высокой чувствительностью и позволяет определить пДНК как у плодов мужского, так и женского, а также вследствие полной элиминации пДНК из материнской крови после родов. При неосложненной беременности не обнаружено зависимости между уровнем внеклеточной ДНК и сроком начала родов. Корреляционный анализ не выявил связи между содержанием внеклеточной ДНК и возрастом, ИМТ женщины, массой и длиной тела новорожденного, массой плаценты.

Внеклеточная ДНК в материнской крови при преэклампсии

Количество наблюдений с ПЭ составило 3.4% (20 женщин), что коррелирует с мировыми данными ее частоты. Ранняя (рПЭ) и поздняя ПЭ (пПЭ) встречались у равного количества женщин. При рПЭ тяжелое течение наблюдалось у половины беременных, при пПЭ – у 2 беременных. При сравнении пациенток с ПЭ (20 наблюдений) и без ПЭ (560 наблюдений)

выявлена б**о**льшая частота ПЭ в анамнезе (3 (15.0%) против 20 (3.6%), **p=0.013**), ХАГ (3 (15.0%) против 17 (3.0%), **p=0.006**) и отеков в третьем триместре беременности (12 (60.0%) против 158 (28.2%)**, p=0.000**) в группе ПЭ. Индекс массы тела (ИМТ) в среднем составил 23.5±5.2 кг/м^2, что значимо больше, чем в контрольной группе (20.7±2.3 кг/м^2, **p=0.036**). Значимые различия выявлены в частоте мутаций генов тромбофилии низкого риска (8 (40.0%) в группе ПЭ против 2 (9.1%) в контрольной группе, **p=0.042),** заболеваний желудочно-кишечного тракта (12 (60.0%) против 5 (22.7%), **p=0.025)**. У женщин из группы ПЭ первый триместр беременности чаще осложнялся угрозой прерывания (9 (40.9%) против 0, **p=0.032**), третий триместр – отеками (12 (60.0%) против 5 (22.7%), **p=0.025**). У женщин с ПЭ значения исходного дАД, а также дАД в I и II триместрах беременности превышали цифры у женщин группы контроля (70.0 (60.0-80.0) против 60.0 (55.0-80.0), 70.0 (60.0-90.0) против 60.0 (60.0-80.0), 70.0 (60.0-110.0) против 60.0 (60.0-80.0), соответственно) **(p<0.05)**. При сравнении данных допплерометрии во время скрининга I триместра выявлено более высокое значение среднего ПИ МА в группе ПЭ (медиана 1.57 (1.41-1.97) против 1.37 (1.14-1.52), **p=0.026**). Срок родов в группе ПЭ был меньше (медиана 272.5 (227.0-292.0) против 281.5 (264.0-288.0), **p=0.028**), количество ПР и частота КС больше (7 (35.0%) против 0 **(p=0.050)** и 14 (70.0%) против 6 (27.3%) **(p=0.013)**, соответственно). ЗРП выявлено у 4 новорожденных из группы ПЭ.

Концентрация оДНК и мДНК в группе ПЭ значимо не менялась от 11-14 к 24-26 неделям беременности, но увеличивалась к 30-32 неделям **(Рис. 3)**.

