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

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор Баев О.Р.
кандидат биологических наук Красный А.М.

Москва 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……..4

ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛОДА В МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ДИСФУНКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Внеклеточная ДНК плода в материнской крови……..….11

1.2. Влияние материнских и плодово-плацентарных факторов на содержание ДНК плода в материнской крови……..….14

1.3. Осложнения беременности, ассоциированные с плацентарной дисфункцией……..17

1.4. Внеклеточная ДНК плода при осложнениях беременности……21

1.4.1. ДНК плода при преэклампсии……21

1.4.2. ДНК плода при преждевременных родах……...25

1.5. Корреляция ДНК плода с маркерами осложнений беременности, ассоциированными с плацентарной дисфункцией……27

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования……...32

2.2. Клиническая характеристика обследованных женщин……...33

2.3. Методы исследования……42

2.3.1. Общеклинические методы исследования……..42

2.3.2. Клинико-лабораторные методы исследования……..43

2.3.3. Инструментальные методы исследования……44

2.3.4. Патоморфологическое исследование плаценты……....45

2.3.5. Специальные методы исследования……...45

2.3.6. Статистическая обработка данных…….....47

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Внеклеточная ДНК в крови матери при неосложненной беременности……49

3.2. Внеклеточная ДНК в материнской крови при преэклампсии……..61

3.3.Внеклеточная ДНК в материнской крови при развитии преждевременных родов……100

3.4. Сравнительный анализ внеклеточной ДНК у женщин с преэклампсией и преждевременными родами……....129
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ…….....134
ВЫВОДЫ……154
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ……156
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……..157
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……..……..159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Наиболее актуальными проблемами современного акушерства в настоящее время являются такие осложнения беременности, как преэклампсия (ПЭ) и преждевременные роды (ПР), которые определяют наибольшее число неблагоприятных исходов беременности и родов. В связи с этим, необходим поиск маркеров для прогнозирования и ранней диагностики данных осложнений.

С тех пор, как в 1997 г. Lo и соавторами впервые было продемонстрировано наличие последовательностей внеклеточной ДНК плода (пДНК) в материнской плазме и сыворотке крови, исследователи стали уделять большое внимание пренатальной диагностике генетических заболеваний плода на основании определения пДНК [138]. Одним из важных событий стало обнаружение взаимосвязи между пДНК и трисомией по 21 хромосоме, что послужило основой для использования определения пДНК как скринингового метода определения анеуплоидий плода, в частности синдрома Дауна [9, 10].

В дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что концентрация пДНК повышается с прогрессированием беременности [156]. Предполагается, что основным источником пДНК являются клетки трофобласта, которые подвергаются апоптозу и находящиеся внутри нуклеиновые кислоты, включая РНК и ДНК, попадают в кровоток женщины. На сегодняшний день 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 при определении (более 90% пДНК).

На основании ряда исследований было обнаружено, что осложнения беременности, ассоциированные с плацентарной дисфункцией, такие как ПЭ и ПР, сопровождаются изменениями концентрации пДНК в материнской крови [4, 5, 18]. Наибольший интерес представляло изучение пДНК с целью прогнозирования

осложнений беременности. Однако имеющиеся на сегодняшний день данные противоречивые. Ряд авторов выявили повышение концентрации пДНК, в то время как другие обнаружили достоверное снижение уровня при развитии ПЭ [114]. Нет единого мнения среди исследователей относительно прогнозирования ПР, так как высокая концентрация пДНК была выявлена у женщин с угрожающими преждевременными родами и началом регулярной родовой деятельности [57, 81, 100, 101, 125]. Расхождения имеются также относительно срока беременности, при котором наиболее выражены колебания концентрации пДНК, влиянии материнских и плодово-плацентарных факторов. Таким образом, в результате проведенных исследований не определена прогностическая значимость пДНК ввиду различий полученных результатов, не выявлен оптимальный скрининговый срок гестации. Следовательно, можно утверждать, что возможность прогнозирования осложнений беременности путем определения концентрации пДНК в материнской крови остается невыясненной, так как нет однозначного мнения среди авторов вследствие различий в методике исследования, сроков гестации на момент забора крови и оценке материнских и плодово-плацентарных факторов, влияющих на концентрацию пДНК.

Таким образом, актуальным является комплексное изучение изменения уровня пДНК в материнской крови с учетом срока беременности, материнских и плодово-плацентарных факторов, а также при помощи методики, не ограничивающей выборку.

Степень разработанности темы исследования

Преэклампсия и преждевременные роды – это большие акушерские синдромы, являющиеся причиной серьезной заболеваемости, длительной нетрудоспособности и смерти женщин и детей. Диагностика представленных осложнений проводится на основании характерных клинико-лабораторных данных и нередко является запоздалой. В связи с этим, в настоящее время основное

внимание уделяется поиску эффективных методов профилактики, что определяет необходимость выявления беременных группы риска, прогнозирование и раннюю диагностику осложнений. Определены клинико-анамнестические факторы риска, возможные маркеры, однако чувствительность и специфичность данных методов остаются неоптимальными. В связи с этим, необходим поиск маркеров для прогнозирования и ранней диагностики данных осложнений.

Перспективным маркером в отношении прогнозирования ПЭ и ПР является внеклеточная пДНК, так как имеет «плацентарное происхождение» и характеризует степень апоптоза клеток трофобласта. При определении содержания пДНК в материнской крови при наличии клинической картины ПЭ и ПР выявлено достоверное повышение концентрации по сравнению с неосложненным течением беременности. Однако, результаты исследований пДНК как прогностического маркера противоречивые, что обусловлено определенными факторами, основным из которых является маркер внеклеточной пДНК. Известные маркеры пДНК имеют разную чувствительность, обуславливают ограничения в применении данного метода.

Таким образом, исследование содержания пДНК в материнской крови при помощи наиболее универсального маркера с целью прогнозирования осложнений беременности, таких как ПЭ и ПР, в настоящее время является актуальным.

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.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы обследования: клинические (подробный сбор анамнеза, общий и акушерско-гинекологический осмотр), клинико-лабораторные (анализ крови на антитела к сифилису, ВИЧ, гепатиту В и С, клинический анализ крови, биохимический анализ крови с определением АЛТ, АСТ, ЛДГ и ЩФ, гемостазиограмма, определение группы крови и резус фактора, маркеров ПЭ (PLGF, sFlt-1, sFlt-1/PLGF), общий анализ мочи, мазок на флору из влагалища, бактериологическое исследование посева из цервикального канала), инструментальные (ультразвуковое исследование, допплерометрия, антенатальная кардиотокография) и комплекс дополнительных лабораторных методов исследования. Специальные методы: определение концентрации внеклеточной ДНК с выделением плодовой фракции при помощи гена *RASSF1A* методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту

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

2. Начиная с ранних сроков гестации концентрация внеклеточной ДНК плода у беременных с преэклампсией значительно выше, чем при неосложненной беременности, что указывает на нарушение инвазии трофобласта с формированием плацентарной дисфункции. Увеличение концентрации ДНК плода прогрессирует со сроком беременности и наиболее выражено при ранних и тяжелых формах преэклампсии. Внеклеточная материнская ДНК 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 ДНК плода у женщин с преждевременными родами значительно превышает норму в 11-14 недель беременности, что свидетельствует о нарушении инвазии трофобласта. В течение беременности концентрация ДНК плода повышается к 30-32 неделям. При этом у женщин со спонтанным преждевременным развитием родовой деятельности при интактных плодных оболочках уровень ДНК плода 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 ДНК плода превышает соответствующее значение в группе женщин с преждевременными родами на всех сроках, а уровень внеклеточной материнской ДНК только во второй половине беременности, что свидетельствует о более тяжелой степени плацентарной дисфункции при преэклампсии.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность данных исследования подтверждается количеством пациенток, включенных в исследование (580), а также современными методами статистической обработки.

ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛОДА В МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ДИСФУНКЦИИ ПЛАЦЕНТЫ
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Внеклеточная ДНК плода в материнской крови

В течение беременности материнская и плодовая циркуляции разделены плацентарным барьером. Однако имеется большое число фактов, свидетельствующих о проникновении клеточных элементов плода в кровоток матери. Попадание эритроцитов плода в кровоток матери является наиболее изученным аспектом из-за клинического значения резус-сенсибилизации и последующего развития гемолитической болезни новорожденного. С развитием молекулярно-биологических методов исследования, особенно с момента появления полимеразной цепной реакции (ПЦР), стало возможным изучение обмена клеточным материалом между беременной и плодом [183]. Особо значимым явилось обнаружение плодовых нуклеиновых кислот в материнской крови.

Новая область исследований в акушерстве начала активно развиваться после выявления большого количества циркулирующей внеклеточной опухолевой ДНК в плазме и сыворотке онкологических пациентов [37, 123]. Предполагая, что быстро растущий плод и плацента обладают опухолеподобными свойствами, Lo и соавторы (1997) впервые продемонстрировали наличие последовательностей внеклеточной ДНК плодового происхождения в материнской плазме и сыворотке крови [138]. Результаты последующих исследований подтвердили высокие значения пДНК в материнской крови.

По сравнению с определением ядерных плодовых клеток в материнской крови анализ внеклеточной пДНК более быстрый, надежный, легко воспроизводимый метод [39]. Наиболее важное значение приобрело определение пДНК в неинвазивной диагностике анеуплоидий плода. Данная методика

позволяет избежать рисков, связанных с применением обычных инвазивных методов, таких как амниоцентез и биопсия хориона.

За последние годы значительно выросла область применения пДНК. Внедрено рутинное неинвазивное пренатальное определение резус принадлежности плода, заболеваний, сцепленных с полом плода [201].

Определение внеклеточной пДНК основано на выявлении специфических маркеров (*SRY, DYS-14, RHD, maspin (SERPINB5), DSCR3, RASSF1A* гены). Используются *SRY* и *DYS-14* локусы Y-хромосомы, представленные в крови женщины с плодом мужского пола. Другим маркером пДНК является *RHD* ген в крови RhD-отрицательных женщин с RhD-положительным плодом. Однако представленные маркеры пДНК ограничивают широкое применение в связи с выявлением у плодов только мужского пола (*SRY*, *DYS*-14) или у резус-отрицательных женщин с резус-положительным плодом (*RHD*), что также не позволяет исключить возможность получения ложноотрицательных результатов. Недостатком метода, основанного на выделении пДНК по определению гена *maspin (SERPINB5)* является высокая степень ее деградации (более 90% пДНК).

Позднее были обнаружены эпигенетические различия между материнской и плодовой фракцией внеклеточной ДНК. В результате поисков эпигенетических маркеров клеток плода Chan и соавторы (2006) продемонстрировали, что промотор *RASSF1A* гена гипометилирован в клетках крови матери, но гиперметилирован в плаценте [99]. Следовательно, методом полимеразной цепной реакции стало возможным определение гиперметилированной части *RASSF1A* гена, соответствующей пДНК, после селективного разрушения гипометилированной мДНК при помощи метил-чувствительных ферментов – ДНК-рестриктаз. Данный метод позволяет определить концентрацию пДНК в материнской крови у всех беременных независимо от пола плода и резус-принадлежности.

Выделяется пДНК из общей внеклеточной ДНК (оДНК), в состав которой входит также ДНК матери (мДНК). Тем самым, немаловажным аспектом явилось изучение источника и механизмов реализации пДНК в материнской крови. Bianchi и соавторы (1990) в результате исследования заключили, что эритроциты плода

могут быть обнаружены в крови матери и использованы для выделения пДНК [106]. Последовательности пДНК были также обнаружены в иных биологических жидкостях беременной женщины: в моче, цереброспинальной, перитонеальной и амниотической жидкостях [38, 58, 61, 76]. Исследователи предположили, что существует градиент концентрации, приводящий к прямому трансферу молекул ДНК через плодовые оболочки [39]. Другим возможным механизмом является попадание пДНК из плазмы плода в материнскую циркуляцию минуя плаценту [107]. Однако наиболее вероятным источником предполагаются клетки трофобласта, что было подтверждено в ряде исследований, где пДНК в материнской крови обнаруживали при анэмбрионии, а также на ранних сроках беременности (6 недель) до установления плодово-плацентарного кровообращения [77, 78]. Также отмечено повышение концентрации после лазерной коагуляции сосудистых анастомозов плаценты при фето-фетальном трансфузионном синдроме и полная элиминация ДНК плода из материнской крови в течение 2-х часов после родоразрешения [139, 164]. Помимо апоптоза, который является результатом «старения» синцитиотрофобласта, одной из причин высвобождения свободных нуклеиновых кислот могут быть случайные поломки и некроз. Поскольку ДНК плода попадает в кровоток матери преимущественно вследствие апоптоза или некроза клеток трофобласта, тем самым имеет плацентарное происхождение, в литературе также используется термин «внеклеточная плацентарная ДНК» [59, 77, 124].

Внеклеточная пДНК в материнской крови определяется с ранних сроков беременности. Wataganara и соавторы (2004) обнаружили пДНК в крови беременной на 32 день гестации [43]. Ряд исследователей изучили концентрацию пДНК в динамике беременности. Levine и соавторы (2004) продемонстрировали, что уровень пДНК остается низким до третьего триместра беременности, далее увеличивается со скоростью 7.5 ГЕ/мл в неделю [184]. Позднее Galbiati и соавторы (2005) обозначили 2-х кратный прирост концентрации пДНК во втором и 9-ти кратный в третьем триместре беременности по сравнению с первым [78]. Однако по данным последующих исследований концентрация пДНК была относительно

стабильна до середины срока гестации и значительно возрастала во второй половине беременности [28, 67, 157].

Согласно современным представлениям в формировании и функционировании фетоплацентарного комплекса важная роль отводится оптимальному влиянию факторов роста и запрограммированной клеточной гибели, следовательно, концентрация пДНК может указывать на нормальное развитие плаценты и подвергаться изменениям при наличии патологических процессов.

1.2. Влияние материнских и плодово-плацентарных факторов на содержание ДНК плода в материнской крови

Клиническое применение внеклеточной пДНК в прогнозировании и диагностике осложнений беременности не может быть реализовано без учета потенциальных факторов, которые могут оказывать влияние на концентрацию данного маркера в разные сроки беременности. Существует большое число публикаций, где сообщается о зависимости уровня плацентарных белков в материнской крови в первом и во втором триместрах беременности от антропометрических характеристик. Ряд исследователей предположили, что концентрация пДНК также может подвергаться изменениям под влиянием различных факторов.

Одним из известных факторов, оказывающих влияние состояние здоровья человека, а также течение беременности является масса тела, особенно недостаточная или избыточная.

Увеличение массы жировой ткани происходит за счет повышения количества триглицеридов в адипоцитах, то есть гипертрофии клеток, а также за счет гиперплазии адипоцитов или с вовлечением обоих механизмов. У беременных с ожирением происходит активный апоптоз и некроз клеток жировой ткани по сравнению с беременными женщинами с низкой массой тела [108]. Подобно

опухолевому росту чрезмерное увеличение массы жировой ткани поддерживает гипотезу реализации внеклеточной ДНК в кровоток вследствие ремоделирования жировой ткани у женщин с ожирением. Имеются данные о положительной корреляции концентрации внеклеточной оДНК с индексом массы тела (ИМТ) женщины при неосложненном течении беременности [171]. Ряд исследователей заключили, что у женщин с большей массой тела доля пДНК снижена [79, 94, 125]. Объясняется данная обратная корреляционная зависимость увеличением объема циркулирующей крови и дилюционным эффектом у женщин с большей массой тела. Другим возможным механизмом снижения концентрации пДНК является увеличение доли внеклеточной мДНК за счет повышенного разрушения и обновления адипоцитов и компенсаторного снижения доли пДНК. Предполагается, что концентрация оДНК при увеличении массы тела женщины повышается за счет материнской фракции внеклеточной ДНК. В литературе отсутствуют данные о влиянии ИМТ на концентрацию мДНК изолированно. Однако приведённое выше исследование Wang и соавторов (2013) было ограничено отсутствием данных о росте женщин, что не представляло возможности расчета ИМТ беременной [94]. Не все исследователи обнаружили корреляцию пДНК и ИМТ беременной в первом триместре беременности [109]. В последующем анализ концентрации пДНК в зависимости от ИМТ и гестационного срока подтвердил корреляционную зависимость между увеличением ИМТ и снижением уровня пДНК [67]. S.L. Kinnings и соавторы (2015) описали зависимость между изменением ИМТ беременной и концентрацией пДНК: происходит снижение пДНК на 1.17% при увеличении ИМТ на 5 кг/м^2 у женщин с ИМТ 20-40 кг/м^2, при ИМТ приблизительно равном 50 кг/м2 – концентрация ДНК плода остается относительно постоянной [80]. Некоторые исследователи, такие как M. Haghiac и соавторы (2012), продемонстрировали, что концентрация оДНК повышена у женщин с ожирением, в отличие от пДНК [108]. Напротив, O. Lapaire и соавторы (2009) не нашли корреляции концентрации как оДНК с ИМТ женщины, так и пДНК [171]. В 2016 г. путем определения *RASSF1A* гена Manokhina и соавторы заключили, что

концентрация пДНК не коррелирует с изменением ИМТ. Однако из исследования были исключены женщины с ИМТ более 30 [124].

С увеличением репродуктивного возраста повышается риск развития плаценто-ассоциированных осложнений беременности. Таким образом, была интерпретирована взаимосвязь увеличения концентрации пДНК в крови женщин старшей возрастной группы на момент реализации репродуктивной функции [78]. Однако другими исследователями аналогичная корреляция пДНК с возрастом беременной не была установлена [68, 110].

У курящих женщин уровни ассоциированного с беременностью плазменного белка А (PAPP-A) и бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (b-ХГЧ) снижены, что отражает нарушение процессов плацентации. При этом концентрация пДНК значимо повышается при курении вследствие увеличения некротических процессов синтициотрофобласта [79]. По данным Poon и соавторов (2013), напротив, концентрация пДНК снижается на 14% у курящих женщин, что, по мнению исследователей, является закономерным вследствие малой массы плаценты за счет нарушения плацентации [125]. Wataganara и соавторы (2004) не обнаружили значимого влияния курения на концентрацию пДНК [109].

По данным Quezada и соавторов (2015) на концентрацию пДНК оказывает существенное влияние паритет родов, а также уровень пДНК достоверно выше у женщин с самопроизвольным зачатием [81]. В исследованиях Pan и соавторов (2005), Poon и соавторов (2013) не было подтверждено влияние на пДНК применения вспомогательных репродуктивных технологий [45, 125]. Также нет однозначного мнения среди исследователей относительно влияния инвазивных диагностических вмешательств во время беременности (биопсия хориона, амниоцентез) [46, 47].

Как известно, основным источником пДНК являются клетки трофобласта [77]. Предполагается наличие положительной корреляции между массой плаценты и уровнем внеклеточной пДНК в кровотоке женщины. M. Smid и соавторы (2003), определив уровень пДНК при одноплодной и многоплодной беременности, обнаружили существенную положительную корреляцию между увеличением

массы плаценты и концентрацией пДНК [82]. Однако T. Wataganara и соавторы (2005), измеряя массу плаценты с помощью 3-мерного ультразвукового исследования в первом триместре беременности, не обнаружили зависимости [140]. В результате полученных данных авторы предположили, что процесс реализации внеклеточной пДНК в кровоток женщины обусловлен иными механизмами, не зависящими от объема плаценты [140]. Также, в результате проведенных исследований обнаружено влияние на концентрацию пДНК таких факторов, как привычный выкидыш, многоводие, внутрипеченочный холестаз беременных, кровяные выделения в первом триместре беременности, а также аномалии прикрепления и расположения плаценты [26, 28, 48, 68, 97].

Таким образом, в настоящее время нет единого мнения о влиянии материнских и плодовых факторов на уровень внеклеточной мДНК и пДНК в материнской крови.