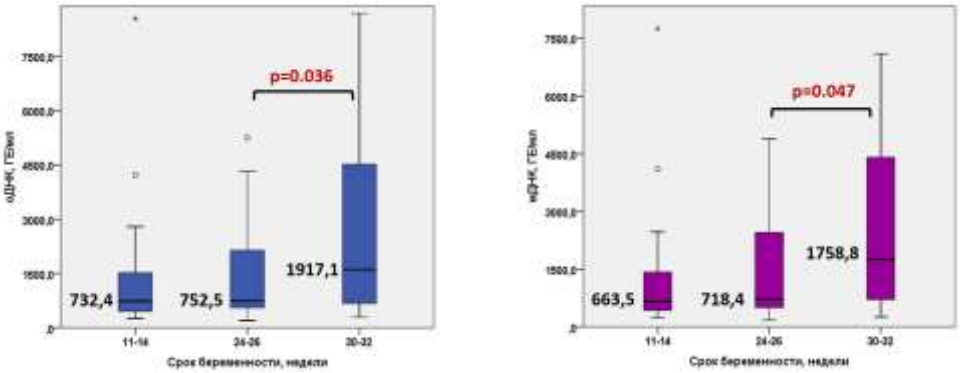
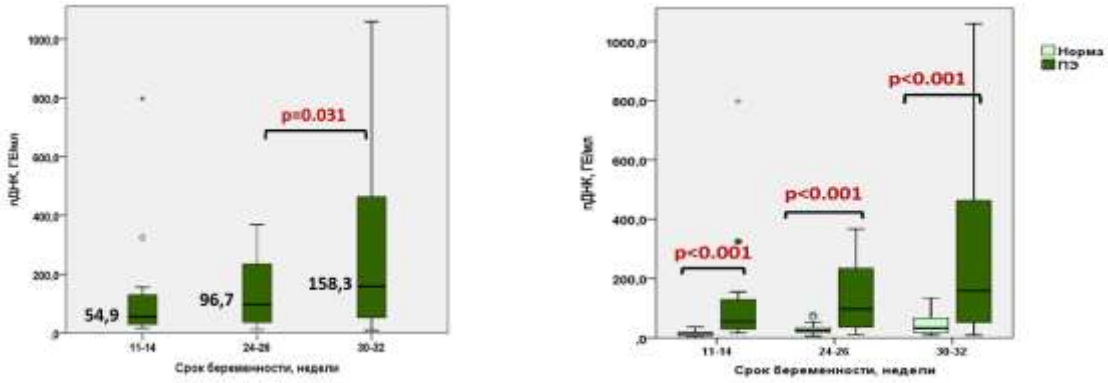


Рисунок 3. Концентрация оДНК и мДНК при ПЭ (ГЕ/мл)

При ПЭ содержание оДНК и мДНК превышало уровень при неосложненном течении беременности на всех сроках **(p≤0.001)**. Объяснением является ишемия и разрушение клеток трофобласта, нарушение продукции ангиогенных и антиангиогенных факторов, усиление системной воспалительной реакции, эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс с увеличением нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения. Концентрация пДНК также увеличивалась к 30-32 неделям и превышала уровень неосложненной беременности на всех сроках **(Рис. 4)**.



А **Б**

Рисунок 4. Концентрация пДНК при ПЭ в динамике беременности (А), по сравнению с неосложненным течением беременности (Б) (ГЕ/мл)

Обнаруженные различия указывают, что пДНК является маркером ишемии плаценты и развития ПЭ с ранних сроков беременности.

Анализ содержания внеклеточной ДНК в зависимости от срока манифестации ПЭ показал, что при ранней ПЭ (рПЭ) уровень оДНК

повышался, начиная с 11-14 недель, мДНК – с 24-26 недель **(Рис. 5)**. При поздней ПЭ (пПЭ) концентрация оДНК и мДНК не менялась в течение беременности **(Рис. 5)**.

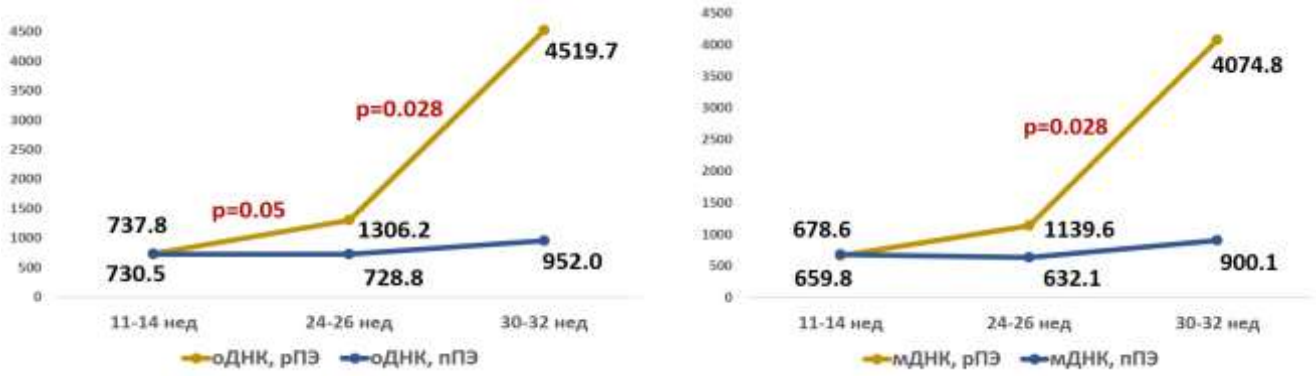


Рисунок 5. Изменение концентрации оДНК и мДНК при ранней и поздней ПЭ (ГЕ/мл)

Содержание оДНК и мДНК было больше при рПЭ и пПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности на всех сроках (при рПЭ **p<0.001**, при пПЭ **p≤0.046**). Уровень пДНК увеличивался в течение беременности при рПЭ и не менялся при пПЭ **(Рис. 6)**.

Рисунок 6. Изменение концентрации пДНК при ранней и поздней ПЭ (ГЕ/мл)

Объяснением обнаруженной динамики является различие в степени прогрессирования апоптоза. По сравнению с неосложненным течением беременности концентрация пДНК была достоверно больше при рПЭ на всех сроках **(p<0.001)**, при пПЭ – в первой половине беременности **(p≤0.026)**.

Концентрация внеклеточной ДНК была проанализирована в зависимости от тяжести ПЭ, умеренная – уПЭ (65%) и тяжелая – тПЭ (35%). Как при уПЭ, так и тПЭ отмечено незначительное увеличение содержания оДНК и мДНК во второй половине беременности **(Рис. 7)**.

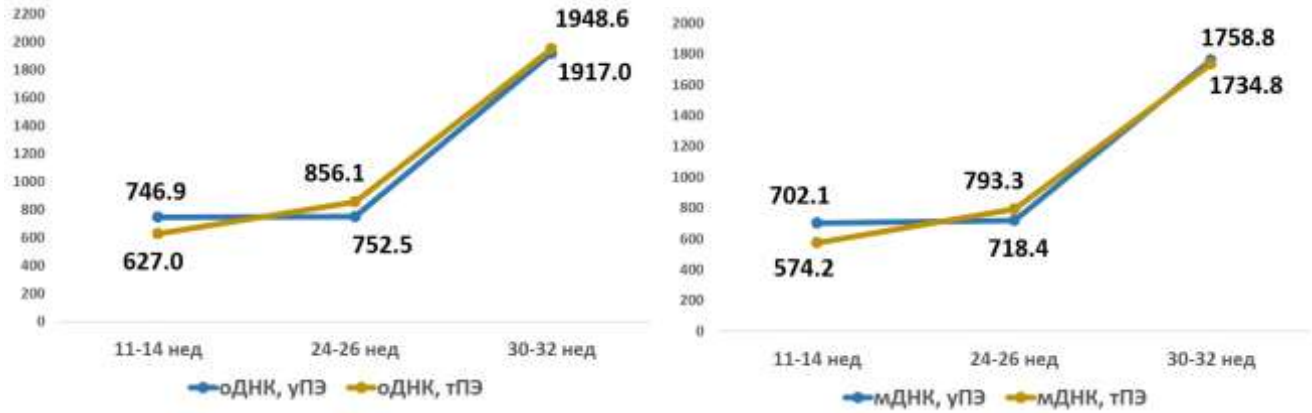


Рисунок 7. Изменение концентрации оДНК и мДНК при умеренной и тяжелой ПЭ (ГЕ/мл)

Независимо от тяжести ПЭ уровень пДНК был всегда выше, чем при неосложненном течении беременности (**p≤0.008**). Но если при уПЭ концентрация пДНК в динамике увеличивалась незначительно, то при тПЭ выявлено значимое повышение **(Рис. 8)**.

Рисунок 8. Изменение концентрации пДНК при умеренной и тяжелой ПЭ (ГЕ/мл)

В группе ПЭ корреляционный анализ обнаружил обратную зависимость между уровнем пДНК и сроком манифестации ПЭ **(r= -0.513; p=0.035)**, оДНК с ее фракциями и сроком беременности на момент родоразрешения (оДНК и мДНК **r= -0.537,** пДНК **r= -0.541**; **p<0.05**).