1.3. Осложнения беременности, ассоциированные с плацентарной дисфункцией

Плацента – специализированный орган, формирующийся во время беременности, с тенденцией к росту на протяжении всего срока гестации, выполняющий множество функций, включая эндокринную регуляцию и питание плода [141]. В каждом органе с течением времени происходят связанные со «старением» физиологические изменения, и плацента не является исключением. Однако в некоторых случаях признаки «старения» плаценты появляются намного раньше, чем предполагается при физиологическом течении беременности. Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток, имеет решающее значение в развитии и поддержании гомеостаза в многоклеточных организмах и многих органах, включая плаценту. Апоптоз клеток трофобласта является физиологическим процессов при неосложненной беременности, повышается с

увеличением срока гестации и выше при перенашивании беременности [172, 173]. Предполагается, что апоптоз активируется в процессе формирования двуслойного ворсинчатого трофобласта и синцитиотрофобласта из цитотрофобласта (дифференцировка трофобласта) [174]. Интересным стало наблюдение, что при плацентарных патологиях, таких как прерывание беременности на раннем сроке, преэклампсия, задержка роста плода, трофобластическая болезнь (частичный или полный пузырный занос) и хориокарцинома, обнаружен повышенный апоптоз клеток трофобласта [19, 29, 83, 110, 120, 185]. Причина данного явления не известна. Однако нарушенное ремоделирование спиральных артерий и нарушение плацентации вследствие поверхностной инвазии трофобласта приводит к развитию гипоксии и окислительного стресса, следовательно, дисфункции плаценты и может являться основным пусковым механизмом значительного увеличения апоптоза клеток [142]. Проведено большое количество исследований, в результате которых показано, что аномальный апоптоз в плаценте в результате окислительного стресса оказывает влияние на материнскую сосудисто-эндотелиальную и иммунную системы, вызывая эндотелиальную дисфункцию, которая является патогенетическим звеном в развитии осложнений беременности, таких как преэклампсия и преждевременные роды [134].

Преэклампсия является одной из главных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [62]. ПЭ развивается в 2–8% беременностей и не имеет тенденции к снижению [30]. Клинически манифестирует после 20 недели гестации или в течение первых 4-6 недель после родов появлением артериальной гипертензии и/или протеинурии, нередко сочетаясь с отеками [12]. В настоящее время единственным эффективным «лечением» данного осложнения является родоразрешение. Считается, что ПЭ развивается как следствие нарушения плацентации [1, 4]. Вследствие гипоксии плаценты и сниженного парциального давления кислорода происходит избыточное высвобождение антиангиогенных белков в материнский кровоток, ключевым из которых является sFlt-1. sFlt-1 принадлежит к семейству рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR) и способен связываться с ним, являясь антагонистом ангиогенных

белков, таких как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и плацентарный фактор роста (PlGF) [199]. Как известно, уровень sFlt-1 повышается при ПЭ, что предшествует манифестации заболевания [49]. Концентрация PLGF при нормальном течении беременности имеет тенденцию к увеличению в первом и во втором триместрах, достигая максимума к 30 неделе гестации и впоследствии уменьшается [175]. На сроке 11-13 недель уровень PLGF в крови матери снижен при анеуплоидии плода и нарушении плацентации, вследствие чего повышается риск развития ПЭ и задержки роста плода. Аналогичное изменение концентрации PLGF наблюдаются во втором и третьем триместрах [175]. Однако определение концентрации ангиогенных факторов изолированно не имеет прогностической значимости для ПЭ с чувствительностью PLGF 32% и частотой ложноположительных результатов 5% [13, 50]. Было доказано, что секреция VEGF и PlGF подавляется опосредованно через sFlt-1 [121]. В условиях гипоксии цитотрофобласт несет ответственность за подавление секреции VEGF, PlGF и стимулирует синтез sFlt-1 [165]. Комбинация факторов, таких как sFlt-1/PLGF, анамнеза женщины и ультразвуковых данных, позволяет создать прогностическую модель ПЭ, однако, применение ограничено гетерогенностью сопутствующих клинических рисков, затрудняющих интерпретацию [50].

На основании клинических и лабораторных данных диагностика ПЭ не представляет трудностей, но является запоздалой [17, 7]. Прогнозирование ПЭ хотя и несколько улучшилось, главным образом, за счет определения ангиогенных/антиангиогенных факторов, но чувствительность и специфичность подобных тестов все еще остаются неоптимальными [8].

Преждевременные роды – это синдром, в основе которого лежит большое число патологических процессов. Существуют группы факторов, приводящие к ПР: 1 – индуцированные ПР или кесарево сечение по показаниям со стороны матери или плода; 2 – преждевременное спонтанное начало родовой деятельности; 3 – преждевременный разрыв плодных оболочек независимо от последующего способа родоразрешения [69]. Спонтанное начало родов наблюдается в 2/3 всех наблюдений преждевременных родов [166]. Наиболее изученными механизмами,

участвующими в инициации ПР, являются: инфекция или воспаление, маточно-плацентарная ишемия или кровотечение, перерастяжение матки, стресс и иные иммунологически опосредованные процессы [69]. В 25-40% преждевременных родов первостепенная роль отводится инфекционному фактору [95]. Механизм развития ПР в данном случае реализуется через активацию иммунной системы [186]. В литературе описаны маркеры, которые могут быть обнаружены в разных биологических жидкостях (амниотической жидкости, моче, цервикальной слизи, вагинальном секрете, плазме крови, слюне) и использованы для прогнозирования ПР [24, 69]. Оцениваются цитокины, хемокины, эстриол и иные молекулы, связанные с иммунным воспалительным ответом. Концентрация матриксной металлопротеиназы 9 значительно возрастает в сыворотке крови за 24 часа до начала родов, что свидетельствует о низкой прогностической ценности вследствие короткого временного промежутка с момента повышения уровня до развития родов [143]. Значение эстриола в слюне беременной коррелирует со значением в крови. В ряде исследований было продемонстрировано, что уровень эстриола может быть использован для прогнозирования поздних ПР, но мало значимо для более ранних сроков родоразрешения [167]. Существуют ограничения в использовании данного маркера, так как на содержание влияют такие факторы, как физическая активность женщины, прием пищи, суточные колебания концентрации [51]. На сегодняшний день наибольшей прогностической значимостью в отношении ПР обладает фетальный фибронектин – гликопротеин, продуцируемый плодными оболочками и играющий важную роль при отделении плаценты после родов [51]. Обнаружение фетального фибронектина в шеечно-вагинальном отделяемом с 22 недель свидетельствует о хориодецидуальных нарушениях и повышенном риске развития преждевременных родов [187]. Проведены масштабные мультицентровые исследования, в которых сравнивали исход беременности у женщин с симптомами ПР при положительном тесте на фетальный фибронектин и отрицательном результате [176]. Прогностическая значимость положительного теста составила лишь 13% [176]. Следовательно, существуют серьезные ограничения в использовании биохимических маркеров с целью прогнозирования ПР ввиду

неспецифичности, короткого промежутка времени с момента повышения уровня до родоразрешения.

Термин «плацентарная недостаточность», указывающий на нарушение маточно-плацентарной перфузии, которое приводит к повреждению плаценты и возникновению в связи с этим осложнений беременности, таких как ПЭ и задержка роста плода (ЗРП), в настоящее время включает также ПР [16, 122]. Основные причины плацентарной недостаточности остаются недостаточно понятными, однако наиболее изученным механизмом является нарушение ремоделирования спиральных маточных артерий [32]. При гистологическом исследовании плаценты у женщин с ПР и интактными оболочками была обнаружена большая степень нарушения физиологического ремоделирования спиральных артерий по сравнению с нормой [84]. Допплерометрическое исследование кровотока в маточных артериях и артерии пуповины показало, что при неосложненном течении беременности индекс резистентности снижается с увеличением срока гестации, в то время как риск развития ПР ассоциирован с повышением резистентности в данных сосудах [144]. Следовательно, можно предположить, что нарушение маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока является одним из механизмов развития ПР. Исходя из вышеизложенного, возможен поиск новых маркеров прогнозирования ПР.

1.4. Внеклеточная ДНК плода при осложнениях беременности

1.4.1. ДНК плода при преэклампсии

Под влиянием гипоксии и окислительного стресса усиливается апоптоз клеток трофобласта, что является важным патогенетическим звеном в развитии осложнений беременности. Тем самым, определение концентрации внеклеточной пДНК может служить маркером патофизиологических изменений в плаценте,

следовательно, осложнений беременности, ассоциированных с плацентарной дисфункцией.

Одним из механизмов развития ПЭ является нарушение дифференцировки трофобласта вследствие патологии плацентации. Спустя два года после обнаружения пДНК в материнской крови группа авторов продемонстрировала 5-ти кратное увеличение концентрации пДНК у женщин с ПЭ по сравнению с нормой [158]. Главным наблюдением явилось обнаружение повышения концентрации пДНК в плазме крови женщины до появления первых клинических симптомов заболевания. В последующем аналогичная тенденция была подтверждена другими исследователями, однако степень повышения уровня пДНК составила 2 и 4,3 раза по сравнению с нормой [52]. Анализ данных пДНК при умеренной и тяжелой ПЭ выявил положительную корреляцию концентрации со степенью тяжести ПЭ [70, 159]. Так AbdelHalim и соавторы (2016) обнаружили 6-ти кратное увеличение оДНК и пДНК по сравнению с нормой, а также значимую разницу между умеренной и тяжелой ПЭ в 2 раза [53]. В работе Zhong и соавторов (2001) впервые было отмечено, что помимо концентрации пДНК также значимо повышается концентрация мДНК при ПЭ [70]. Однако при определении уровня пДНК в плаценте различий между группой нормы и ПЭ обнаружено не было [157]. Следовательно, можно предположить наличие разных механизмов повышения концентрации пДНК в плазме крови при ПЭ. [157, 188].

Спустя 24 часа после родоразрешения при неосложненном течении беременности пДНК в плазме крови женщины не обнаруживалась, при ПЭ время выведения пДНК после родов составило 7 дней [157].

Состояние женщины значительно ухудшается при присоединении HELLP-синдрома. Он осложняет около 1% всех беременностей и до 20% при наличии ПЭ [63]. Интересным наблюдением явилось то, что при ПЭ с последующим развитием HELLP-синдрома концентрация пДНК дополнительно увеличивалась в 4,3 раза [98]. На момент забора крови HELLP-синдром был диагностирован у большинства женщин кроме 2-х беременных, которые развили HELLP после родоразрешения. Однако авторы сделали вывод, что концентрация пДНК прогнозирует начало

HELLP [98]. Hernandez и соавторы (2017), напротив, не получили достоверных различий между уровнем пДНК при умеренной ПЭ, тяжелой ПЭ и HELLP-синдроме [189]. Однако авторы выявили значимое повышение концентрации оДНК при развитии HELLP-синдрома по сравнению с умеренной и тяжелой ПЭ (p=0,001 и p=0,017, соответственно) [189].

Наибольший интерес представляет изучение пДНК в материнской крови с целью прогнозирования плаценто-ассоциированных осложнений. Имеются данные, что концентрация пДНК в первом триместре беременности была повышена у женщин, у которых развилась в последующем ранняя ПЭ по сравнению с пДНК при неосложненном течении беременности [85, 111]. При этом повышение концентрации пДНК на 1 ГЕ/мл увеличивает риск развития ранней ПЭ на 67% (p=0,002) [111]. Для прогнозирования поздней ПЭ определение пДНК в 11-14 недель по мнению авторов нецелесообразно, так как концентрация не различается от таковой при неосложненном течении гестации и напрямую зависит от степени нарушения перфузии в плаценте и тяжести ПЭ [85]. Не во всех работах прослеживалась данная динамика в аналогичные сроки беременности. Так, Poon и соавторы (2013) заключили, что определение уровня как пДНК, так и мДНК в ранние сроки гестации не имеет значимости в прогнозировании плаценто-ассоциированных осложнений беременности, в том числе и ПЭ [125]. Аналогичные выводы были сделаны группой исследователей в 2016 году [33]. Интересные данные получили Rolnik и соавторы, исследовав 20 беременных с ранней ПЭ, 20 – с поздней ПЭ, 200 – с неосложненным течением беременности [126]. Оказалось, что в 11-13 недель снижена медиана концентрации пДНК, но повышена медиана концентрации оДНК у женщин с последующим развитием ранней ПЭ [126]. В 20-24 недели медиана концентрации пДНК также была снижена, однако при последующем развитии поздней ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности ($p<0,05$) [126]. Касательно второго и третьего триместров беременности большинство исследователей схожи во мнении, что концентрация пДНК повышена в несколько раз у женщин с последующим развитием ПЭ, прогностически значимо как для ранней ПЭ, так и для поздней ПЭ [60, 86, 112,

160]. При этом по данным Cotter и соавторов (2004) риск развития ПЭ повышался в 8 раз [113]. Позднее были опубликованы иные данные, свидетельствующие о прогностической значимости пДНК не только при повышении концентрации, но также при его снижении менее 5 перцентиля [114]. По данным ряда исследователей уровень пДНК не имеет прогностической ценности вплоть до третьего триместра беременности [54, 87]. Как было указано выше, исследования проводили с использованием различных методов определения внеклеточной пДНК, что обусловлено разнообразием маркеров (*SRY, DYS-14, RHD, maspin (SERPINB5), DSCR3*).

После обнаружения эпигенетических различий между материнской и плодовой фракцией внеклеточной ДНК Tsui и соавторы (2007), проанализировав концентрацию оДНК и пДНК у 10 женщин с преэклампсией и 20 женщин с неосложненным течением беременности в третьем триместре, первыми сделали вывод о возможности использования *RASSF1A* гена, как потенциального маркера ПЭ [161]. В дальнейшем, в ходе проведенных исследований, была продемонстрирована прогностическая значимость определения концентрации пДНК на сроках 11-13 и 15-28 недель беременности у женщин с последующим развитием ПЭ [28, 168].

В 2015 г. Salvianti и соавторы опубликовали результаты исследования, в котором внеклеточная ДНК была определена в течение беременности методом выявления *RASSF1A* гена у 3-х групп женщин: I – с ПЭ, II – с факторами риска развития ПЭ (IIa – ПЭ развилась, IIb – осложнение не развилось) и в III – контрольной группе [145]. Авторы учитывали такие факторы риска развития ПЭ, как семейный анамнез ПЭ, наличие в анамнезе ПЭ, хроническую артериальную гипертензию (ХАГ) и гестационную артериальную гипертензию (ГАГ). Достоверно выше была концентрация оДНК в группе женщин с ПЭ по сравнению с остальными группами [145]. При этом, концентрация оДНК достоверно различалась во IIa и III группах (p=0,001) [145]. Медиана концентрации пДНК в группе I составила 199,51 ГЕ/мл, что достоверно выше концентрации в остальных группах (IIa-14,48 ГЕ\мл, IIb-7,87 ГЕ/мл, III-6,07 ГЕ/мл) (p<0,001). Главным

заключением исследователей явилось то, что концентрация внеклеточной ДНК повышается за несколько недель (от 2 до 18 недель для оДНК, от 8 до 17 недель для пДНК) до появления первых клинических симптомов ПЭ, что свидетельствует о высокой прогностической значимости данного маркера [145]. По данным Kim и соавторов (2016) концентрация пДНК в первой половине беременности не различалась в группе ПЭ и при норме [71]. Та же группа авторов годом ранее опубликовала, что концентрация гиперметилированной части гена *RASSF1A* была значимо повышена в 24-32 недели только в группе ранней ПЭ, в 33-41 неделю – в группе поздней ПЭ. Однако данные различных исследователей о сроках на момент повышения уровня внеклеточной пДНК остаются противоречивыми [162].

1.4.2. ДНК плода при преждевременных родах

Существуют клинические и гистологические данные, свидетельствующие о роли нарушения маточно-плацентарного кровообращения в этиологии ПР [186]. В результате проведенного исследования Arias и соавторы (1993) показали, что аномалии сосудов децидуальной ткани встречаются в 3 раза чаще у женщин с ПР [127]. С другой стороны, при допплерометрическом исследовании маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока также была выявлена положительная корреляция между плацентарной ишемией и преждевременным началом родовой деятельности [144]. Обнаружение пДНК в качестве биомаркера дисфункциональных нарушений плаценты определило дальнейшее его изучение при ПР.

Взаимосвязь между концентрацией пДНК и преждевременным началом родовой деятельности впервые установили в 1998 г. [128]. Предполагается, что пДНК является триггером начала родов при помощи стимуляции иммунного ответа через Toll-like receptor-9 (TLR9), повышая выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов, тем самым приводя к созреванию ш/матки, разрыву плодных оболочек и началу маточных сокращений [88, 146, 190, 191].

В 2002 г. Hoesli и соавторы продемонстрировали отсутствие существенных различий в количестве эритробластов у 47 женщин с преждевременным началом маточных сокращений и аналогичным количеством беременных группы контроля между 20 и 34 неделями гестации [56]. Однако в такие же сроки беременности Farina и соавторы (2005) установили взаимосвязь между повышенной концентрацией пДНК у женщин с риском развития ПР как путем спонтанного начала регулярной родовой деятельности, так и преждевременного излития околоплодных вод [100]. Аналогичные результаты были получены в исследовании Jakobsen и соавторов (2012) при определении пДНК у 1316 беременных при сроке 23-28 недель, в результате которого обнаружена корреляция между уровнем пДНК более 95-го центиля и развитием ПР [100]. При этом наибольшая взаимосвязь была установлена при развитии ПР до 34 недели беременности. Illanes и соавторы (2011) не обнаружили взаимосвязи между концентрацией пДНК у женщин с короткой шейкой матки (ШМ) (менее 15 мм) и ПР, у беременных с короткой ШМ и своевременными родами и женщин группы контроля [89]. Исследователи утверждали, что нет корреляции между концентрацией пДНК в 22-24 недели и сроком беременности на момент родов [89]. Возможным объяснением может служить отсутствие ишемии плаценты как этиологического фактора развития ПР у женщин группы риска. В дальнейших исследованиях Stein и соавторов (2013) и Quezada и соавторов (2015) также отрицалась прогностическая значимость определения концентрации пДНК в первом и втором триместрах беременности при ПР [54, 81]. В 2016 г. были опубликованы результаты исследования пДНК у 1349 беременных [57]. У 119 женщин (8,8%) роды начались преждевременно, при этом в 49 наблюдениях (3,6%) до 34 недели беременности. Авторы продемонстрировали, что пДНК является маркером ПР при определении концентрации в 14-20 недель беременности и отсутствует корреляция в 10-14 недель [57]. Используя *RASSF1A* ген El-Garf и соавторы (2013) определили концентрацию пДНК у 30 женщин с угрожающими ПР (10%) и начавшейся регулярной родовой деятельностью (90%) в 28-32 недели беременности [34]. Выявлено 6-кратное увеличение концентрации

пДНК при угрожающих или начавшихся ПР по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$) [34].

Повышенные уровни пДНК в большинстве работ были обнаружены у женщин с наличием факторов риска, накануне родов. Принимая во внимание приведенные выше результаты исследований, имеются противоречивые данные о прогностической значимости концентрации пДНК при развитии ПР.

1.5. Корреляция ДНК плода с маркерами осложнений беременности

ПЭ, помимо деления по тяжести течения, классифицируется на два подтипа в зависимости от срока манифестации заболевания – раннюю и позднюю. Ранняя ПЭ развивается до 34 недель гестации и ассоциирована с нарушением маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока, развитием задержки роста плода и неблагоприятным перинатальным исходом. При поздней ПЭ (после 34 недель) исходы для матери и плода наиболее благоприятные. Большинство исследований было проведено с целью определения эффективности применения низких доз аспирина для профилактики развития ПЭ. Было установлено, что начало приема аспирина до 16 недель беременности коррелирует со значительным уменьшением частоты ранней манифестации ПЭ и снижением перинатальной заболеваемости и смертности [72, 147]. Для проведения профилактических мероприятий и надлежащего мониторинга необходима ранняя идентификация женщин группы высокого риска развития ПЭ. В настоящее время не существует специфического маркера ПЭ с достаточной прогностической ценностью. Учитывая гетерогенную этиологию ПЭ, лишь комбинация биомаркеров с анамнестическими данными, факторами риска и показателями инструментальных методов исследования может иметь прогностическую значимость [102]. Однако продолжаются поиски наиболее специфичных маркеров прогнозирования и ранней диагностики ПЭ, которые по отдельности или в совокупности будут обладать наибольшей чувствительностью и

специфичностью, а также коррелировать с данными инструментальных методов исследования.

В настоящее время прогностическая значимость внеклеточной пДНК в материнской крови относительно развития ПЭ изучена недостаточно. В ряде исследований изучали корреляцию концентрации пДНК с другими маркерами.