По данным ROC-анализа концентрация оДНК 401.41 ГЕ/мл в 11-14 недель гестации позволяет прогнозировать развитие ПЭ с чувствительностью 80.0% и специфичностью 72.7%, концентрация мДНК 334.46 ГЕ/мл – с 85.0% и 72.7%, соответственно (площадь под кривой **0.882**, **p<0.001**). В 24-26 недель при концентрации оДНК 467.08 ГЕ/мл и мДНК 422.49 ГЕ/мл чувствительность и специфичность составили 82.4% и 77.3% (площадь под кривой **0.824** и **0.812**, **p=0.001**), в 30-32 недели при оДНК 582.93 ГЕ/мл и мДНК 526.69 ГЕ/мл 82.4% и 71.4% (площадь под кривой **0.852** и **0.846**, **p<0.001**). Концентрация внеклеточной пДНК прогнозирует развитие ПЭ с чувствительностью 85.0% и специфичностью 81.8% (cut-off – 22.54 ГЕ/мл) в 11-14 недель (площадь под кривой **0.920**, **p<0.001**), с чувствительностью 82.4% и специфичностью 77.3% (cut-off – 34.01 ГЕ/мл) в 24-26 недель (площадь под кривой **0.830**, **p<0.001**), с чувствительностью 82.4% и специфичностью 61.9% (cut-off – 45.95 ГЕ/мл) в 30-32 недели (площадь под кривой **0.824**, **p=0.001**) **(Рис. 9)**. Таким образом, наибольшей прогностической значимостью в отношении развития ПЭ обладает концентрация пДНК в 11-14 недель беременности.

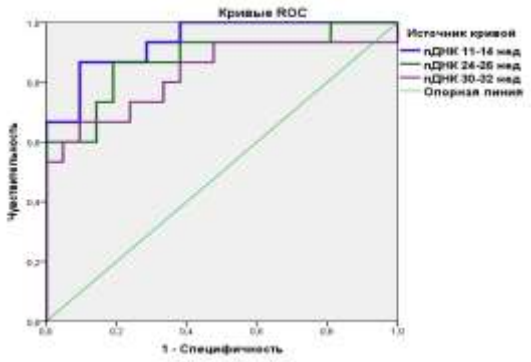


Рисунок 9. ROC-кривые пДНК в исследуемые сроки беременности

Нами разработана прогностическая модель развития ПЭ: $p = 1 / (1 + e^{-z})$, где **z = 0.143 * [пДНК (11-14 недель)] + 2.138 * [ПИ в маточных артериях (11-14 недель)] – 7.335**. Согласно проведенному ROC-анализу, площадь под кривой составила AUC=**0.957**, пороговая точка отсечки (cutoff) составила 0.51 при уровне чувствительности 90.0% и специфичности 90.9% **(p<0.001)**.

Внеклеточная ДНК в материнской крови при преждевременных родах

Из 580 обследованных женщин преждевременное родоразрешение произошло у 49 (8.4%). Из них отобраны 19 (3.3%) пациенток с преждевременным родоразрешением вследствие спонтанного развития регулярной родовой деятельности. Ранние ПР произошли у 4 (21.1%) женщин (срок беременности от 218 до 235 дней, медиана 222 дня). В остальных наблюдениях срок родов составил от 240 до 258 дней (медиана 255 дней). Средний возраст женщин с ПР – 31.05 ± 4.22 года, различий с контрольной группой не выявлено. Средний ИМТ в группе ПР составил 20.83±2.45 кг/м^2 и не отличался от группы контроля. Выявлены различия в частоте встречаемости мутаций генов тромбофилии низкого риска (9 (47.4%) против 2 (9.1%), **p=0.021**), также у женщин с ПР чаще встречались ВЗОМТ (18 (94.7%) против 14 (63.3%), **p=0.019**), выскабливание стенок полости матки (8 (42.1%) против 0, **p=0.036**). Как известно, ВЗОМТ, а также дилатация шейки матки с кюретажем в несколько раз повышают риск развития ПР. В группе ПР чаще первый триместр осложнялся симптомами угрожающего выкидыша (12 (63.1%) против 0, **p=0.017**), швы на шейку матки наложены 10 (52.6%) беременным **(p=0.024)**. Анализ данных допплерометрии выявил более высокое значение ПИ МА в группе ПР во время скрининга I триместра по сравнению с неосложненным течением беременности (медиана 1.63 (1.39-1.90) и 1.37 (1.14-1.52), соответственно; **p=0.023**). Срок беременности на момент родов в группе ПР составил от 218 до 258 дней (медиана 254 дня). У 10 (52.6%) беременных развилась

регулярная родовая деятельность, в 9 (47.4%) наблюдениях произошло преждевременное излитие околоплодных вод с последующим спонтанным началом регулярных схваток. В группе ПР родилось 15 (78.9%) мальчиков, что значимо больше, чем в контрольной группе **(p=0.035)**. По данным исследований при мужском поле плода чаще встречаются воспалительные поражения тканей в области имплантации плаценты, а также значимо выше концентрация провоспалительных цитокинов в материнской крови. По массе и длине тела новорожденных также выявлены значимые различия (медиана 2690.0 (1492.0-3320.0) граммов, 48.0 (38.0-53.0) см, **p<0.001**).

У женщин с ПР концентрация оДНК и мДНК менялась незначительно в течение беременности **(Рис. 10)**.

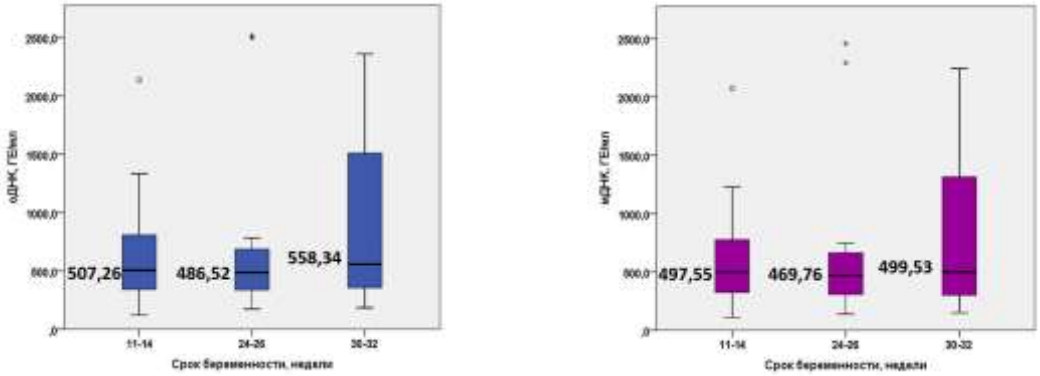
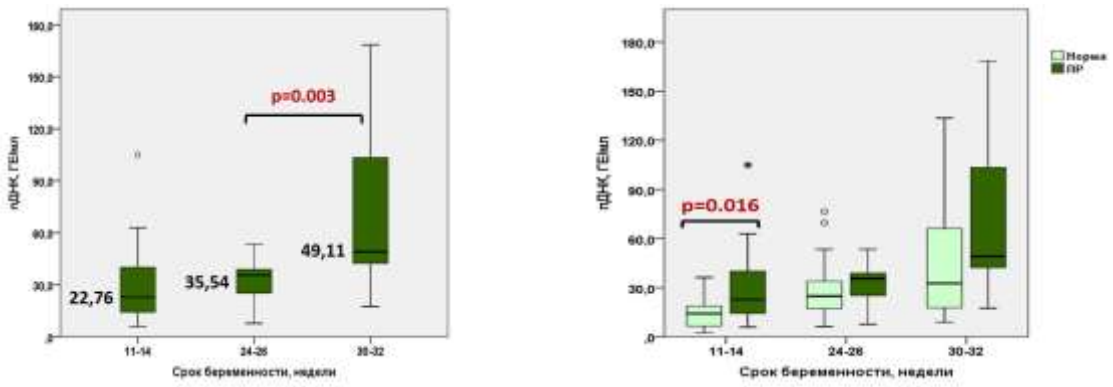


Рисунок 10. Концентрация оДНК и мДНК при ПР (ГЕ/мл)

При ПР содержание оДНК и мДНК достоверно превышало значение при неосложненном течении беременности в 11-14 и 24-26 недель (**p≤0.002** и **p≤0.047**, соответственно). Концентрация пДНК при ПР повышалась только во второй половине беременности, однако превышала значение нормы лишь в 11-14 недель, что является подтверждением роли нарушения плацентации в инициации ПР **(Рис. 11).**



А **Б**

Рисунок 11. Концентрация пДНК при ПР в динамике беременности (А), по сравнению с неосложненным течением беременности (Б) (ГЕ/мл)

Мы проанализировали концентрацию внеклеточной ДНК в группе ПР с учетом ПРПО у 9 (47.4%) беременных. У женщин с ПР без ПРПО содержание оДНК и мДНК не менялось в динамике, в то время как при ПРПО отмечалось незначительное снижение в первой половине беременности с последующим увеличением к 30-32 неделям **(Рис. 12)**.