Гликопротеины ингибин-А и активин-А являются представителем надсемейства лигандов трансформирующего фактора роста - бета (TGF-b). Оба гликопротеина в значительной степени имеют плодово-плацентарное происхождение. Ингибин-А выполняет важную эндокринную роль, участвуя в отрицательной обратной связи гонадотропинов [177]. Предполагается, что активин-А может играть определенную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке, апоптозе и инвазии трофобласта. Обнаружены высокие уровни ингибина-А и активина-А при ПЭ и у женщин с повышенным риском развития ПЭ [72, 103, 178]. Diesch и соавторы (2006) выявили значимое повышение концентрации пДНК в крови у женщин с риском развития ПЭ, что коррелировало с высоким уровнем активина А [41]. При этом не было обнаружено корреляции концентрации данных маркеров у женщин с неосложненным течением беременности [41]. Немало исследований посвящено определению значимости PAPP-A как маркера хромосомных аномалий плода на ранних сроках гестации. При беременности PAPP-A вырабатывается в значительном количестве трофобластом, концентрация его в крови матери повышается с увеличением срока беременности. Отмечена корреляция низкого уровня PAPP-A с высокой частотой развития ПЭ. В результате многоцентрового исследования 8839 женщин была продемонстрирована значимая связь между концентрацией PAPP-A ниже 5 перцентиля на ранних сроках беременности (менее 14 недель) с ЗРП, ПЭ и мертворождением [73]. Во втором и третьем триместрах, напротив, концентрация PAPP-A значимо повышена при ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности [74, 200]. Аналогичные изменения происходят с уровнем плацентарного белка PP-13, который также секретируется в плаценте. Ряд исследователей обнаружили сильную положительную корреляцию концентрации

гиперметилированной части гена *RASSF1A* как маркера пДНК и плацентарных белков (PAPP-A и PP-13). В тоже время Manokhina и соавторы (2016) в результате исследования не подтвердили данные выводы, где уровень PAPP-A значимо коррелировал только с массой плаценты [124]. Yu и соавторы (2013) провели корреляционное исследование пДНК с хорионическим гонадотропином человека и альфа-фетопротеином (АФП), где исследователи обнаружили корреляцию пДНК лишь с ХГЧ при прогнозировании ранней ПЭ [161]. В других работах была обнаружена высокая концентрация АФП при тяжелой ПЭ на поздних сроках, вследствие чего Yu и соавторы (2013) заключили, что уровень АФП может указывать на тяжесть ПЭ, однако не информативен при прогнозировании ПЭ [161, 163]. Poon и соавторы (2013) описали корреляцию материнской и плодовой фракций внеклеточной ДНК с PAPP-A и ХГЧ в 11-13 недель, однако значимости в прогнозировании осложнений беременности не было обнаружено [125]. Существуют другие маркеры плаценто-ассоциированных осложнений беременности, такие как растворимая форма эндоглина (sEng), дизинтегрин и металлопротеиназа 12 (ADAM 12), цистатин C, пентраксин 3, P-селектин, однако целесообразность их определения остается под сомнением из-за низкой чувствительности и специфичности.

В прогнозировании и ранней диагностике ПЭ наиболее изучен дисбаланс между проангиогенными факторами, такими как плацентраный фактор роста (PLGF) и антиангиогенными фаткорами – растворимой fms-подобной тирозинкиназой-1 (sFlt-1). Уровень PLGF значимо снижается задолго до появления клинических симптомов ПЭ и на момент развития осложнения. Дефицит PLGF обусловлен одновременно снижением экспрессии и уменьшением свободно циркулирующего PLGF вследствие связывания с sFlt-1, содержание которого резко возрастает [49]. На ранних сроках беременности концентрация PLGF снижена у женщин с последующим развитием ПЭ, при этом уровень sFlt-1 не различается у беременных группы риска и с неотягощенным течением гестации [50]. Низкая концентрация PLGF отражает нарушение процессов плацентации, что приводит не только к развитию ПЭ, но также к нарушению роста плода [129]. Несмотря на

значимое изменение концентрации, определение изолированно PLGF не имеет прогностической ценности (чувствительность 32%) [35]. Необходима комбинация соотношения sFlt-1 к PLGF с данными анамнеза и параметрами других методов исследования для создания наиболее применимой в клинической практике прогностической модели. В исследовании Hernandez и соавторов (2017) определяли концентрацию оДНК и пДНК в совокупности с sFlt-1 и PLGF у женщин с неотягощенным анамнезом и нормальным течением беременности, а также при ПЭ и HELLP-синдроме [189]. Исследователи отметили выраженную связь между всеми указанными маркерами и степенью тяжести ПЭ с максимальными значениями у женщин при развитии HELLP [189]. Однако ряд авторов отметили, что дополнительное определение внеклеточной ДНК с другими маркерами не улучшает скрининг ПЭ [42].

Нарушение кровотока в маточных артериях по данным допплерометрии позволяет выделить женщин группы риска развития ПЭ и ЗРП [31, 148]. Поскольку данные осложнения вызваны нарушением плацентарной перфузии, возможна корреляция допплерометрических индексов с повышением концентрации пДНК в материнской крови. Обнаружение повышенной концентрации пДНК у женщин с нарушением кровотока в маточных артериях в исследовании Caramelli и соавторов (2003) коррелировало с наличием ЗРП или последующим его развитием. Однако не были получены убедительные данные ввиду малого числа наблюдений. Позднее Smid и соавторы (2006) исследовали 64 женщины с ЗРП и/или ПЭ и 89 с неосложненным течением беременности [55]. В результате авторы заключили, что нарушение кровотока в маточных артериях по данным допплерометрии, будучи признаком наличия изменений в плаценте, не является абсолютным маркером развития ПЭ и/или ЗРП [55]. В тоже время уровень пДНК был повышен независимо от данных допплерометрии. Следовательно, повышение концентрации пДНК может служить показателем плодово-плацентарных нарушений в отсутствие изменения кровотока в маточных артериях. Однако авторы обнаружили значительную корреляцию уровня пДНК с нарушением кровотока в артерии пуповины [55]. Имеются также данные об обратной корреляционной зависимости

между концентрацией пДНК и пульсационным индексом в маточных артериях в первом триместре беременности [125].

Существует большое число биомаркеров ПР в зависимости от этиологического фактора и механизма развития спонтанного начала родов. Для оценки прогностической значимости пДНК при ПР, необходимо определить роль маточно-плацентарной ишемии в этиологии ПР. Misra и соавторы (2009) изучили допплерометрические показатели в маточных артериях и артерии пуповины при неосложненной беременности и ПР [144]. Среднее значение индекса резистентности (ИР) в маточных артериях увеличивалось в течение беременности, в то время как в артерии пуповины значительно снижалось при ПР по сравнению в неосложненным течением [144]. В 22-24 недели среднее значение пульсационного индекса (ПИ) в маточных артериях в исследовании Fonseca и соавторов (2006) также было значительно повышено у женщин с ПР до 33 недель [169]. Однако Cobian-Sanchez и соавторы (2004), определяя ИР в маточных артерия в 18-23 недели, не нашли корреляции с ранними ПР [179]. Также не обнаружена связь в 11-14 недель [90]. Нами не найдено работ, оценивающих корреляцию концентрации пДНК с данными допплерометрии у женщин с ПР. Учитывая противоречивые данные, необходимы дальнейшие исследования для выявления корреляции между концентрацией пДНК в материнской крови и общепринятыми клинико-лабораторными маркерами осложнений беременности.

Таким образом, определение содержания внеклеточной ДНК и ее фракций в крови беременной женщины представляет большой научный интерес с позиций разработки подходов к прогнозированию и ранней диагностики плаценто-ассоциированных осложнений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Диссертационная работа выполнялась на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик Г.Т.Сухих).

В период с 2016 по 2017 гг. в исследование были первоначально включены и обследованы **1012 беременные женщины**. Пациентки были отобраны на основании имеющихся критериев включения и невключения в исследование.

Критерии включения в исследование:

1. Возраст пациенток 18-45 лет.
2. Европеоидная раса.
3. Одноплодная беременность.
4. Информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения в исследование:

1. Австралоидная, негроидная, монголоидная расы.
2. Хромосомные аномалии и пороки развития у плода и плаценты.
3. Аномалии прикрепления и расположения плаценты.
4. Многоплодная беременность.
5. Онкологические заболевания.
6. Острая фаза и обострение хронических инфекционных заболеваний.
7. Аутоиммунные заболевания.
8. Проведенные инвазивные пренатальные исследования в течение беременности.
9. Женщины с трансплантированными органами.

В дальнейшем, **432 женщины** были исключены из исследования по следующим причинам:

- выявленная хромосомная патология плода (9)
- неразвивающаяся беременность (26)
- самопроизвольный поздний выкидыш (12)
- отказ/отсутствие возможности дальнейшего участия в исследовании (338)
- отсутствие информации об исходе в связи с родоразрешением в другом учреждении или потери контакта с пациенткой (47)

В результате **580 пациенток** вошли в окончательный анализ.

2.2. Клиническая характеристика обследованных женщин

Возраст обследованных женщин варьировал в пределах от 21 до 45 лет, в среднем 31.4 ± 4.4 лет. Возрастное распределение беременных представлено на **рисунке 2.2.1**.

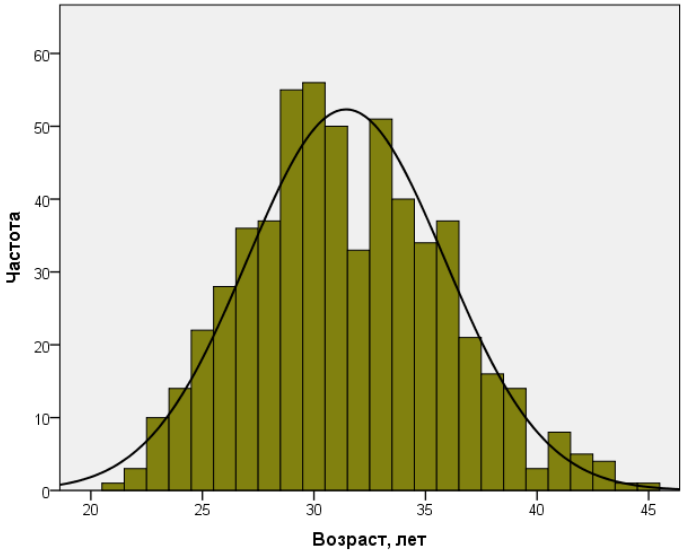

Рисунок 2.2.1. Распределение обследованных женщин по возрасту

Среднее значение ИМТ женщин на момент наступления беременности составило 21.8 ± 3.4 кг/м^2 (15.6 – 44.4 кг/м^2), дефицит массы тела наблюдался у 64 (11.0%) пациенток, ожирение – у 12 (2.1%).

При анализе структуры и частоты экстрагенитальных заболеваний, представленных в **таблице 2.2.1**, было выявлено, что наиболее частой патологией у обследованных женщин явилось нарушение зрения (48.3%). Важно отметить, что заболевания сердечно-сосудистой системы наблюдались у 33.3% беременных, при этом частота встречаемости ХАГ составила 3.4%. Среди эндокринных заболеваний у подавляющего количества женщин выявлен гипотиреоз – 92.3%. Во всех наблюдениях соматические заболевания имели начальные проявления или находились на стадии компенсации.

Таблица 2.2.1. Структура и частота экстрагенитальных заболеваний

Заболевания	**Частота встречаемости абс.число, %**
Орган зрения (миопия)	280 (48.3%)
Дыхательная система (ринит, тонзиллит, бронхит, гайморит)	257 (44.3%)
Сердечно-сосудистая система (ХАГ, вегетососудистая дистония, пролапс митрального клапана, варикозная болезнь)	193 (33.3%)
Кроветворная система (анемия)	27 (4.7%)
Пищеварительная система (гастрит, панкреатит, холецистит, желчекаменная, язвенная болезнь)	183 (31.6%)
Мочевыделительная система (цистит, пиелонефрит, мочекаменная болезнь)	155 (26.7%)
Эндокринная система (сахарный диабет, гипотиреоз, гипертиреоз)	91 (15.7%)
Кожные покровы (экзема, нейродермит)	17 (2.9%)

Анализ данных гинекологического анамнеза показал, что возраст менархе колебался от 10 до 18 лет, и в среднем составил 13.1 ± 1.3 года. У большинства пациенток перед наступлением беременности менструальный цикл был регулярным (87.8%), длительность менструаций колебалась в пределах от 2 до 10

дней. У 74.1% обследованных женщин в анамнезе имелись воспалительные заболевания органов малого таза. Частота и структура гинекологических заболеваний представлена в **таблице 2.2.2**.

Таблица 2.2.2. Структура и частота гинекологических заболеваний

Заболевания	**Частота встречаемости абс.число, %**
Воспалительные заболевания органов малого таза	430 (74.1%)
Вирусные инфекции (цитомегаловирус, вирус папилломы человека, простого герпеса 2 типа)	139 (23.9%)
Эрозия шейки матки	278 (47.9%)
Порок развития матки	18 (3.1%)
Синдром поликистозных яичников	20 (3.5%)
Миома матки	85 (14.7%)
Полип эндометрия	46 (7.9%)
Эндометриоз	63 (10.9%)
Бесплодие в анамнезе	24 (4.1%)

Изучение данных акушерского анамнеза показало, что количество первородящих и повторнородящих было практически одинаковым и составило 278 (47.9%) и 302 (52.1%) женщины, соответственно. Из анализа данных о предыдущих беременностях, представленных в **таблице 2.2.3**, выявлено, что у 197 женщин анамнез был отягощен невынашиванием беременности: неразвивающаяся беременность – 23.8%, самопроизвольный выкидыш – 14.5%.

Таблица 2.2.3. Исходы предыдущих беременностей

	Частота встречаемости абс.число, %

Самопроизвольный выкидыш	84 (14.5%)
Неразвивающаяся беременность	138 (23.8%)
Внематочной беременность (трубная)	15 (2.6%)
Искусственный аборт	104 (17.9%)
Трофобластическая болезнь	3 (0.5%)

Осложнения настоящей беременности у обследованных женщин представлены в **таблице 2.2.4**. Из представленных данных следует заключить, что токсикоз чаще осложнял течение беременности в первом триместре и встречался у каждой второй женщины, а острым респираторным заболеваниям беременные наиболее были подвержены во втором триместре (37.2%). Угроза прерывания беременности и преждевременных родов была диагностирована у 1/3 беременных в первом триместре, далее уменьшалась в 2 раза во втором и третьем триместрах. При этом частота встречаемости истмико-цервикальной недостаточности (ИЦН), потребовавшая хирургической коррекции или установления акушерского пессария, составляла 12%.

Таблица 2.2.4. Осложнения данной беременности

Осложнения	**Частота встречаемости абс.число, %**		
	I трим	**II трим**	**III трим**
Токсикоз	326 (56.2%)	55 (9.5%)	8 (1.4%)
Острые респираторные заболевания	162 (27.9%)	216 (37.2%)	82 (14.1%)
Угроза выкидыша, преждевременных родов	176 (30.3%)	85 (14.7%)	48 (8.3%)

ИЦН (швы, пессарий)	71 (12.2%)		
Гестационный сахарный диабет	78 (13.5%)		
Отеки беременных	8 (1.4%)	96 (16.6%)	170 (29.3%)
Анемия беременных	19 (3.3%)	122 (21.0%)	142 (24.5%)
Бактериурия	12 (2.7%)	22 (3.8%)	15 (2.6%)
Воспалительные заболевания нижних отделов половой системы (кандидоз, неспецифический вульвовагинит)	59 (10.2%)	117 (20.2%)	69 (11.9%)
Гестационная артериальная гипертензия	4 (0.7%)		
Преэклампсия	20 (3.4%)		
Преждевременные роды	49 (8.4%)		
Задержка роста плода	13 (2.2%)		

Частота встречаемости ГАГ составила 0.7%. У 23 (3.8%) из обследованных женщин во время предыдущей беременности была диагностирована преэклампсия, у 3 (13.0%) из них развилось данное осложнение во время данной беременности.

Общее количество наблюдений с ПЭ составило 20 (3.4%). При сравнительном анализе клинико-анамнестических данных пациенток с ПЭ (20 наблюдений) и без развития ПЭ (560 наблюдений) во время данной беременности выявлена достоверно большая частота встречаемости ПЭ в анамнезе (3 (15.0%) из 20 против 20 (3.6%) из 560, **p=0.013**), ХАГ (3 (15.0%) из 20 против 17 (3.0%) из 560, **p=0.006**) и отеков в третьем триместре беременности (12 (60.0%) из 20 против 158 (28.2%) из 560**, p=0.000**) в группе ПЭ.

Из 580 пациенток 49 (8.4%) были родоразрешены преждевременно – 15 (30.6%) через естественные родовые пути, 34 (69.4%) путем операции кесарева сечения. Преждевременные самопроизвольные роды произошли у 7 (46.7%) женщин в связи с началом регулярной родовой деятельности, у 8 (53.3%) женщин

в связи с преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО). Кесарево сечение при сроке беременности менее 37 недель в экстренном порядке произведено по следующим показаниям: начало регулярной родовой деятельности и/или ПРПО при тазовом предлежании плода (8.8%), рубце на матке (26.6%), абдоминальном серкляже (2.9%), ампутации шейки матки в анамнезе (2.9%), неготовности родовых путей (2.9%), начавшейся острой гипоксии плода (2.9%), а также в связи с рубцом на матке после 3-х операций кесарева сечения (5.9%), врастанием плаценты (2.9%), подозрением на несостоятельность рубца на матке (5.9%), преждевременной отслойкой плаценты (5.9%), тяжелой ПЭ при отсутствии эффекта от проводимой терапии (17.7%) и нарушением состояния плода по данным функциональных методов диагностики (14.7%).

Задержка роста плода была диагностирована у 2.2% новорожденных при массе тела менее 10 центилей для данного срока гестации.

Каждая вторая беременная получала гестагены (дидрогестерон, микронизированный прогестерон), кроме того с целью лечения при угрожающих преждевременных родах наиболее часто использовали блокаторы кальциевых каналов – 4.1% **(Таблица 2.2.5)**.

Таблица 2.2.5. Препараты, принимаемые во время данной беременности

Препараты	**Частота встречаемости абс.число, %**
Прогестероновый ряд (дидрогестерон, микронизированный прогестерон)	330 (56.9%)
Метилпреднизолон	46 (7.9%)
Гексопреналин	10 (1.7%)
Блокаторы кальциевых каналов	24 (4.1%)
Нестероидные противовоспалительные средства	4 (0.7%)
Низкомолекулярные гепарины	152 (26.2%)
Антигипертензивные препараты	18 (3.1%)

Антибактериальные препараты	86 (14.8%)
Препараты железа	138 (23.8%)
Витамины	460 (79.3%)

Срок беременности на момент родов варьировал от 163 (23 недели 2 дня) до 294 (42 недели) дней, в среднем 272.7 ± 14.1 день. Частота кесарева сечения составила 42.4%, в плановом порядке выполнено у 109 (44.3%), экстренно – у 137 (55.7%) беременных. Общее количество преждевременных родов составило 49 (8.4%). Тенденция к перенашиванию беременности имела место у 91 (15.7%) женщины. Методы индукции родов использовали у 83 женщин (14.3%), среди которых 67 (80.7%) родоразрешены через естественные родовые пути, 16 (19.3%) – путем операции кесарева сечения. В **таблице 2.2.6** представлены показания к операции кесарева сечения.