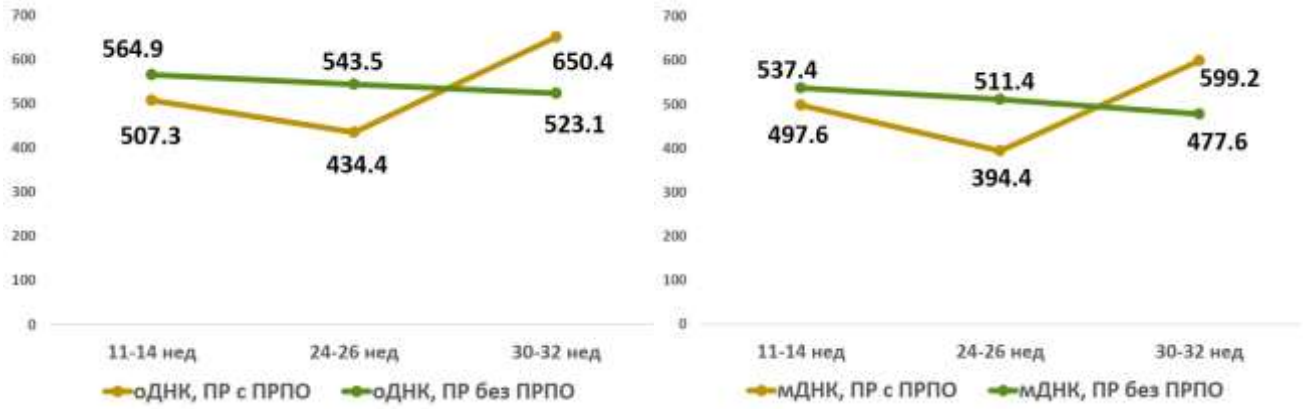


Рисунок 12. Изменение концентрации оДНК и мДНК у женщин с ПР при ПРПО и без (ГЕ/мл)

У женщин с ПР содержание пДНК значительно увеличивалось во второй половине беременности при ПРПО, что возможно явилось следствием активации иммунологических механизмов **(Рис. 13)**. При сравнительном

анализе с контрольной группой концентрация пДНК была достоверно больше только у женщин с ПР без ПРПО в 11-14 недель **(p=0.005)**.

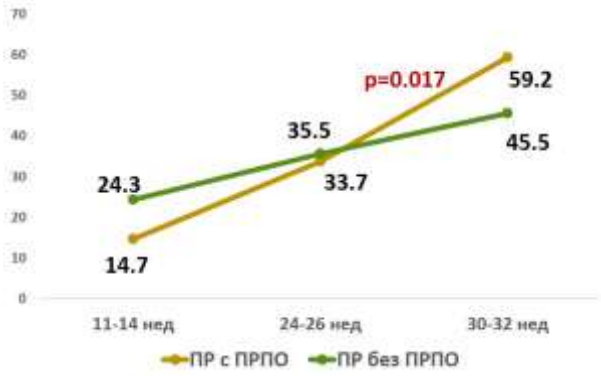


Рисунок 13. Изменение концентрации пДНК при ПР с ПРПО и без (ГЕ/мл)

При корреляционном анализе выявлена обратная зависимость между уровнем пДНК в 24-26 недель и длиной шейки матки на данном сроке **(r= -0.723, p=0.043)**.

По данным ROC-анализа в 11-14 недель концентрация оДНК 377.00 ГЕ/мл и мДНК 349.05 ГЕ/мл позволяет прогнозировать развитие ПР с чувствительностью 73.7% и специфичностью 72.7% (площадь под кривой **0.797** и **0.789**, **p=0.001 и 0.002**, соответственно). В 24-26 недель при концентрации оДНК 394.19 ГЕ/мл и мДНК 355.64 ГЕ/мл чувствительность и специфичность для развития ПР составили 66.7% и 72.7% (площадь под кривой **0.687** и **0.684**, **p=0.044 и 0.047**, соответственно). В 30-32 недели концентрация оДНК и мДНК не обладает прогностической значимостью в отношении ПР (p>0.05). Концентрация внеклеточной пДНК прогнозирует развитие ПР с чувствительностью 60.0% и специфичностью 76.2% (cut-off – 18.70 ГЕ/мл) в 11-14 недель (площадь под кривой **0.708**, **p=0.036**), с чувствительностью 80.0% и специфичностью 57.1% (cut-off – 42.30 ГЕ/мл) в 30-32 недели (площадь под кривой **0.711**, **p=0.033**) **(Рис. 14)**. В 24-26 недель уровень пДНК не обладает достоверной прогностической значимостью в отношении ПР.

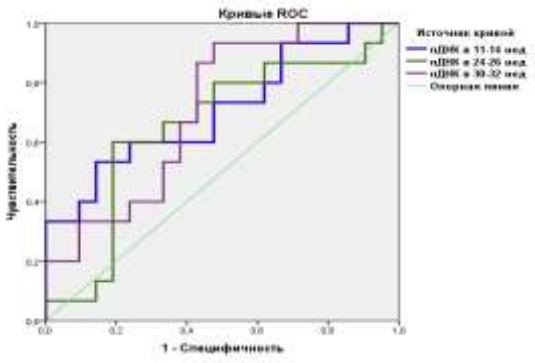


Рисунок 14. ROC-кривые пДНК в исследуемые сроки беременности

Нами разработана прогностическая модель развития ПР: $p = 1 / (1 + e^{-z})$, где **z = 0.066 * [пДНК (11-14 недель)] – 11.067 * [угроза прерывания беременности (11-14 недель)] + 8.567**. Согласно проведенному ROC-анализу, площадь под кривой составила AUC=**0.751**, что указывает на «хорошее» качество модели. Пороговая точка отсечки (cut-off) составила 0.99 при уровне чувствительности 63.2% и специфичности 100% **(p=0.006)**.

Сравнительный анализ внеклеточной ДНК у женщин с преэклампсией и преждевременными родами

Концентрация оДНК и мДНК была достоверно больше при ПР в 11-14 и 24-26 недель, а при ПЭ на всех сроках по сравнению с неосложненным течением беременности. При ПЭ медиана концентрации оДНК и мДНК в 24-26 и в 30-32 недели была достоверно больше, чем при ПР (**p=0.015** и **p=0.027, p=0.008** и **p=0.007**, соответственно). По сравнению с неосложненным течением беременности концентрация пДНК была достоверно больше при ПР только на сроке беременности 11-14 недель, в то время как при ПЭ – на всех сроках. При сравнительном анализе было выявлено, что уровень пДНК на всех сроках был выше при ПЭ, чем при ПР. Таким образом, у женщин с развитием ПЭ более выражено нарушение инвазии хориона, что сопровождается более высокой интенсивностью апоптоза клеток трофобласта по сравнению с ПР.

ВЫВОДЫ

1. В изученной нами популяции частота преэклампсии составила 3.4%, у 1.7% беременных имела место ранняя преэклампсия, у 1.7% – поздняя. Умеренная преэклампсия диагностирована у 2.2% женщин, тяжелая – у 1.2%.

Частота преждевременных родов в нашем исследовании составила 8.4%, среди которых 5.3% – преждевременные роды со спонтанным началом родовой деятельности при интактных плодных оболочках или их преждевременном разрыве.

2. При неосложненной беременности уровень внеклеточной ДНК плода повышается от первого триместра к третьему. Уровень внеклеточной материнской ДНК повышается только во второй половине беременности, что сопровождается увеличением концентрации общей ДНК.

3. По сравнению с неосложненной беременностью у женщин с преэклампсией концентрация внеклеточной ДНК плода достоверно выше на всех сроках гестации (медиана в 11-14 недель 54.85 (29.10-131.83) против 14.15 (6.55-19.40) ГЕ/мл, в 24-26 недель 96.72 (35.11-251.39) против 24.87 (15.61-38.80) ГЕ/мл, в 30-32 недели 158.30 (49.43-514.16) против 32.62 (16.49-71.10) ГЕ/мл). При этом уровень ДНК плода, материнской и общей ДНК значимо возрастает во второй половине гестации. При развитии ранней преэклампсии, а также тяжелых формах, концентрация ДНК плода достоверно нарастает в течение беременности, в то время как при поздней преэклампсии и умеренной степени тяжести меняется незначительно.

4. По сравнению с неосложненной беременностью у женщин со спонтанным началом преждевременных родов при интактных оболочках уровень внеклеточной ДНК плода, материнской и общей ДНК значимо повышены в I триместре (медиана 24.29 (18.29-41.74) против 14.15 (6.55-19.40) ГЕ/мл, 537.36 (249.69-893.81) против 201.80 (131.97-442.70) ГЕ/мл и 564.86 (287.46-933.67) против 208.11 (156.95-461.35) ГЕ/мл). При этом концентрация ДНК плода возрастает незначительно к третьему триместру и

не превышает соответствующее значение при неосложненной беременности, тогда как в группе женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек относительно невысокий исходный уровень значимо возрастает во второй половине беременности.

5. У женщин с преэклампсией уровень внеклеточной ДНК плода значительно выше, чем у женщин с преждевременными родами: 54.85 (29.10-131.83) против 22.76 (14.24-40.45) ГЕ/мл, 96.72 (35.11-251.39) против 35.54 (24.43-39.46) ГЕ/мл, 158.30 (49.43-514.16) против 49.11 (42.06-108.94) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно.