Таблица 2.2.6. Показания к операции кесарева сечения

Показания	**Частота встречаемости абс.число, %**
Тазовое предлежание и неправильное положение плода (в сочетании с анатомически узким тазом, рубцом на матке, пороком развития матки)	22 (8.9%)
Анатомически узкий таз (в сочетании с рубцом на матке, крупным плодом, переломом костей таза)	9 (3.7%)
Симфизит (подтвержденный магнитно-резонансной томографией)	8 (3.3%)
Рубец на матке после кесарева сечения (в сочетании с рубцом на матке после миомэктомии, миомой матки, пороком развития матки)	82 (33.3%)
Рубец на матке после миомэктомии, тубэктомии	7 (2.8 %)

Аномалии прикрепления и расположения плаценты (предлежание, врастание)	6 (2.4%)
Экстрагенитальные заболевания (дистрофия сетчатки, панические атаки и др.) по заключению смежных специалистов	16 (6.5%)
Нарастание тяжести преэклампсии	7 (2.9%)
Нарушение состояния плода по данным функциональных методов обследования	12 (4.9%)
Острая гипоксия плода в родах	15 (6.1%)
Аномалии родовой деятельности	8 (3.2%)
Клинически узкий таз	10 (4.1%)
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	4 (1.6%)
Другие (ампутация ш/матки, абдоминальный серкляж, крупный плод и отсутствие эффекта от подготовки шейки матки к родам, удаление копчика, сколиоз IV ст., обострение генитального герпеса, выпадение ручки плода и др.)	40 (16.3%)

Наиболее частым показанием к операции кесарева сечения послужил рубец на матке после операции кесарева сечения в сочетании с миомой матки больших размеров, рубцом на матке после миомэктомии, пороками развития матки – 33.3%. На втором месте по частоте встречаемости явилось неправильное предлежание и положение плода – у 22 (8.9%) беременных. Среди показаний к экстренному оперативному родоразрешению превалировало количество женщин с рубцом на матке и началом регулярной родовой деятельности или ПРПО – 21.2%, а также с острой гипоксией плода – 10.9%.

Обезболивание родов было проведено у 395 беременных (68.1%). Эпидуральная анальгезия применялась практически у каждой второй женщины (45.5%) при родах через естественные родовые пути. Во время операции кесарева

сечения методом выбора явилась спинальная анестезия – у 187 (76.0%) из 246 пациенток, при этом необходимость в проведении эндотрахеального наркоза составила 3.3%.

В 578 наблюдениях родились живые дети с оценкой по шкале Апгар на 1 минуте от 1 до 9 баллов (в среднем 7.9±0.5), на 5 минуте от 1 до 10 баллов (в среднем 8.8±0.6). В 2-х наблюдениях роды произошли мертвым плодом на сроке гестации 23-24 и 32-33 недели. Масса тела новорожденных в среднем составила 3315.3±531.3 граммов (от 480 до 4528 граммов), длина тела 51.3±2.9 см (от 33 до 59 см). Крупные плоды родились у 37 (6.4%) женщин: из них в 1 (2.7%) наблюдении у женщины с сахарным диабетом (СД) I типа, у 7 (18.9%) – с гестационным сахарным диабетом (ГСД). Среди общего количества живорожденных детей 31 (5.4%) поступили в отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН). В **таблице 2.2.7** указаны состояния новорожденных, потребовавшие перевода в ОРИТН.

Таблица 2.2.7. Показания для перевода в ОРИТН

Показания	**Частота встречаемости абс.число, %**
Транзиторное тахипное	8 (1.4%)
Асфиксия в родах, респираторный дистресс синдром	5 (0.9%)
Врожденная пневмония	10 (1.7%)
Врожденный сепсис	2 (0.4%)
Мекониальный илеус, неонатальная желтуха	7 (1.2%)
Очень низкая масса тела при рождении	1 (0.2%)

Среди всех новорожденных детей наиболее часто неонатальный период осложнялся врожденной пневмонией и транзиторным тахипное. В 3 (0.5%)

наблюдениях имелся летальный исход на 2-е, 7-е и 37-е сутки жизни вследствие тяжелой асфиксии, полиорганной недостаточности.

Определение содержания внеклеточной ДНК и ее фракций было проведено у 20 женщин с преэклампсией, у 19 со спонтанными преждевременными родами и у 22 соматически здоровых женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и неосложненным течением данной беременности (контрольная группа).

2.3. Методы исследования

Все женщины, включенные в исследование, прошли детальное обследование, которое включало клинические, клинико-лабораторные, инструментальные методы обследования и комплекс дополнительных лабораторных методов исследования.

2.3.1. Общеклинические методы исследования

Клиническая часть включала подробный сбор анамнеза, общий и акушерско-гинекологический осмотр. При сборе анамнеза особое внимание уделяли уточнению массо-ростовых показателей беременной, исходного АД, наличию хронической артериальной гипертензии, заболеваний мочевыделительной системы, течению предшествующих беременностей, сроку на момент родов при предыдущих беременностях, их исходов. Помимо этого, уточняли особенности течения данной беременности, ее осложнения, изучали данные ультразвуковых и допплерометрических исследований, цервикометрии.

Измерение АД производилось по методу Н.С. Короткова на обеих руках в состоянии покоя (после 5-минутного отдыха) 2 раза с интервалом не менее минуты.

При обследовании новорожденных были оценены массо-ростовые показатели, состояние по шкале Апгар на 1-ой и 5-ой минутах, проанализированы осложнения, диагностированные в раннем неонатальном периоде.

2.3.2. Клинико-лабораторные методы исследования

В соответствии с требованиями приказа N572 в динамике беременности проведено клинико-лабораторное обследование пациенток в объеме: анализ крови на антитела к сифилису, ВИЧ, гепатиту В и С, клинический анализ крови, биохимический анализ крови, гемостазиограмма, определение группы крови и резус фактора, маркеров ПЭ (PLGF, sFlt-1, sFlt-1/PLGF). Также проводили общий анализ мочи, оценивали протеинурию, изучали мазок на флору из влагалища и бактериологическое исследование посева из цервикального канала с определением чувствительности к антибиотикам.

Содержание общего белка, мочевины, креатинина, билирубина общего и прямого, аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) осуществляли в сыворотке крови на биохимическом анализаторе «Ультра», производства фирмы «КОНЕ» (Финляндия) с использованием стандартных компьютерных программ и реактивов.

Концентрацию PAPP-A, b-ХГЧ, PlGF и sFlt-1 в сыворотке крови беременных женщин определяли с помощью электрохемилюминесцентных диагностических тест- систем Elecsys PlGF и Elecsys sFlt-1 концерна «Ф. Хоффманн-Ля Рош» (Швейцария) на автоматическом анализаторе Cobas e 411 той же фирмы.

2.3.3. Инструментальные методы исследования

Инструментальные методы исследования включали проведение ультразвукового и допплерометрического исследований, кардиотокографии плода.

Ультразвуковое исследование

Всем женщинам, которые были включены в исследование, проводили ультразвуковое исследование приборами Hitachi HI VISION Preirus (Япония), GE Voluson E8 (США), Mindray DC-8 (КНР) в 11-14, 24-26 и 30-32 недели беременности. Исследование проводили по стандартному протоколу с определением фотометрических параметров, оценкой анатомии плода, локализации плаценты, объема и характера околоплодных вод, состояния шейки матки.

Допплерометрическое исследование

Всем женщинам при помощи ультразвуковых сканеров Hitachi HI VISION Preirus (Япония), GE Voluson E8 (США), Mindray DC-8 (КНР) было проведено допплерометрическое исследование параметров плодово-плацентарного и маточно-плацентарного кровотоков в режиме пульсовой допплеровской волны.

Антенатальная кардиотокография

Оценку внутриутробного состояния плода проводили всем беременным методом антенатальной и интранатальной кардиотокографии. Исследование проводили на аппаратах «УНИКОС-01» и «Sonicaid Team» (Великобритания), дополненных автоматическим математическим анализом кардиотокограмм в режиме реального времени. В результате кардиотокографии определяли характер базального ритма, вариабельность, количество акцелераций и их амплитуду, наличие децелераций, их характер и амплитуду. Анализ проводили с учётом сократительной активности матки.

2.3.4. Патоморфологическое исследование плаценты

Проведено морфологического исследование последа с определением массы и формы плаценты, длины и прикрепления пуповины, а также степени ее извитости.

Морфологическое исследование выполняли на фрагментах ткани плаценты размерами 1.5 х 1.0 х 0.3 см из краевой, парацентральной и центральной зон (ворсинчатый хорион, базальная, хориальная пластинки). Полученные образцы фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина (Biovitrum, Россия) в течение 24 часов, с последующим заключением в парафин согласно стандартной методике изготовления. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Исследовали не менее 7 фрагментов плаценты: 3, 2 и 2 из центральной, парацентральной и периферической зон, соответственно, с захватом хориальной, базальной пластинки, а также по 2 образца пуповины и экстраплацентарных оболочек. Микроскопическое исследование включало обзорный анализ препаратов плацентарной ткани, окрашенных гематоксилином и эозином.

2.3.5. Специальные методы исследования

Определение концентрации внеклеточной ДНК с выделением плодовой фракции

Забор венозной крови для определения внеклеточной ДНК производили трижды: в сроках 11-14, 24-26 и 30-32 недели. Кровь в объеме 5 мл забирали с соблюдением правил асептики в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, и обрабатывали в течение часа после забора. Выделяли плазму крови центрифугированием в два этапа при 4°С: первый этап – 10 мин, 200 g, второй этап – 10 мин, 4500 g. Образцы плазмы хранили при температуре -80°С. Уровень оДНК

определяли количественным ПЦР-анализом путем выделения гена *RASSF1A*. Оценка уровня пДНК была основана на данных о том, что в клетках плаценты промотер гена *RASSF1A* гиперметилирован, и, соответственно, концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц пДНК. оДНК выделяли из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную ДНК переосаждали этанолом с соосадителем Satellite Red (Евроген, Россия) с предварительной очисткой хлороформом, далее разводили в 13 мкл воды. 10 мкл раствора ДНК использовали в реакции метилчувствительной рестрикции для выделения гиперметилированной части гена *RASSF1A*. С этой целью использовали фермент BstUI (NEB, England) 60 Е. Реакцию рестрикции проводили 6 ч при 60°С, после чего ДНК осаждали этанолом с предварительным удалением рестриктаз с помощью хлороформа. Полученную ДНК растворяли в 10 мкл воды. 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР для контроля рестрикции с праймерами к гену *ACTB*. В случае отсутствия ответа оставшийся раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к гену *RASSF1A*. ПЦР-анализ проводили одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, который изготовили из ДНК, выделенной из крови, с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия). Концентрацию ДНК-стандартов определяли с помощью флуориметра Qubit 3.0. Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 (BioRad, USA). Программа ПЦР: 95 °С – 3 мин, 45 циклов: 95°С 10 с, 60°С 15 с, 72°С 30 с. Последовательности праймеров и зондов представлены в **таблице 2.3.5.1**.

Таблица 2.3.5.1. Последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность	Праймер/Зонд
RASSF1A	CCGTGGCCACCGCTTCC	Прямой праймер

	CGCACGACGCCCCAGATG	Обратный праймер
	(R6G)GGGCCCGCCACGCACACG(BHQ2)	Зонд
ACTB	GCAAAGGCGAGGCTCTGT	Прямой праймер
	CGTTCCGAAAGTTGCTTTTATGG	Обратный праймер
	(FAM)ACCGCCGAGACCGCGTC(MGB)	Зонд

2.3.6. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и при помощи программных пакетов «MedCalc Statistical», «IBM SPSS Statistics 20». Для описания количественных параметров в зависимости от закона распределения определяли среднее значение, среднеквадратическое отклонение, минимальное и максимальное значения, медиану, интерквартильный интервал, для качественных данных – частоты (%).

Для сравнения и определения различий данных между группами применяли методы непараметрической статистики: для независимых выборок – тест Манна-Уитни, для зависимых выборок – тест Вилкоксона. Для сравнения качественных показателей использовали тест X^2 при помощи построения таблиц сопряженности. С целью определения степени взаимосвязи (корреляции) между количественными показателями рассчитывали ранговый коэффициент корреляции по Спирману. Достоверность полученных различий данных, а также выявленных корреляционных зависимостей определяли при помощи расчета вероятности ошибки – p. Согласно общепринятой в аналитической статистике терминологии при $p \leq 0.05$ выводы считались значимыми, при $p \leq 0.01$ очень значимыми, при $p \leq 0.001$ – максимально значимыми.

Оценка прогностической значимости исследуемых показателей проводилась по результатам ROC-анализа. Для исследования влияния различных независимых между собой переменных на развитие одного признака применялся метод регрессионного анализа (бинарная логистическая регрессия, множественная логистическая регрессия). Вероятность события определялась по формуле:

$$\mathbf{p = 1 / (1 + e^{-z})}$$

где p – вероятность наступления события, e – основание натурального логарифма равное 2.718281828, z – регрессионная функция, имеющая вид:

$$\mathbf{z = b1*X1 + b2*X2 + \ldots + bn*Xn + a}$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Внеклеточная ДНК в динамике неосложненной беременности

Проведено исследование 66 образцов материнской крови 22 здоровых беременных для определения содержания внеклеточной ДНК в динамике неосложненной беременности.

Возраст женщин на момент родов в исследуемой группе колебался от 24 до 39 и составлял в среднем 30.1 ± 4.1 года. Все пациентки имели нормальный исходный ИМТ, который в среднем составил 20.7 ± 2.3 кг/м^2. Исходное артериальное давление (АД) колебалось в пределах нормальных значений, медиана систолического АД (сАД) составила 110.0 (90.0-120.0), диастолического АД (дАД) – 60.0 (55.0-80.0), среднего АД (срАД) – 76.7 (70.0-93.3) мм рт.ст. Среди вредных привычек было выявлено курение, при этом 5 (22.7%) из 22 женщин курили до беременности, 1 (4.6%) пациентка продолжала в течение данной беременности.

Нами был проведен анализ соматического и гинекологического анамнеза **(Рисунки 3.1.1 и 3.1.2)**.

В структуре экстрагенитальной патологии превалировали ранее перенесённые заболевания органов дыхания (ринит, тонзиллит, бронхит) и не тяжелые заболевания органов зрения (миопия, астигматизм) – 54.6% и 50.0%, соответственно. Среди заболеваний сердечно-сосудистой системы у 5 (22.7%) женщин выявлен пролапс митрального клапана (ПМК), у 4 (18.18%) – варикозное расширение вен нижних конечностей. Также встречались заболевания желудочно-кишечного тракта (гастрит, дискинезия желчевыводящих путей) в 22.7% наблюдений, мочевыделительной системы (цистит, пиелонефрит, нефроптоз) – 27.3%, мутации генов тромбофилии низкого риска – у 2 (9.1%) беременных. Все заболевания протекали в легкой форме, на момент беременности и родоразрешения не было отмечено обострения хронических процессов.

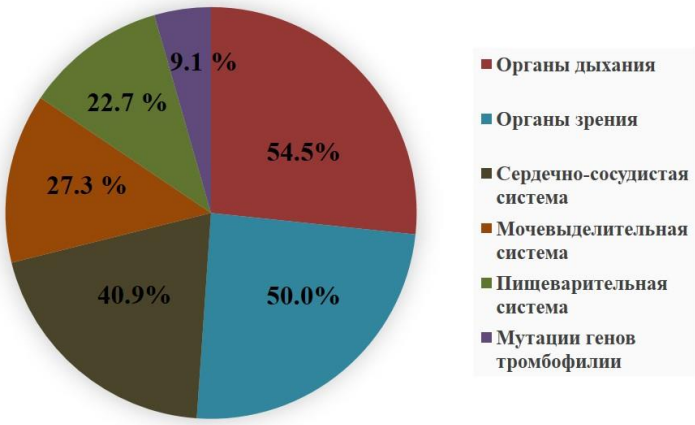

Рисунок 3.1.1. Структура и частота экстрагенитальной патологии

Наиболее частой гинекологической патологией в анамнезе явились воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) (кандидоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, неспецифические вульвовагиниты) – 63.6%. Эрозия шейки матки до беременности имела место у 7 (31.8%) женщин, синдром поликистозных яичников – у 2 (9.1%), миома матки – у 1 (4.6%).

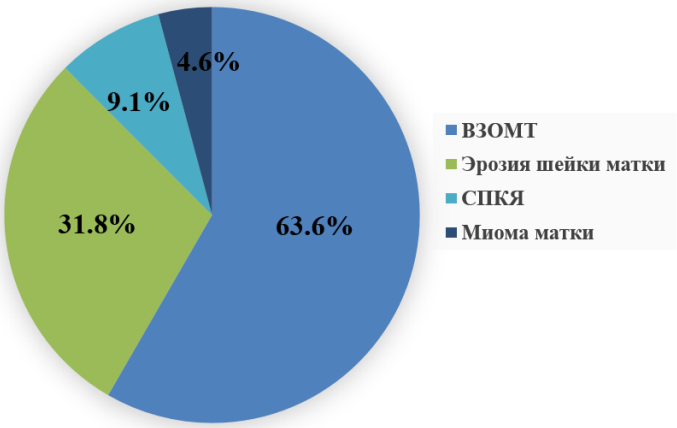

Рисунок 3.1.2. Структура и частота гинекологических заболеваний

В половине наблюдений женщины были первородящими. Частота неразвивающейся, внематочной беременности, выкидыша и искусственного прерывания представлена на рисунке (**Рисунок 3.1.3)**.

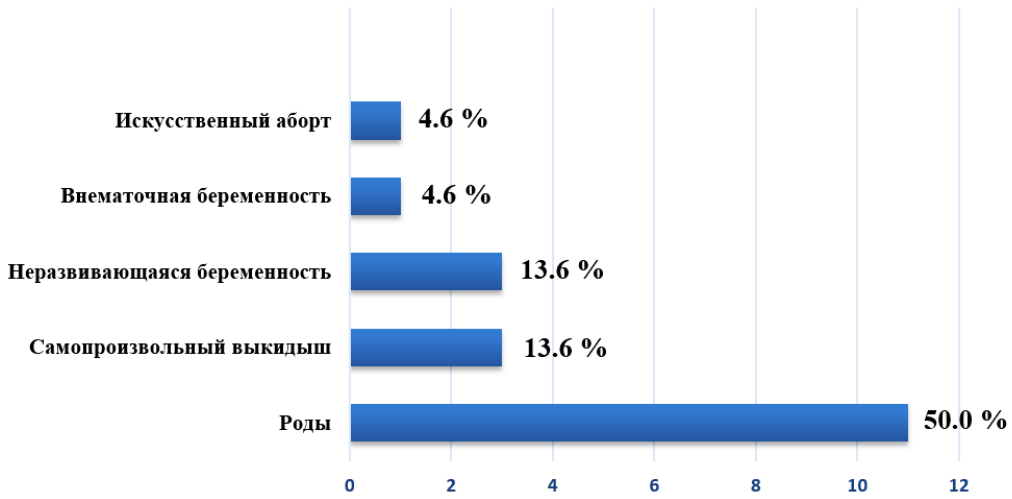

Рисунок 3.1.3. Исходы предыдущих беременностей

Анализ течения беременности выявил, что в первом триместре у половины женщин имелись признаки токсикоза легкой степени, в 36.4% случаев – ринит беременных, не потребовавший медикаментозного лечения **(Рисунок 3.1.4)**. Отеки стоп были отмечены у 2 (9.1%) женщин. АД в первом триместре беременности не отличалось от исходного АД (медиана сАД – 110.0 (90.0-120.0), дАД – 60.0 (60.0-80.0), срАД – 76.7 (70.0-93.3) мм рт.ст.) (p>0.05). Гестагены (дидрогестерон, микронизированный прогестерон) принимали 54.6% беременных (с последующей отменой во 2 и 3 триместре), витамины (фолиевая кислота, поливитамины) – все женщины.

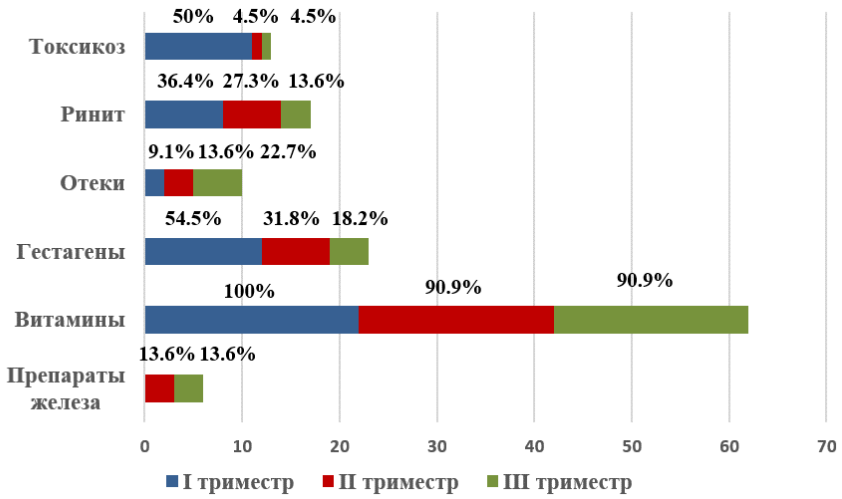

Рисунок 3.1.4. Характеристика течения беременности

Во втором и третьем триместрах беременности признаки токсикоза легкой степени сохранялись лишь у 1 (4.6%) женщины, ринита беременных – у 6 (27.3%) и 3 (13.6%), соответственно. Отеки нижних конечностей незначительно прогрессировали и выявлены у 3 (13.6%) беременных во втором и у 5 (22.7%) в третьем триместре. Не отмечено значимого изменения в показателях АД ($p>0.05$). Витамины были отменены у 2 (9.1%) женщин, однако с профилактической целью со второго триместра 3 (13.6%) беременным назначен прием препаратов железа. Не было выявлено отклонений в показателях лабораторных методов исследования в течение беременности. Данные ультразвуковых, допплерометрических и кардиотокографических методов исследования были в пределах нормативных значений и соответствовали гестационному сроку.

Все пациентки родоразрешены в доношенном сроке беременности (медиана 281.5 (264.0-288.0) дней). Через естественные родовые пути роды произошли у 16 (72.7%) беременных, путем операции кесарева сечения – у 6 (27.3%) женщин. Показаниями к плановому оперативному родоразрешению послужили в 3-х наблюдениях рубец на матке, в 1-м – симфизит. В экстренном порядке прооперированы 2 женщины в связи с начавшейся острой гипоксией плода в родах. Родились 12 (54.6%) девочек и 10 (45.4%) мальчиков. Оценка состояния новорожденного по шкале Апгар на 1-й и 5-й минуте после родов составила медиана 8.0 (8.0-9.0) и 9.0 (8.0-9.0) баллов, соответственно. Масса тела новорожденных соответствовала гестационному сроку и составила от 2855.0 до 3902.0 граммов (медиана 3305.0 граммов), длина тела от 49.0 до 55.0 см (медиана 51.5 см). Все дети поступили в отделение физиологии новорожденных. Кровопотеря после родоразрешения не превышала допустимую норму (менее 500 мл после родов через естественные родовые пути, менее 1000 мл при абдоминальном родоразрешении). Измерение массы плаценты было доступно у 18 женщин, медиана составила 438.5 (310.0-553.0) граммов.

Патоморфологическое исследование плаценты

Проведено гистологическое исследование 18 образцов. На микропрепаратах ткани плаценты, окрашенных гематоксилином, определялось нормально капилляризованное ворсинчатое дерево с балансом зрелых промежуточных и терминальных ворсин, в то время как незрелые промежуточные ворсины были представлены в виде мелких скоплений. В исследованных образцах не выявлено дистрофических изменений, признаков воспалительных процессов или расстройств кровообращения.

Анализ внеклеточной ДНК

Внеклеточная пДНК выделяется из внеклеточной оДНК, в состав которой входит также мДНК. В связи с этим, мы посчитали необходимым проанализировать также концентрацию оДНК и мДНК в динамике беременности.

Концентрация оДНК не различалась в первом и втором триместре беременности (медиана 208.11 (156.95-461.35) и 298.68 (126.66-458.85) ГЕ/мл в 11-14 и 24-26 недель, соответственно), далее отмечалось увеличение к 30-32 неделям (медиана 424.79 (154.43-739.99) ГЕ/мл) **(p=0.039) (Рисунок 3.1.5)**. Уровень мДНК оставался относительно стабильным до 24-26 недель (медиана в 11-14 недель – 201.80 (131.97-442.70), в 24-26 недель – 275.73 (115.89-428.16) ГЕ/мл) с последующим увеличением концентрации к 30-32 неделям беременности (медиана 398.56 (117.83-671.01) ГЕ/мл) **(p<0.05) (Рисунок 3.1.5)**.

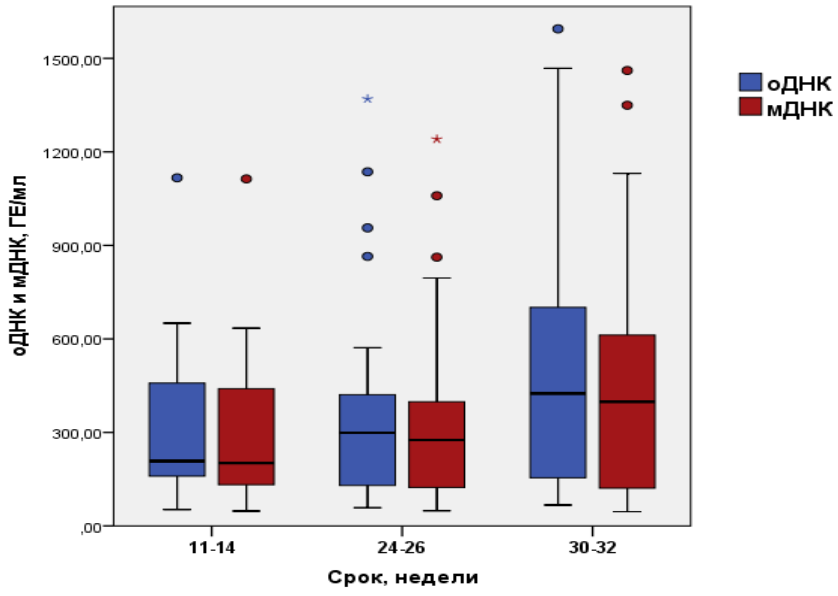

Рисунок 3.1.5. Концентрация оДНК и мДНК в динамике беременности

В 11-14 недель беременности концентрация пДНК определялась во всех наблюдениях, медиана составила 14.15 (6.55-19.40) ГЕ/мл. Отмечено существенное повышение уровня пДНК к 24-26 неделям до 24.87 (15.61-38.80) ГЕ/мл **(p=0.002)**, к 30-32 неделям – до 32.62 (16.49-71.10) ГЕ/мл **(p=0.005) (Рисунок 3.1.6)**.

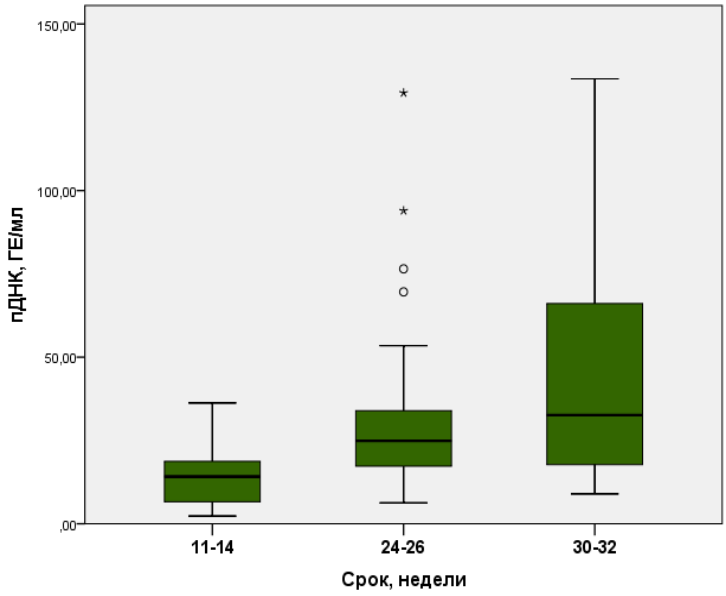

Рисунок 3.1.6. Концентрация пДНК в динамике беременности

Процентное содержание пДНК от оДНК составляло от 0.31 до 34.30% (медиана 5.36%) в I триместре, от 3.13 до 34.21% (медиана 8.89%) во II триместре и от 1.28 до 42.41% (медиана 10.66%) в III триместре беременности **(Рисунок 3.1.7)**.

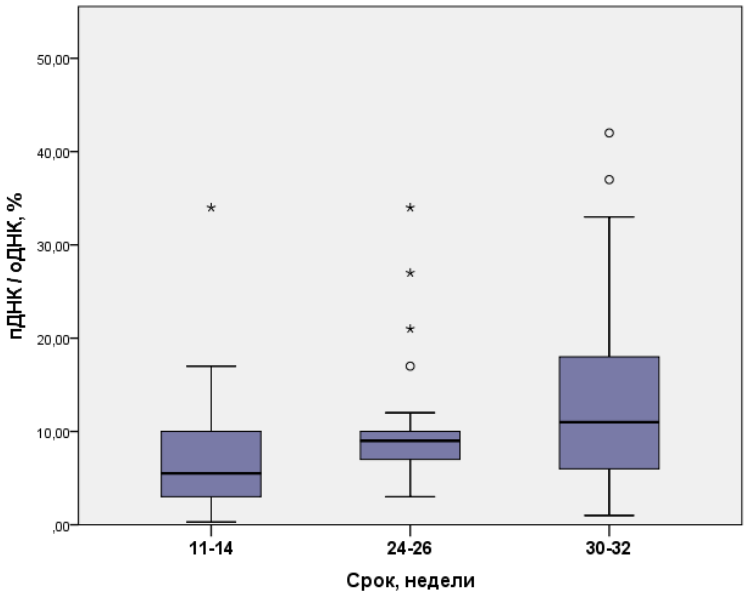

Рисунок 3.1.7. Процентное содержание пДНК от оДНК в динамике беременности

В 24-26 и 30-32 недели доля пДНК была значимо больше, чем в 11-14 недель гестации **(p<0.03)**.

Мы проанализировали динамику изменения концентрации пДНК в изученные сроки в каждом наблюдении. У 5 из 22 беременных уровень пДНК незначительно снижался от первого триместра беременности к 24-26 неделям (медиана 5.28 (2.72-6.27) ГЕ/мл), у 5 женщин – от 24-26 недель к 30-32 неделям (медиана 2.07 (1.23-15.56) ГЕ/мл). В остальных наблюдениях (77.3%) уровень пДНК увеличивался еженедельно, в первой половине беременности медиана составила 1.47 (0.59-3.39) ГЕ/мл/нед, после 24-26 недель – 2.34 (0.74-5.16) ГЕ/мл/нед.

Для определения зависимости концентрации фракций оДНК от паритета родов женщины были разделены на 2 группы: первородящих (11 беременных) и повторнородящих (11 беременных). Нами не обнаружено различий в концентрации

мДНК и пДНК между группами в динамике беременности (p>0.05) **(Рисунки 3.1.8 и 3.1.9).**

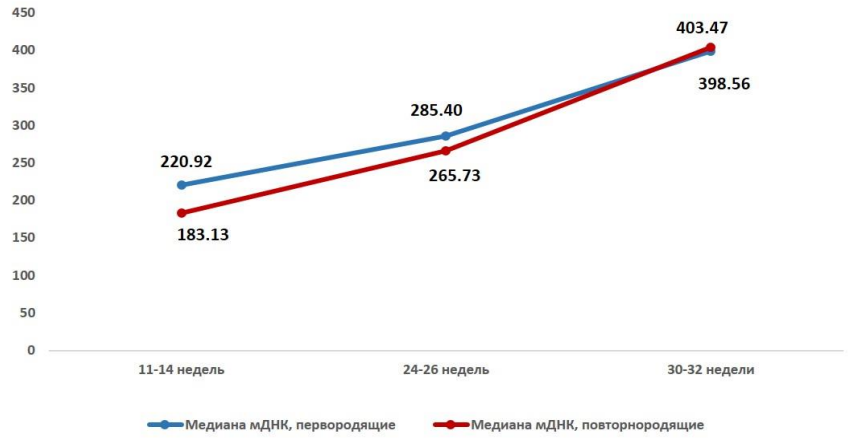

Рисунок 3.1.8. Концентрация мДНК в динамике беременности у перво- и повторнородящих

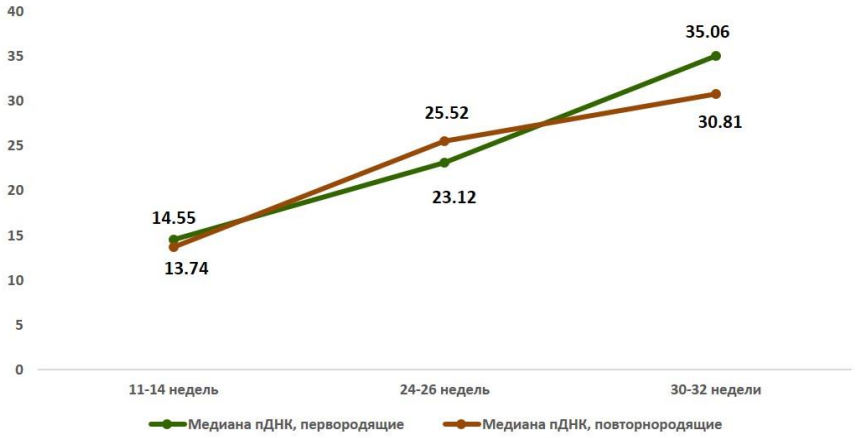

Рисунок 3.1.9. Концентрация пДНК в динамике беременности у перво- и повторнородящих

Также не различалось содержание мДНК и пДНК у женщин с плодом мужского (10 беременных) и женского (12 беременных) пола. **(Рисунки 3.1.10 и 3.1.11)**.

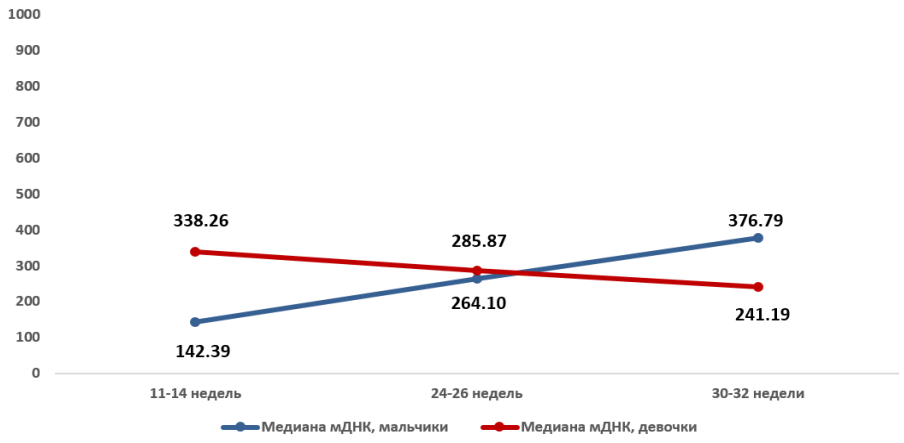

Рисунок 3.1.10. Концентрация мДНК в динамике беременности у женщин с плодом мужского и женского пола

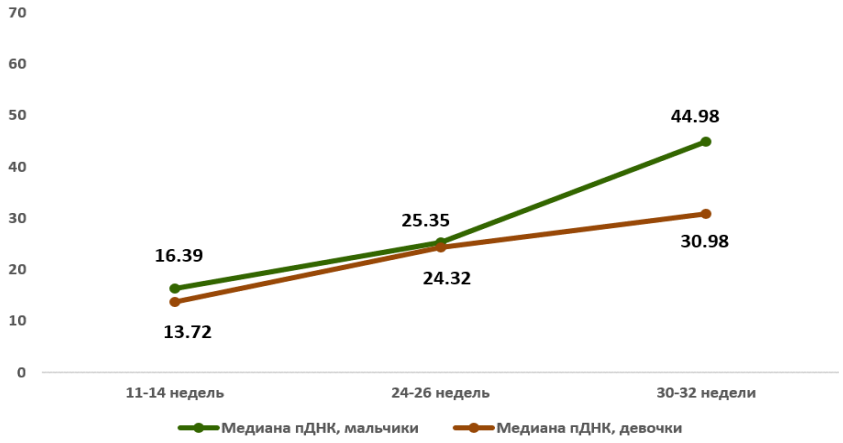

Рисунок 3.1.11. Концентрация пДНК в динамике беременности у женщин с плодом мужского и женского пола

Нами проведен корреляционный анализ данных внеклеточной ДНК с возрастом, ИМТ женщины, массой и длиной тела новорожденного, массой плаценты – корреляций не выявлено **(Таблица 3.1.1)**. Также не обнаружено зависимости между внеклеточной ДНК и биохимическими показателями скрининга первого триместра беременности **(Таблица 3.1.1)**.

Таблица 3.1.1. Результаты корреляционного анализа

	Коэффициент корреляции (r), p>0.05

		оДНК, ГЕ/мл	мДНК, ГЕ/мл	пДНК, ГЕ/мл
Возраст, лет	11-14 нед	0.225	0.248	-0.265
	24-26 нед	-0.104	-0.091	-0.070
	30-32 нед	0.243	0.187	0.192
ИМТ, кг/м^2	11-14 нед	-0.164	-0.151	-0.086
	24-26 нед	-0.155	-0.163	0.027
	30-32 нед	-0.327	-0.129	-0.374
Масса новорожденного, граммов	11-14 нед	0.081	0.079	-0.106
	24-26 нед	0.038	0.079	0.009
	30-32 нед	-0.097	0.069	-0.173
Длина тела новорожденного, см	11-14 нед	0.154	0.146	0.220
	24-26 нед	-0.083	-0.079	-0.124
	30-32 нед	-0.079	-0.074	-0.100
Масса плаценты, граммов	11-14 нед	-0.093	-0.058	-0.233
	24-26 нед	-0.191	-0.170	-0.106
	30-32 нед	-0.121	-0.082	-0.217
b-ХГЧ, МЕ/л	11-14 нед	-0.108	-0.089	0.234
	24-26 нед	-0.243	-0.258	-0.145
	30-32 нед	0.145	0.018	0.158
PAPP-A, МЕ/л	11-14 нед	0.171	0.163	-0.202
	24-26 нед	0.115	0.115	0.068
	30-32 нед	0.338	-0.070	0.338

Однако, корреляционный анализ концентрации внеклеточной ДНК с данными допплерометрии показал, что оДНК и мДНК в 24-26 недель обратно коррелировали с пульсационным индексом (ПИ) правой маточной артерии (МА)

(r= -0.615, p=0.019 и **r= -0.644, p=0.013**, соответственно**)** и артерии пуповины (АП) **(r= -0.780, p=0.002** и **r= -0.802, p=0.001**, соответственно**)** в 30-32 недели, в то время как пДНК в 24-26 недель обратно коррелировала со средним ПИ МА **(r= -0.446, p=0.043)** во время проведения скрининга первого триместра беременности.

Также выявлена взаимосвязь между содержанием PAPP-A в плазме крови женщины с ее исходным ИМТ **(r= -0.439, p=0.041)**, массой плаценты с массой тела новорожденного **(r= 0.636, p=0.005)**.

У 11 (50%) беременных роды начались спонтанно: у 6 женщин – до 40 недель беременности (1 группа), у 5 женщин – после 40-й недели (2 группа). Концентрация пДНК не различалась в группах **(Таблица 3.1.2)**. Обнаружены более высокие значения оДНК и мДНК во 2-й группе по сравнению с 1-й, однако достоверных различий в исследуемые сроки беременности не выявлено.

Таблица 3.1.2. Внеклеточная ДНК при начале родовой деятельности до и после 40 недель беременности

Срок	**ДНК, ГЕ/мл**	**До** 40 недель (n=6)	**После** 40 недель (n=5)	**p-value**
11-14 недель	**оДНК**	200.49 (124.85-324.77)	501.02 (236.31-883.69)	**> 0.05**
	мДНК	187.98 (110.99-318.59)	487.33 (215.49-873.89)	
	пДНК	11.59 (4.19-18.00)	13.74 (8.58-21.99)	
24-26 недель	**оДНК**	275.45 (73.07-771.25)	357.06 (279.12-382.44)	**> 0.05**
	мДНК	260.76 (57.51-698.83)	324.97 (251.85-350.95)	
	пДНК	24.31 (7.75-72.42)	31.40 (26.09-33.01)	

30-32 недели	**оДНК**	180.73 (154.43-807.87)	537.10 (252.85-962.37)	**> 0.05**
	мДНК	139.74 (120.09-745.89)	471.42 (229.32-930.50)	
	пДНК	35.06 (21.79-77.51)	29.34 (16.19-57.38)	

*Данные представлены как медианы (интерквартильный интервал)

Также не выявлено зависимости между концентрацией внеклеточной ДНК и сроком начала регулярной родовой деятельности (**Таблица 3.1.3)**.