6. При неосложненной беременности содержание внеклеточной ДНК плода не зависит от возраста, индекса массы тела женщины, паритета родов, пола плода, срока родов, массы и длины тела новорожденного, массы плаценты. Также отсутствует корреляция с биохимическими показателями скрининга первого триместра беременности.

7. В отличие от неосложненной беременности у женщин с преэклампсией уровень содержания внеклеточной ДНК плода прямо пропорционален уровню систолического АД и обратно пропорционален содержанию b-ХГЧ во время скрининга первого триместра беременности, сроку манифестации преэклампсии, сроку родов, массе и длине тела новорожденного. Концентрация ДНК плода у женщин с преждевременными родами находится в обратной зависимости с длиной шейки.

8. Сочетание клинических (угроза прерывания беременности), лабораторно-инструментальных (ПИ маточных артерий) данных с результатами определения концентрации внеклеточной ДНК в 11-14 недель беременности позволяет прогнозировать развитие преэклампсии и преждевременных родов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для прогнозирования и ранней диагностики таких осложнений беременности, как преэклампсия и преждевременные роды, рекомендуется: с

этапа постановки на учет по беременности в первом триместре тщательный сбор анамнеза, оценка клинико-анамнестических данных с идентификацией женщин группы высокого риска, определение уровня содержания внеклеточной ДНК плода в этой группе с последующим расчетом вероятности развития осложнения с использованием прогностической модели.

В группу риска по развитию ПЭ следует отнести беременных с ПЭ в анамнезе; ХАГ; ИМТ выше 24,9; угрожающим прерыванием беременности в первом триместре; повышенным пульсационным индексом в маточных артериях в сроках 11-14 недель беременности.

Формула для расчета риска развития ПЭ:

z = 0.143 * [пДНК (11-14 недель)] + 2.138 * [ПИ в маточных артериях (11-14 недель)] – 7.335

Учитывая, что наиболее значимым фактором риска ПР является угрожающее прерывание беременности в первом триместре, этот фактор составляет основу прогностической модели ПР:

z = 0.066 * [пДНК (11-14 недель)] – 11.067 * [угроза прерывания беременности (11-14 недель)] + 8.567

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Identification of potential early biomarkers of preeclampsia / A. Timofeeva, V. Gusar, N. Kan, K. Prozorovskaya, **A. Karapetyan** et al. // **Placenta.** -2018. -№ 61. -С. 61-71.

2. Изменение концентрации внеклеточной ДНК во время беременности / **А. Карапетян**, А. Красный, А. Садекова, Г. Хлестова, И. Балашов, О. Баев // **Акушерство и гинекология**. -2018. -№ 3. -С. 44-50.

3. Роль внеклеточной ДНК плода в прогнозировании больших акушерских синдромов / **А. Карапетян**, М. Баева, О. Баев // **Акушерство и гинекология**. -2018. -№ 4. -С. 10-15.

4. Внеклеточная ДНК в динамике неосложненной беременности / **А. Карапетян**, О. Баев, А. Красный, А. Садекова, С. Муллабаева // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. -2018. -Т. 165. -№ 7. -С. 103-106.

5. Cell-free DNA at normal pregnancy and anemia in relation to BMI / O. Baev, **A. Karapetian**, A. Krasnyi, G. Khlestova, I. Balashov // **J. Perinat. Med.** - 2017. - № 45. P. 522.

6. Maternal plasma cell-free DNA in prediction of preeclampsia / **A. Karapetian**, O. Baev, A. Krasnyi, A. Sadekova, S. Mullabaeva // **Abstracts of 26th Edition of the European congress of obstetrics and gynecology**. -2018. - № A2175AK.

7. Cell free fetal DNA level in blood of women with preterm labor / O. Baev, **A. Karapetian**, A. Sadekova, A. Krasnyi // ECPM congress 2018 poster presentation abstract book. -2018. - Abstract ID 388.

8. The significance of cell foetal DNA (cffDNA) and DAI-receptors (DLM-1/ZBP1) (DNA-dependent activator of IFN-regulatory) expression in preeclampsia / N. Nizyaeva, **A. Karapetian**, A. Sadekova, A. Krasniy, G. Khlestova, O. Baev // **Virchows Archiv**. -2018. - T. 473. P. S42.