Таблица 3.1.3. Результаты корреляционного анализа внеклеточной ДНК со сроком родов

		Коэффициент корреляции (r), p>0.05		
		оДНК	**мДНК**	**пДНК**
Срок родов, дни	11-14 нед	0.553	0.521	-0.256
	24-26 нед	-0.014	0.000	0.123
	30-32 нед	0.445	0.372	0.018

Таким образом, нами было выявлено, что концентрация внеклеточной оДНК увеличивается в течение неосложненной беременности в соответствии с изменением ее фракций. Уровень мДНК относительно стабилен до середины срока гестации, далее происходит увеличение концентрации во второй половине беременности. Концентрация пДНК положительно коррелирует со сроком беременности, увеличиваясь в среднем на 1.47 ГЕ/мл/нед в её первой половине и на 2.34 ГЕ/мл/нед во второй. Уровень внеклеточной ДНК не меняется с возрастом, не зависит от исходного ИМТ, паритета родов, пола плода. Колебания показателей биохимических маркеров скрининга первого триместра беременности в пределах нормативных значений не коррелируют с уровнем внеклеточной оДНК и ее

фракций. Увеличение концентрации оДНК и мДНК в 24-26 недель сопровождалось уменьшением ПИ правой МА и АП в 30-32 недели. При повышении среднего ПИ МА в 11-14 недель наблюдалось уменьшение уровня пДНК в 24-26 недель. При неосложненном течении беременности масса и длина тела плода и масса плаценты не влияют на концентрацию внеклеточной ДНК, однако масса плода положительно коррелирует с изменением массы плаценты. В изученные сроки беременности нет зависимости между уровнем внеклеточной ДНК и сроком начала родов.

3.2. Внеклеточная ДНК в материнской крови при преэклампсии

В соответствии с целью и задачами исследования среди обследованных женщин ретроспективно были отобраны беременные с ПЭ. Критериями постановки диагноза послужили наличие артериальной гипертензии сАД ≥ 140 и/или дАД ≥ 90 мм рт.ст. и протеинурии ≥ 0.3 г/л в суточной пробе мочи после 20 недель беременности.

Данное осложнение диагностировали у 20 беременных, что составило 3.4% среди всех наблюдений. Проведено исследование 60 образцов материнской крови для определения динамики изменения содержания внеклеточной ДНК.

В зависимости от срока манифестации ранняя (рПЭ) и поздняя ПЭ (пПЭ) встречались у равного количества женщин **(Таблица 3.2.1)**. При рПЭ тяжелое течение наблюдалось у половины беременных, при пПЭ – у 2 беременных.

Таблица 3.2.1. Срок манифестации, показатели АД и протеинурии при ранней и поздней ПЭ

	рПЭ (n=10)	**пПЭ (n=10)**
Срок манифестации, недели	31.0 (26.0-33.0)	37.5 (34.0-39.0)
сАД, мм рт.ст.	147.0 (140.0-190.0)	147.5 (135.0-190.0)
дАД, мм рт.ст.	98.0 (90.0-135.0)	100.0 (90.0-101.0)

срАД, мм рт.ст.	114.4 (106.7-153.3)	114.2 (106.7-130.0)
Суточная протеинурия, г/л	1.4 (0.3-5.0)	0.7 (0.3-3.0)

*Данные представлены как медианы (мин.-макс. значения)

В таблице 3.2.2 представлено сравнение клинико-анамнестических данных женщин с ПЭ и неосложненным течением беременности.

Таблица 3.2.2. Клинико-анамнестические данные исследуемых групп

	Норма (n=22)	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Возраст, лет	30.1 ± 4.1 (24 – 39)	31.6 ± 5.4 (23 – 45)	0.347
Исходный ИМТ, кг/м^2	20.7 ± 2.3 (15.6 – 26.0)	23.5 ± 5.2 (18.0 – 39.7)	**0.036**
Курение	6 (27.3%)	8 (40.0%)	0.387
ПЭ в анамнезе	0	3 (15.0%)	0.169

*Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (мин.-макс. значения), n (%)

Средний возраст женщин с ПЭ составил 31.6 ± 5.4 лет. Различий в возрастных показателях между группами выявлено не было. В группе ПЭ у 1 (5.0%) пациентки на момент наступления беременности наблюдался дефицит массы тела, у 6 (30.0%) – избыточный вес, у 1 (5.0%) – ожирение. Средний ИМТ в группе ПЭ составил 23.5 ± 5.2 кг/м^2, что значимо больше, чем в контрольной группе **(p=0.036)**. Анализ вредных привычек выявил курение в обеих группах, однако значимых различий между группами не обнаружено. Отягощенный анамнез предшествующей ПЭ имели только 3 (15.0%) женщины из группы ПЭ, при этом данный критерий не достиг статистической значимости.

При изучении соматической патологии были выявлены значимые различия в частоте встречаемости заболеваний между ПЭ и контрольной группой (**Таблица**

3.2.3). В группе ПЭ, аналогично контрольной группе, превалировали заболевания органов дыхания (65.0% и 54.5%, соответственно; p>0.05). Заболевания сердечно-сосудистой системы, в том числе ХАГ и варикозная болезнь, чаще встречались в группе ПЭ, однако значимых различий между группами не выявлено. Мутации генов тромбофилии низкого риска были выявлены у 8 (40.0%) беременных с ПЭ, что достоверно больше, чем в группе контроля **(p=0.042)**. Нарушения в кровеносной системе (анемия, тромбозы в анамнезе) и эндокринные заболевания отягощали анамнез только женщин с ПЭ, однако при статистическом анализе значимость не была подтверждена. Заболевания органов зрения и мочевыделительной системы встречались практически с одинаковой частотой и не различались по группам. Заболевания желудочно-кишечного тракта выявлены у 5 (22.7%) и 12 (60.0%) женщин, что оказалось значимо больше при ПЭ **(p=0.025)**.

Таблица 3.2.3. Частота встречаемости экстрагенитальных заболеваний при ПЭ и в контрольной группе

Нозология	**Норма (n=22)**	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Заболевания органов дыхания	12 (54.5%)	13 (65%)	0.491
Заболевания органов зрения	11 (50.0%)	9 (45.0%)	0.747
Заболевания сердечно-сосудистой системы	5 (22.7%)	5 (25.0%)	0.863
Хроническая артериальная гипертензия	0	3 (15.0%)	0.169
Мутации генов тромбофилии	2 (9.1%)	8 (40.0%)	**0.042**
Тромботические осложнения в анамнезе	0	2 (10.0%)	0.263
Анемия	0	3 (15.0%)	0.169
Эндокринные заболевания	0	2 (10.0%)	0.263
Заболевания желудочно-кишечного тракта	5 (22.7%)	12 (60.0%)	**0.025**

Заболевания мочевыделительной системы	6 (27.3%)	5 (25.0%)	0.867
Варикозная болезнь	4 (18.2%)	5 (25.0%)	0.593

*Данные представлены n (%)

Анализ данных гинекологического анамнеза показал, что ВЗОМТ, эрозия шейки матки, синдром поликистозных яичников (СПКЯ), миома матки и эндометриоз в исследуемых группах встречались с одинаковой частотой **(Рисунок 3.2.2)**. Также не выявлено различий в приеме комбинированных оральных контрацептивов (КоК) между группами.

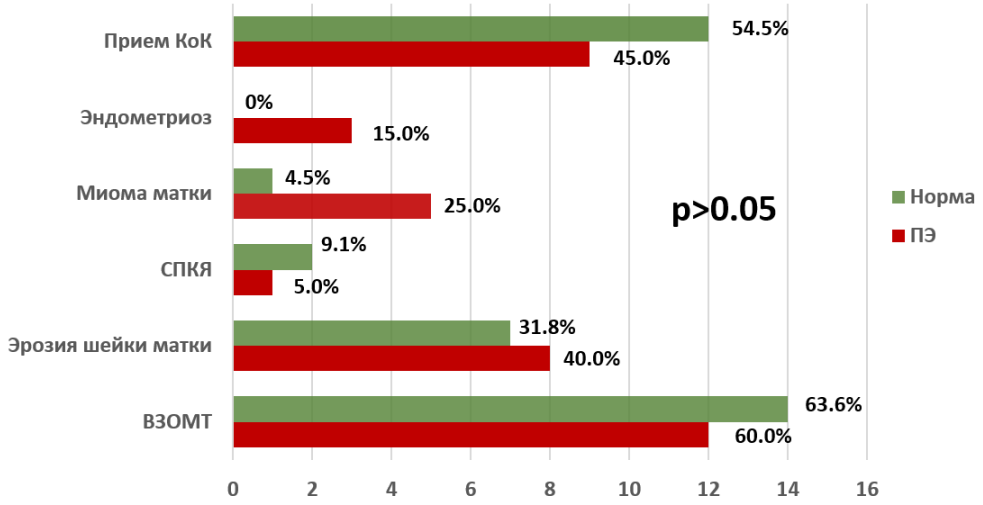

Рисунок 3.2.2. Структура и частота гинекологических заболеваний в исследуемых группах

У 45.0% женщин из группы ПЭ данная беременность была первая, у 60.0% – предстояли первые роды (против 27.3% и 50.0% группы нормы, p>0.05). Репродуктивный анамнез в обеих группах в равной степени был отягощен искусственным и самопроизвольным прерыванием беременности, а также внематочной и неразвивающейся беременностью (p>0.05) **(Рисунок 3.2.3)**.

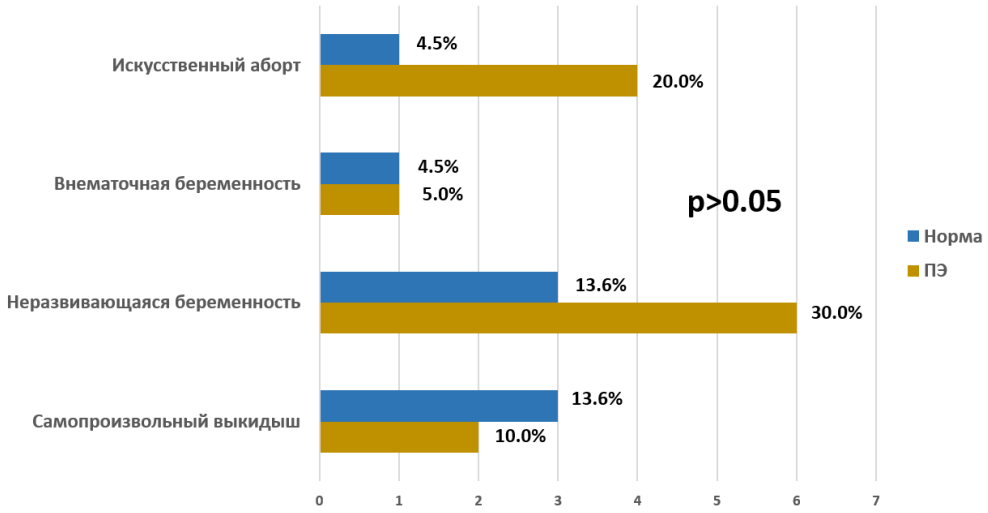

Рисунок 3.2.3. Исходы предыдущих беременностей в исследуемых группах

При анализе течения первого триместра беременности было выявлено, что токсикоз легкой степени, риниты и отеки беременных в равной степени встречались в группах **(Рисунок 3.2.4)**.

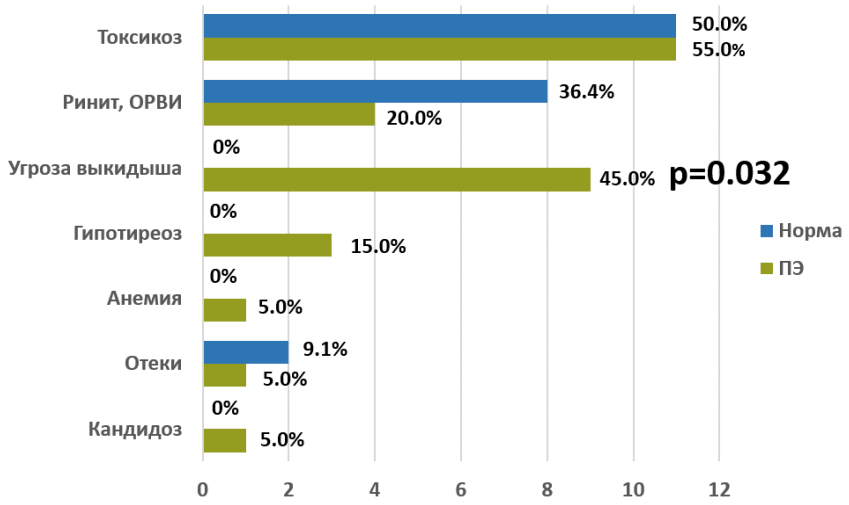

Рисунок 3.2.4. Характеристика течения первого триместра беременности в исследуемых группах

У женщин из группы ПЭ в первом триместре чаще встречалась угроза прерывания беременности (9 наблюдений) вследствие повышенного тонуса матки и наличия кровяных выделений из наружных половых путей **(p=0.032).** Значимых различий по частоте встречаемости других осложнений беременности, таких как

гипотиреоз (4 наблюдения), анемия легкой степени (1 наблюдение), нарушение микрофлоры влагалища (1 наблюдение), в исследуемых группах обнаружено не было. Данные биохимических маркеров скрининга первого триместра беременности, таких как ХГЧ и PAPP-A, не различались в группах (при ПЭ медиана 55.2 (28.6-95.4) и 2.8 (1.5-4.1) МЕ/л, в контрольной группе – 39.1 (27.8-68.2) и 2.8 (2.1-4.6) МЕ/л, соответственно) (p>0.05).

В первом триместре беременности половина женщин из группы ПЭ принимали гестагены (дидрогестерон, микронизированный прогестерон), 5.0% – препараты железа и антибактериальные средства (АБ), 35.0% – низкомолекулярные герапины (НМГ) (эноксапарин натрия, надропарин кальция), при этом различий с группой нормы не выявлено **(Рисунок 3.2.5)**. Возможными факторами риска развития осложнений беременности, вследствие которых в группе ПЭ были назначены НМГ явились в 2 наблюдениях наличие ХАГ, в 1 – ПЭ в анамнезе, в 3 – варикозная болезнь и мутации генов тромбофилии. При неосложненном течении гестации все беременные принимали витамины (фолиевая кислота, поливитамины), что значимо больше, чем в группе ПЭ **(p=0.019)**.

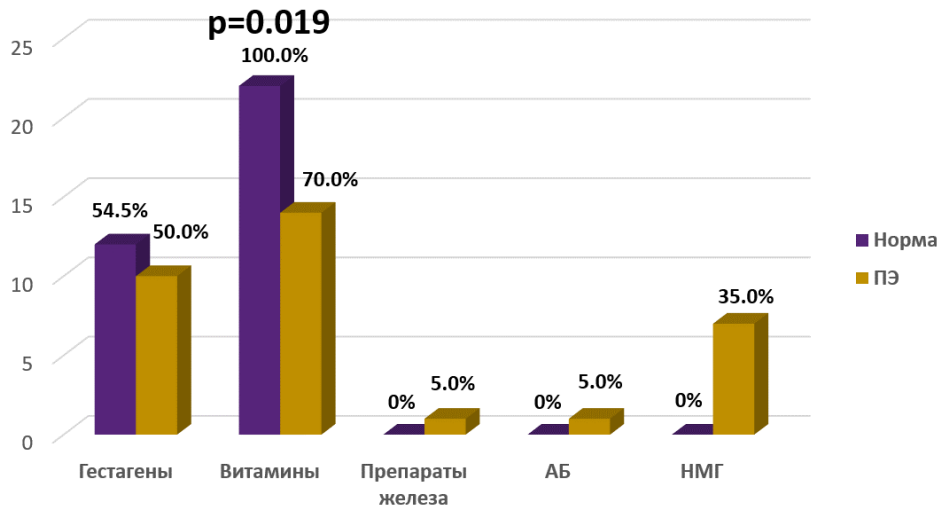

Рисунок 3.2.5. Лекарственные препараты, принимаемые в первом триместра беременности в исследуемых группах

Во втором триместре беременности отмечалось уменьшение частоты токсикоза в обеих группах, однако у женщин из группы ПЭ более часто встречались респираторные заболевания **(Рисунок 3.2.6).** У 3 (15.0%) женщин из группы ПЭ периодически отмечался повышенный тонус матки. В этой группе чаще встречались наблюдалось беременные с гипотиреозом (20.0%), анемией (25.0%), отеками (25.0%), нарушением состояния микрофлоры влагалища (20.0%). ГСД был выявлен у 1 (5.0%) беременной, истмико-цервикальная недостаточность – у 2 (10.0%), бактериурия – у 3 (15.0%) в группе ПЭ. При статистическом анализе не было обнаружено значимых различий в исследуемых группах.

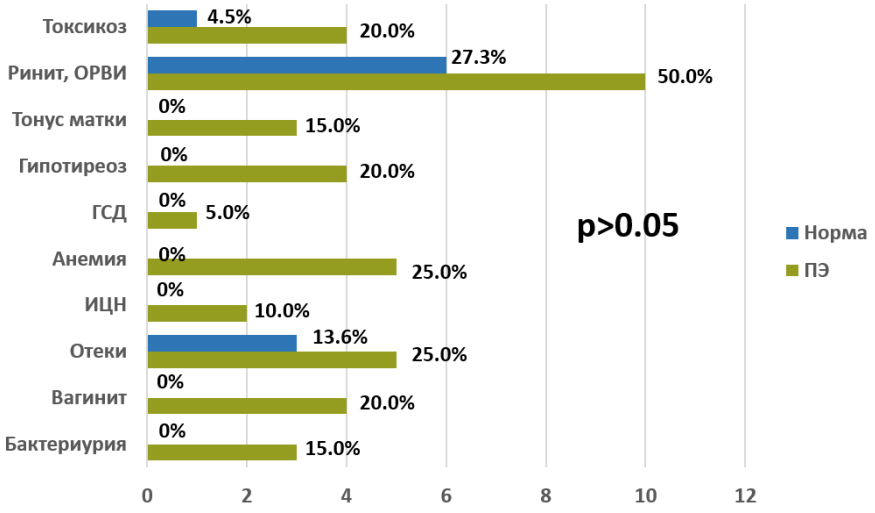

Рисунок 3.2.6. Характеристика течения второго триместра беременности в исследуемых группах

Во втором триместре беременности обращает на себя внимание начало приема антигипертензивных препаратов 3-мя (15.0%) пациентками в связи с признаками артериальной гипертензии **(Рисунок 3.2.7)**. Следует также отметить, что в данный промежуток времени применение НМГ в группе ПЭ достигло статистической значимости (45.0% против 0%, **p=0.032**).

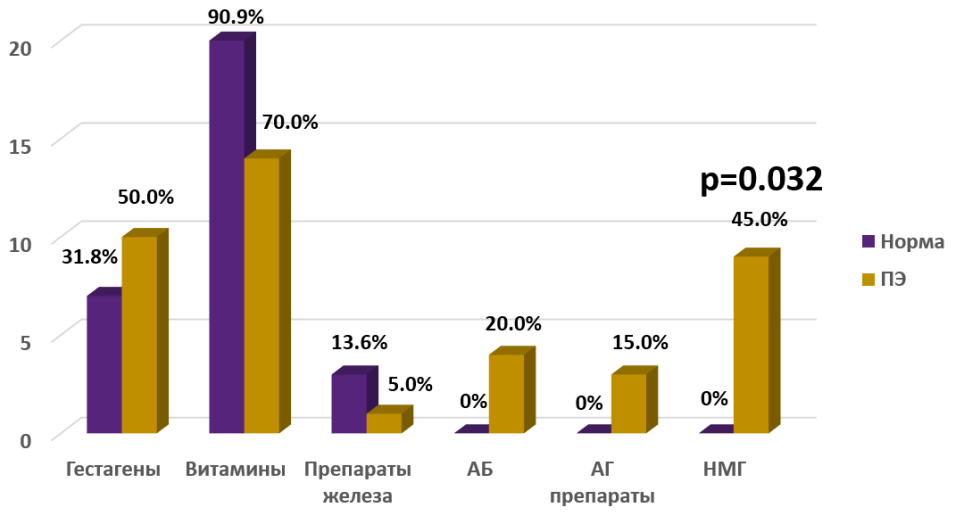

Рисунок 3.2.7. Лекарственные препараты, принимаемые во втором триместре беременности в исследуемых группах

Особенности течения беременности в третьем триместре представлены на **рисунке 3.2.8**. Отмечено увеличение частоты отеков беременных в группе ПЭ, что достоверно больше по сравнению с неосложненным течением беременности **(p=0.025)**.

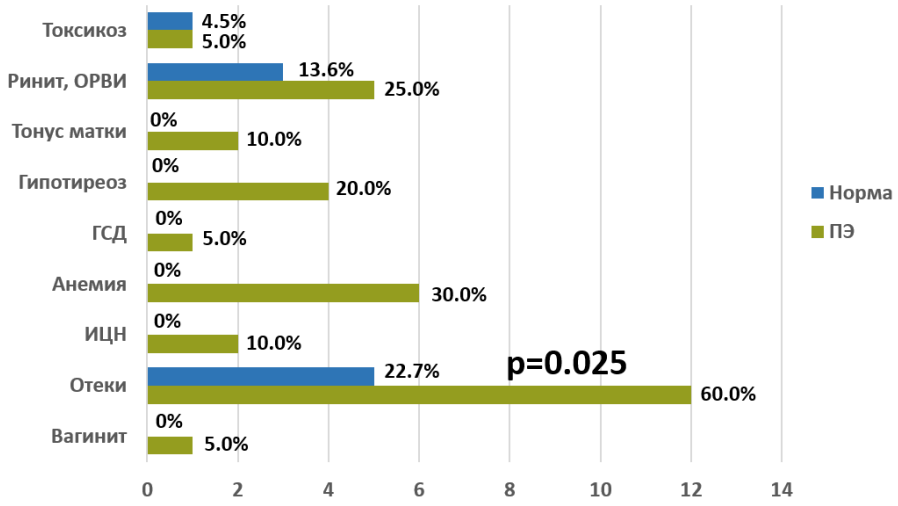

Рисунок 3.2.8. Характеристика течения третьего триместра беременности в исследуемых группах

У одной женщины с рПЭ (манифестация в 29 недель) выявлены высокие значения трансаминаз – повышение АЛТ до 462.4 Ед/л, АСТ до 382.9 Ед/л, а также

щелочной фосфатазы до 341.0 Ед/л. Во всех наблюдениях группы ПЭ до появления артериальной гипертензии клинически значимой протеинурии не наблюдалось.

Прием гестагенов, витаминов и препаратов железа продолжали пациентки в обеих группах и значимо не различались по количеству **(Рисунок 3.2.9)**. В группе ПЭ антигипертензивную терапию получали в 2 раза больше женщин по сравнению со вторым триместром, однако значимых различий в исследуемых группах не выявлено.

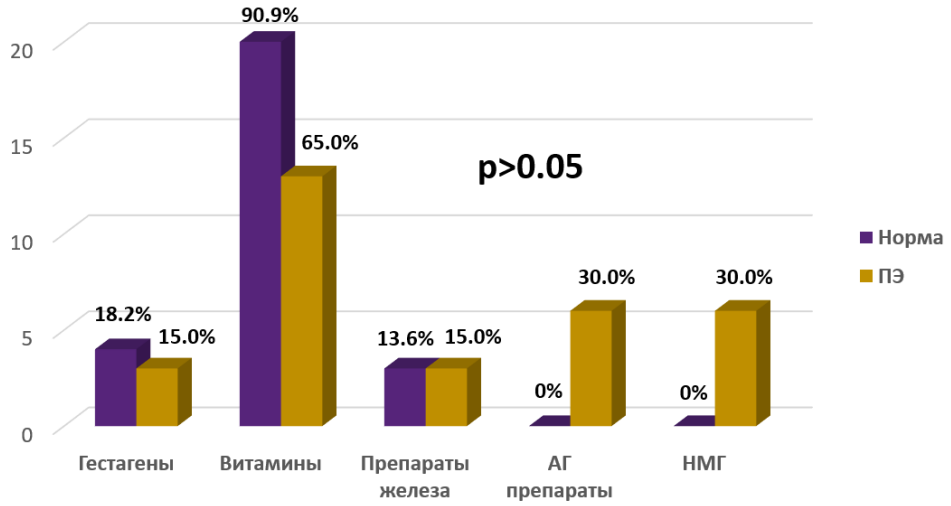

Рисунок 3.2.9. Лекарственные препараты, принимаемые в третьем триместре беременности в исследуемых группах

Нами проведен анализ АД до беременности и в её течении. При неосложненном течении беременности показатели АД не менялись, при развитии ПЭ в третьем триместре беременности наблюдалось незначительное увеличение дАД и срАД, а также значимое повышение сАД **(p=0.028) (Рисунок 3.2.10)**.

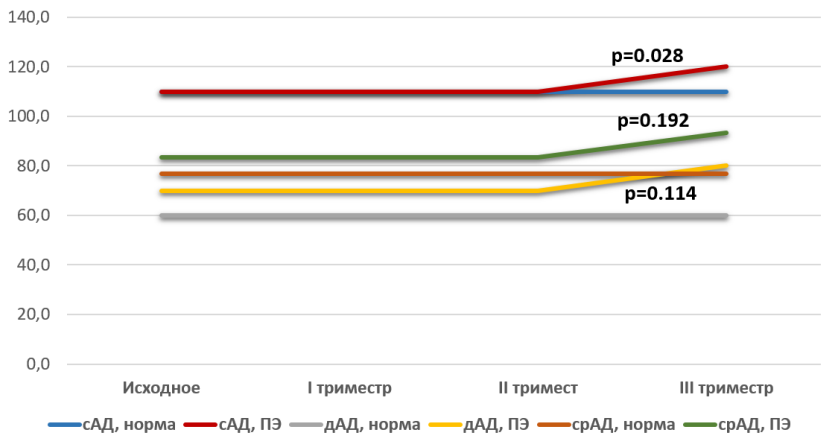

Рисунок 3.2.10. Динамика показателей АД при неосложненном течении беременности и ПЭ

Сравнительный анализ показателей АД между группами выявил статистически значимые различия в цифрах исходного дАД, а также дАД в первом и втором триместрах беременности **(Таблица 3.2.4)**. В 30-32 недели показатели сАД, дАД и срАД были значимо выше в группе ПЭ по сравнению с группой контроля **(Таблица 3.2.4).**

Таблица 3.2.4. Сравнение показателей АД между группами в динамике беременности

		Норма (n=22)	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Исходное, мм рт.ст.	сАД	110.0 (90.0-120.0)	110.0 (90.0-130.0)	0.195
	дАД	**60.0 (55.0-80.0)**	**70.0 (60.0-80.0)**	**0.040**
	срАД	76.7 (70.0-93.3)	83.3 (70.0-96.7)	0.078
I триместр, мм рт.ст.	сАД	110.0 (90.0-120.0)	110.0 (90.0-135.0)	0.373
	дАД	**60.0 (60.0-80.0)**	**70.0 (60.0-90.0)**	**0.044**
	срАД	76.7 (70.0-93.3)	83.3 (70.0-105.0)	0.192
II триместр, мм рт.ст.	сАД	110.0 (96.0-120.0)	110.0 (90.0-170.0)	0.200
	дАД	**60.0 (60.0-80.0)**	**70.0 (60.0-110.0)**	**0.016**

	срАД	76.7 (72.0-93.3)	83.3 (70.0-130.0)	0.052
III триместр, мм рт.ст.	**сАД**	**110.0 (100.0-120.0)**	**120.0 (100.0-145.0)**	**0.002**
	дАД	**60.0 (60.0-80.0)**	**80.0 (60.0-90.0)**	**0.001**
	срАД	**76.7 (73.3-93.3)**	**93.3 (73.3-108.3)**	**0.001**

*Данные представлены как медианы (мин.-макс. значения)

При оценке показателей допплерометрии в динамике беременности было выявлено значимое уменьшение среднего ПИ МА во втором триместре при ПЭ и неосложненном течении гестации **(Рисунок 3.2.11)**.

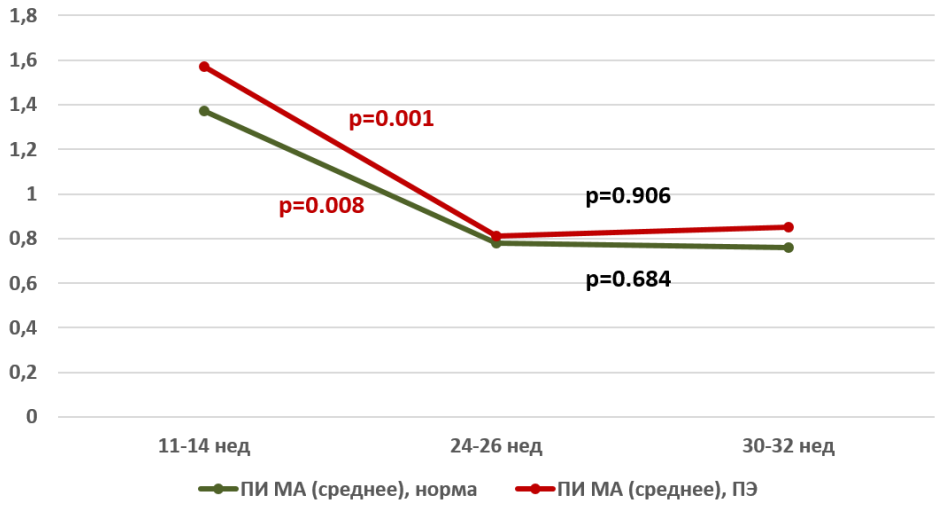

Рисунок 3.2.11. Средний ПИ маточных артерий в динамике ПЭ и неосложненной беременности

Во второй половине беременности ПИ обеих МА, а также средний ПИ не менялся в исследуемых группах. При сравнительном анализе было выявлено более высокое значение среднего ПИ МА в группе ПЭ при проведении скрининга первого триместра беременности (медиана 1.57 (1.41-1.97) против 1.37 (1.14-1.52), **p=0.026**).

При ПЭ ПИ АП был выше, чем при неосложненном течении беременности (в 24-26 недель – медиана 1.12 (1.03-1.28) и 1.09 (0.97-1.13), в 30-32 недели – медиана 0.97 (0.90-1.05) и 0.95 (0.79-1.07), соответственно), однако достоверных различий в показателях плодово-плацентарного кровотока между группами не обнаружено

(p>0.05). После 24-26 недель отмечалось уменьшение ПИ АП в обеих группах, однако при ПЭ данное снижение было существенным **(p=0.036) (Рисунок 3.2.12)**.

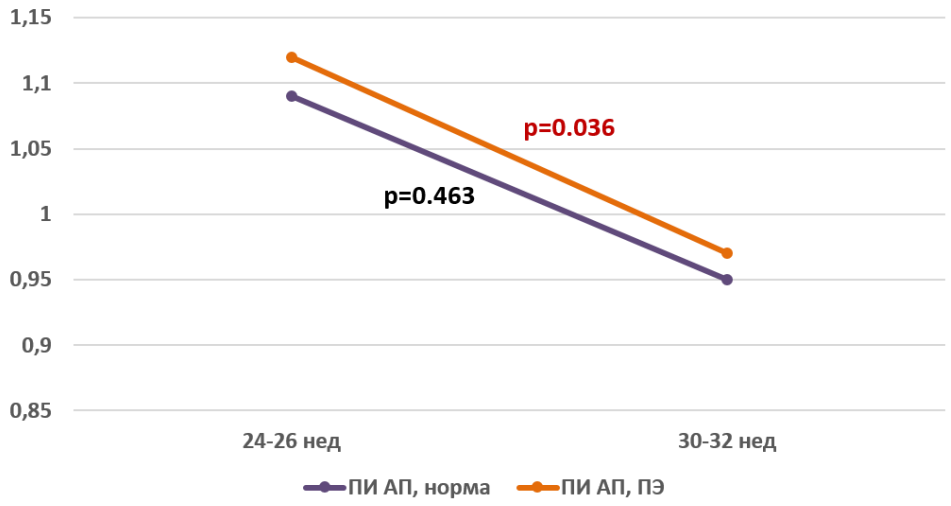

Рисунок 3.2.12. ПИ артерии пуповины при неосложненной беременности и ПЭ

Также различались данные кровотока средней мозговой артерии (СМА) плода в третьем триместре беременности: медиана ПИ при ПЭ составила 2.04 (1.65-2.22), при неосложненном течении гестации – 1.32 (1.13-1.61) **(p=0.014)**.

При сравнительном анализе сроков родоразрешения выявлены достоверные различия в исследуемых группах **(Таблица 3.2.5).** При ПЭ медиана срока родов была достоверно меньше **(p=0.028)**, количество ПР значимо больше **(p=0.050)**, чем в контрольной группе. Общая частота кесарева сечения (КС) также превышала таковую в группе неосложненной беременности **(p=0.013)**.

Таблица 3.2.5. Сравнение сроков и методов родоразрешения в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Срок родов, дни	281.5* (264.0-288.0)	272.5* (227.0-292.0)	**0.028**

Преждевременные роды, n (%)	0	7 (35.0%)	**0.050**
Самопроизвольные роды, n (%)	16 (72.7%)	6 (30.0%)	**0.015**
КС (всего), n (%)	6 (27.3%)	14 (70.0%)	**0.013**
Экстренное КС, n (%)	2 (33.3%)	11 (78.6%)	0.386

*Данные представлены как медианы (мин.-макс. значения)

В плановом порядке кесарево сечение произведено у 4 (20.0%) беременных из группы ПЭ по следующим показаниям: анатомическое сужение таза, тазовое предлежание плода, наличие рубца на матке после предыдущего кесарева сечения, отсутствие эффекта от подготовки шейки матки к родам. Показаниями к экстренному оперативному родоразрешению послужили в 7 (35.0%) случаях тяжелая ПЭ и нарастание тяжести ПЭ, в 2 (10.0%) случаях – ухудшение состояния плода, в 1 (5.0%) случае – острая гипоксия плода.

По частоте применения и методу обезболивания родов группы не различались **(Таблица 3.2.6).**

Таблица 3.2.6. Обезболивание родов в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Обезболивание родов	13 (59.1%)	13 (65.0%)	0.693
Эпидуральная анальгезия / анестезия	7 (53.8%)	3 (23.1%)	0.135
Спинальная анестезия	5 (38.5%)	6 (46.2%)	0.692
Спинально-эпидуральная анестезия	1 (7.7%)	4 (30.7%)	0.160

*Данные представлены как n (%)

По полу, массе и длине тела новорожденных значимых различий между группами не обнаружено **(Таблица 3.2.7)**. Однако в группе ПЭ у 2 (10.0%) новорожденных масса тела при рождении соответствовала значениям менее 10 центилей по шкале Фентона, у 2 (10.0%) – менее 3 центилей.

Таблица 3.2.7. Данные новорожденных в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПЭ (n=20)**	**p-value**
Мужской пол плода	10 (45.5%)	12 (60.0%)	0.349
Масса новорожденных, граммов	3305* (2855 – 3902)	3250* (1450 – 4500)	0.687
Длина новорожденных, см	51.5* (49.0-55.0)	52.0* (37.0-55.0)	0.959
Оценка по шкале Апгар, 1 мин	8* (8 – 9)	8* (1 – 9)	0.099
Оценка по шкале Апгар, 5 мин	9* (8 – 9)	9* (1 – 10)	**0.009**
Поступление в ОРИТН	0	5 (25.0%)	0.085

*Данные представлены как медианы (мин.-макс. значения)

Оценка состояния новорожденного по шкале Апгар на 1-й и 5-й минуте составила: медиана 8 и 9 баллов, соответственно, в обеих группах. Однако по данным статистического анализа на 5-й минуте после рождения состояние плода при ПЭ оценивалось как менее удовлетворительное, чем в группе контроля **(p=0.009)**. Распределение баллов по Апгар на 5-й минуте после рождения в исследуемых группах представлено на **рисунке 3.2.13**. При этом различий между группами по частоте поступления новорожденных в отделение реанимации не обнаружено.

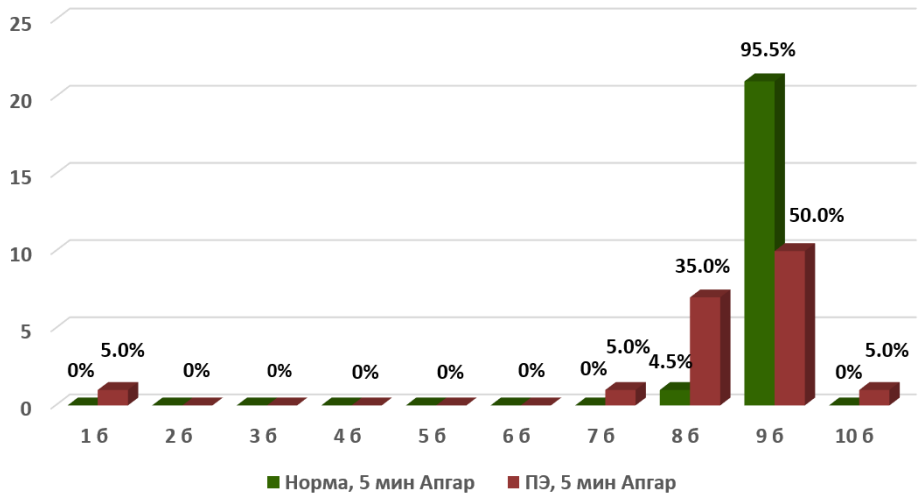

Рисунок 3.2.13. Распределение баллов по шкале Апгар на 5-й минуте после рождения в исследуемых группах

Кровопотеря во время родов в обеих группах не превышала допустимую норму с учетом метода родоразрешения. Измерение массы плаценты было доступно у 12 женщин с ПЭ и 18 женщин группы контроля, медиана составила 429.0 (280.0-475.0) и 438.5 (310.0-553.0) граммов, соответственно **(p=0.305)**.

Патоморфологическое исследование плаценты

Проведено гистологическое исследование 12 образцов: 6 образцов при рПЭ и 6 образцов при пПЭ.

У пациенток с ранней манифестацией осложнения преобладали промежуточные ворсины с выраженными дистрофическими изменениями. Строма ворсин была гиперклеточная с признаками фиброзирования, наличием очаговой инфильтрации макрофагами и лимфоцитами. В ворсинах присутствовали единичные капилляры, а также сохранялись стромальные каналы, образованные отростками мезенхимальных клеток. Также были обнаружены бессосудистые ворсины с фиброзированной стромой, единичные терминальные ворсины.

Визуализировались капилляры ворсин более мелкого диаметра с хаотичным расположением.

При пПЭ преобладали зрелые промежуточные ворсины с признаками фиброзирования, инфильтрацией макрофагами и лимфоцитами стромы, местами сохранялись стромальные каналы. Отмечались участки с преобладанием ангиогенеза и ветвлением сосудов.

Наблюдалось тесное расположение части ворсин за счет периворсинчатых депозитов плодного фибриноида, что обусловливало формирование афункциональных зон ворсинчатого дерева. Количество синцитиальных почек в данных зонах было повышено. Афункциональные зоны определялись в 3-х полях зрения из 10 при рПЭ (при увеличении микроскопа х 200) и менее чем в 3-х полях при пПЭ. При неосложненном течении беременности и родоразрешении на доношенном сроке представленные зоны либо отсутствовали, либо не занимали более 1-2 из 10 полей зрения **($p<0.05$)**. Преимущественно при рПЭ выявлялись множественные инфаркты ворсинчатого дерева различной степени давности.

Экстраплацентарные оболочки при рПЭ и пПЭ были с выраженными дистрофическими изменениями, очаговыми некрозами, отложением депозитов плодного фибриноида, незначительной инфильтрацией макрофагами и лимфоцитами. Проведен анализ поражения синцитиотрофобласта (СЦТ) (в 10 полях, х 400) с разделением ворсин на 4 квадранта. Отмечено повреждение и слущивание (shedding) СЦТ с поверхности ворсин, коррелирующее с тяжестью течения ПЭ: при тПЭ (5 образцов) от 25.0 до 50.0% СЦТ, при уПЭ (7 образцов) менее 25.0% СЦТ.

Анализ внеклеточной ДНК

Концентрация оДНК значимо не менялась от 11-14 к 24-26 неделям беременности (медиана 732.36 (442.42-1699.77) и 752.53 (555.97-3186.03) ГЕ/мл в 11-14 и 24-26 недель, соответственно), но увеличивалась к 30-32 неделям (медиана

1917.09 (674.24-5109.21) ГЕ/мл) **(p=0.036)**. При сравнительном анализе было выявлено, что концентрация оДНК была значимо выше при ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности на всех исследуемых сроках (в 11-14 недель 732.36 (442.42-1699.77) против 208.11 (156.95-461.35) ГЕ/мл, **p<0.001**; в 24-26 недель 752.53 (555.97-3186.03) против 298.68 (126.66-458.85) ГЕ/мл, **p=0.001**; в 30-32 недели 1917.09 (674.24-5109.21) против 424.79 (154.43-739.99) ГЕ/мл, **p<0.001**) **(Рисунок 3.2.14).**

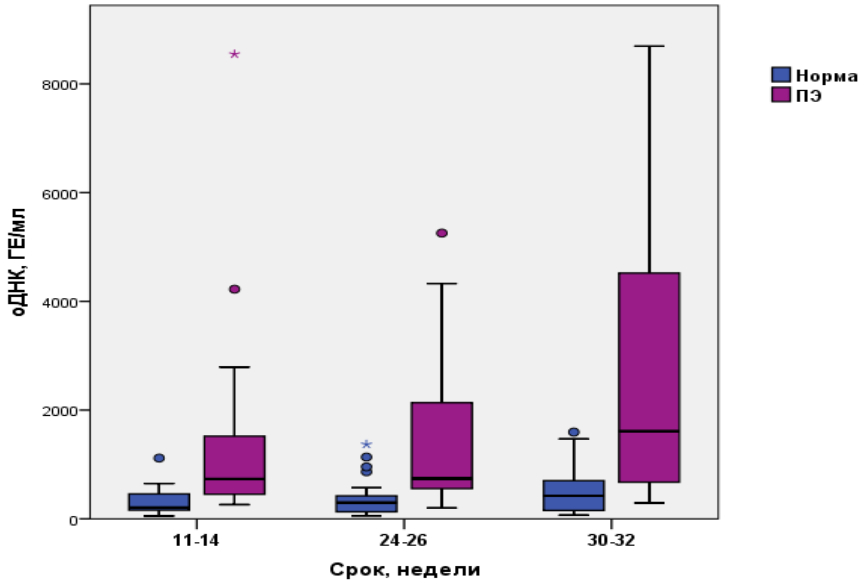

Рисунок 3.2.14. Концентрация оДНК при неосложненном течении беременности и ПЭ

Уровень мДНК составил в 11-14 недель 663.52 (416.48-1583.37), в 24-26 недель 718.44 (474.72-3021.68) ГЕ/мл и не различался, однако отмечалось значимое увеличение к 30-32 неделям (медиана 1758.79 (646.37-5593.17) ГЕ/мл) **(p=0.047)**. По сравнению с неосложненным течением беременности концентрация мДНК при ПЭ была достоверно больше на всех исследуемых сроках (медиана 663.52 (416.48-1583.37) против 201.80 (131.97-442.70) ГЕ/мл **(p<0.001)**, 718.44 (474.72-3021.68) против 275.73 (115.89-428.16) ГЕ/мл **(p=0.001)**, 1758.79 (646.37-5593.17) против 398.56 (117.83-671.01) ГЕ/мл **(p<0.001)** в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) **(Рисунок 3.2.15).**

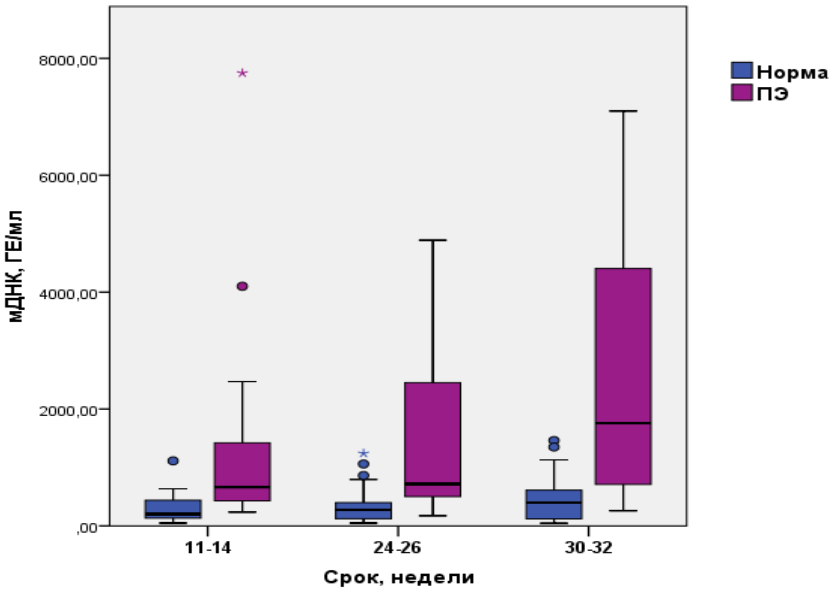

Рисунок 3.2.15. Концентрация мДНК при неосложненном течении беременности и ПЭ

Концентрация пДНК не менялась в первой половине беременности при ПЭ, однако была выше, чем при её неосложненном течении (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; **p<0.001**) **(Рисунок 3.2.16).** К 30-32 неделям отмечалось значимое увеличение уровня пДНК до 158.30 (49.43-514.16) ГЕ/мл **(p=0.031)**. В третьем триместре беременности концентрация пДНК также была достоверно больше при ПЭ (медиана 158.30 (49.43-514.16) против 32.62 (16.49-71.10) ГЕ/мл) **(p<0.001) (Рисунок 3.2.16).**

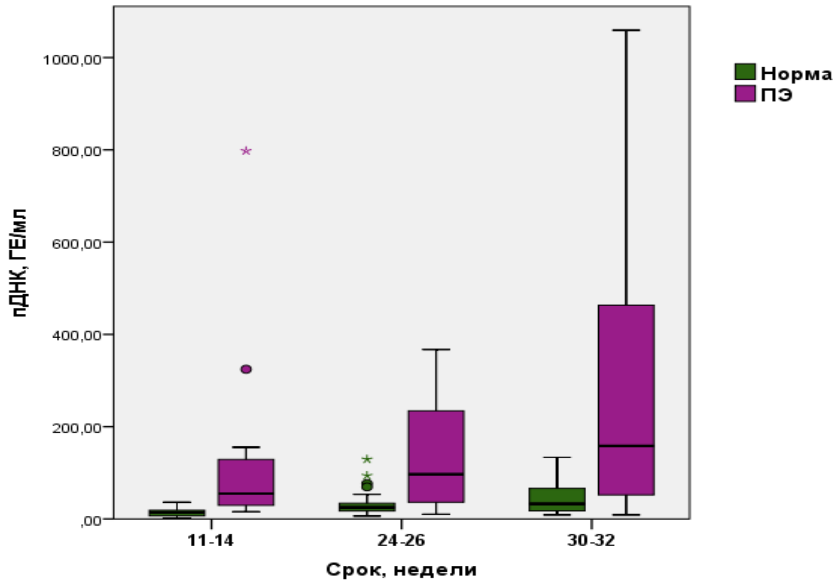

Рисунок 3.2.16. Концентрация пДНК при неосложненном течении беременности и ПЭ

Процентное содержание пДНК от оДНК не менялось при ПЭ и составило от 1.52 до 14.65% (медиана 8.03%) в первом триместре, от 2.01 до 27.18% (медиана 9.40%) во втором триместре и от 1.23 до 18.33% (медиана 9.86%) в третьем триместре беременности (p>0.05). Сравнительный анализ не выявил различий от группы контроля в изученные сроки беременности (p>0.05) **(Рисунок 3.2.17)**.

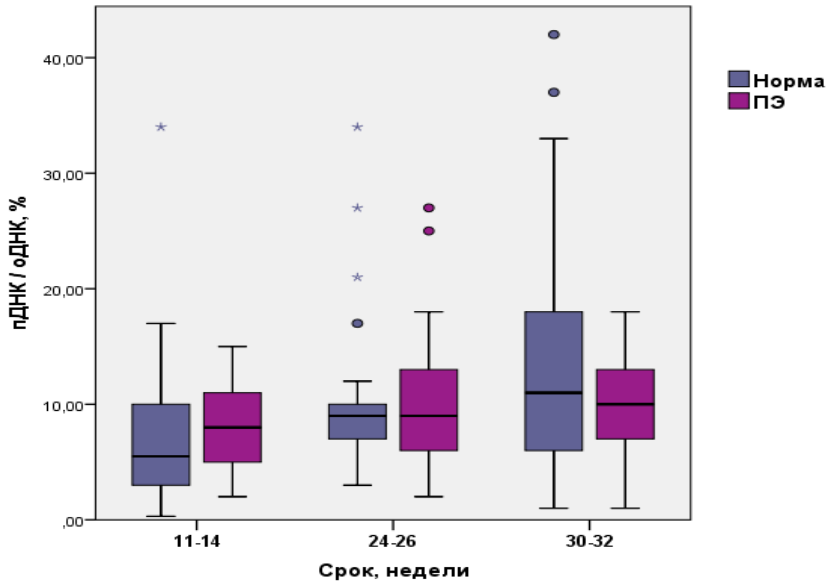

Рисунок 3.2.17. Процентное содержание пДНК от оДНК при неосложненном течении беременности и ПЭ

Мы проанализировали концентрацию внеклеточной ДНК при ранней (10 женщин) и поздней ПЭ (10 женщин).

Уровень внеклеточной оДНК значимо повышался в течение беременности при рПЭ (медиана 737.83 (476.46-1340.57), 1306.19 (658.23-3335.49), 4519.65 (1359.49-8538.77) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) и не менялся при пПЭ (медиана 730.54 (415.75-2648.75), 728.79 (280.01-3420.12), 952.03 (456.64-2968.91) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) **(Рисунок 3.2.18)**. В 30-32 недели концентрация оДНК была достоверно выше при рПЭ **(p=0.046).**

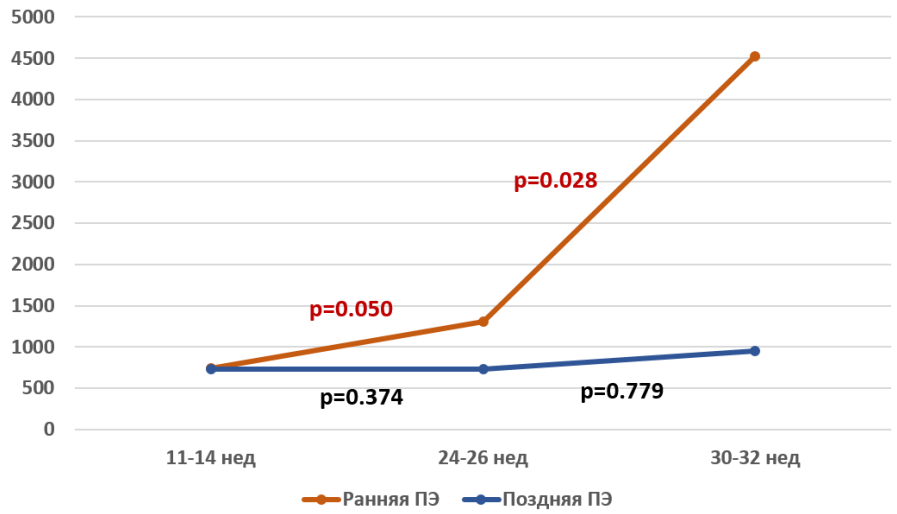

Рисунок 3.2.18. Концентрация оДНК в динамике беременности при ранней и поздней ПЭ

На всех исследуемых сроках беременности уровень внеклеточной оДНК был выше при рПЭ и пПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности (при рПЭ **p<0.001**, при пПЭ **p≤0.041**) **(Рисунок 3.2.19)**.

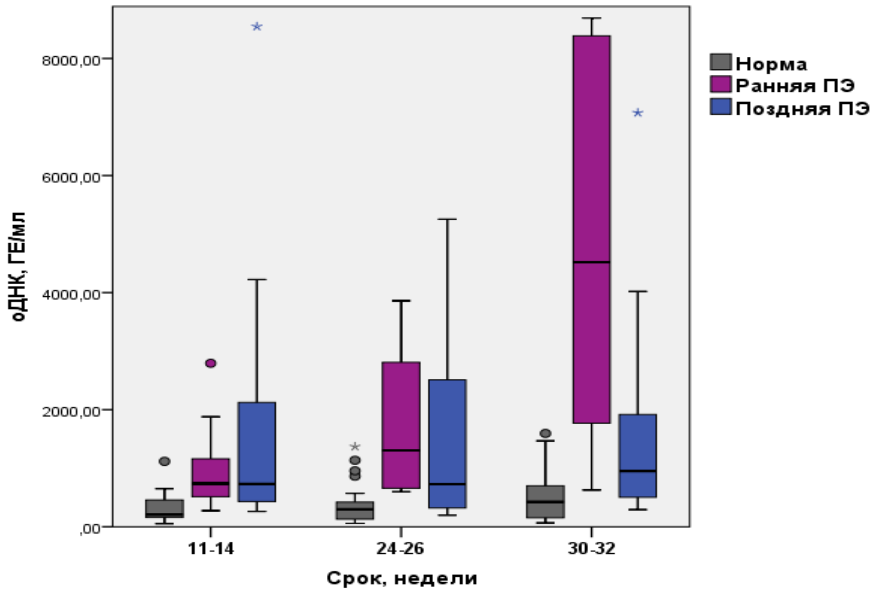

Рисунок 3.2.19. Концентрация оДНК при рПЭ, пПЭ и неосложненном течении беременности

Концентрация внеклеточной мДНК не менялась в первой половине беременности при рПЭ и пПЭ (медиана 659.80 (451.13-1260.94) и 678.61 (386.65-2514.71), 1139.62 (620.39-3090.18) и 632.06 (229.54-3248.29) ГЕ/мл в 11-14 и 24-26 недель, соответственно) **(Рисунок 3.2.20)**. При рПЭ уровень мДНК значимо повышался к 30-32 неделям (медиана 4074.75 (1217.34-7078.79) ГЕ/мл, **p=0.028**), чего не наблюдалось при пПЭ (медиана 900.08 (402.84-2658.13) ГЕ/мл, p=0.889) **(Рисунок 3.2.20).** В 30-32 недели концентрация мДНК была выше при рПЭ **(p=0.046)**.

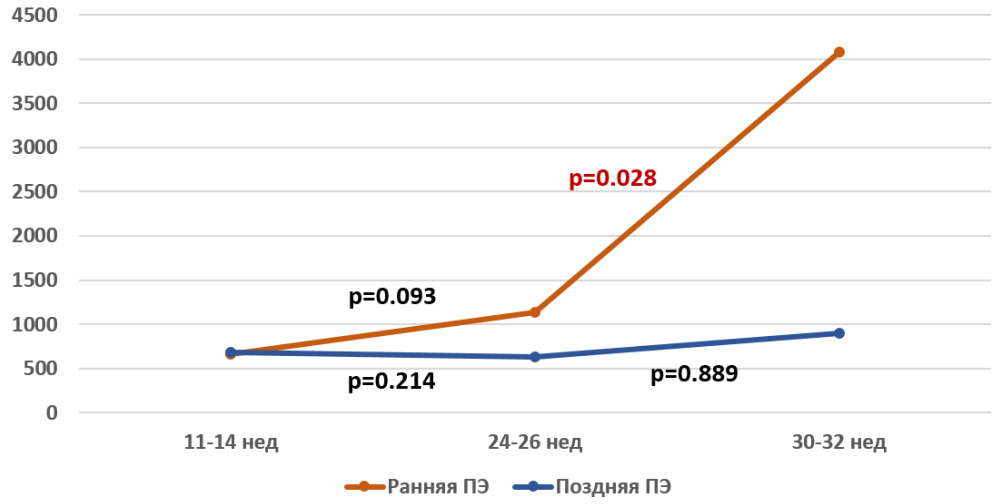

Рисунок 3.2.20. Концентрация мДНК в динамике беременности при ранней и поздней ПЭ

Концентрация внеклеточной мДНК была достоверно выше при рПЭ и пПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности на всех исследуемых сроках (при рПЭ **p<0.001**, при пПЭ **p≤0.046**) **(Рисунок 3.2.21)**.

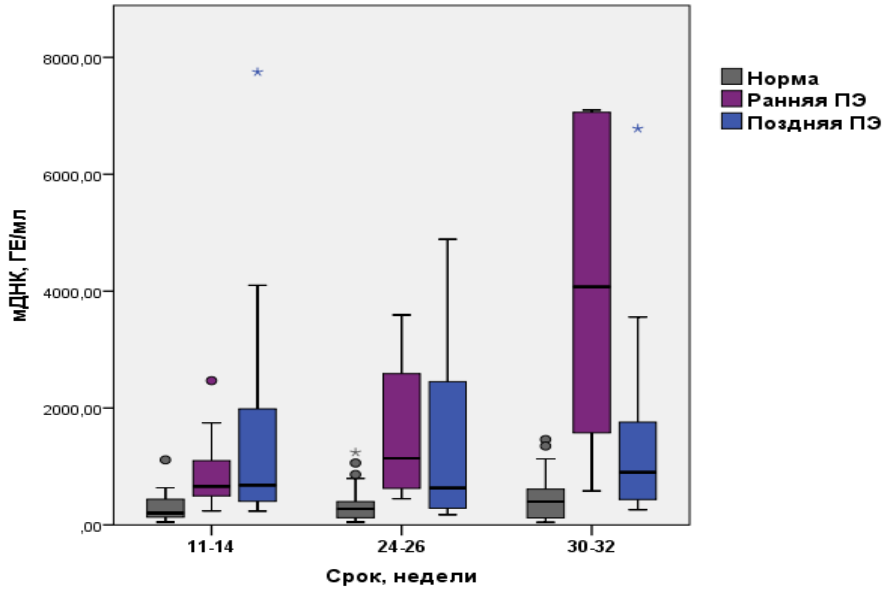

Рисунок 3.2.21. Концентрация мДНК при рПЭ, пПЭ и неосложненном течении беременности

При рПЭ уровень пДНК значимо увеличивался в течение беременности (медиана в 11-14 недель – 54.85 (30.33-108.09), в 24-26 недель – 164.17 (55.80-259.87), в 30-32 недели – 444.91 (142.15-1459.98) ГЕ/мл) **(Рисунок 3.2.22)**.

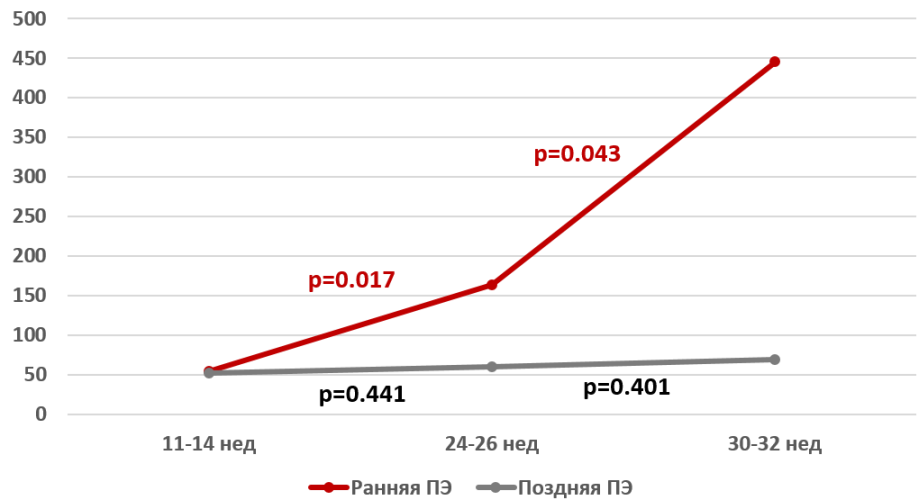

Рисунок 3.2.22. Концентрация пДНК в динамике беременности при ранней и поздней ПЭ

При пПЭ концентрация пДНК не менялась (медиана в 11-14 недель – 51.93 (27.49-142.15), в 24-26 недель – 60.34 (29.16-190.02), в 30-32 недели – 68.82 (36.30-224.81) ГЕ/мл) **(Рисунок 3.2.22)**. В третьем триместре беременности концентрация пДНК была выше при рПЭ **(p=0.021)**.

По сравнению с неосложненным течением беременности концентрация внеклеточной пДНК была достоверно больше при рПЭ на всех исследуемых сроках **(p<0.001)**, при пПЭ – в первой половине беременности **(p≤0.026) (Рисунок 3.2.23)**.

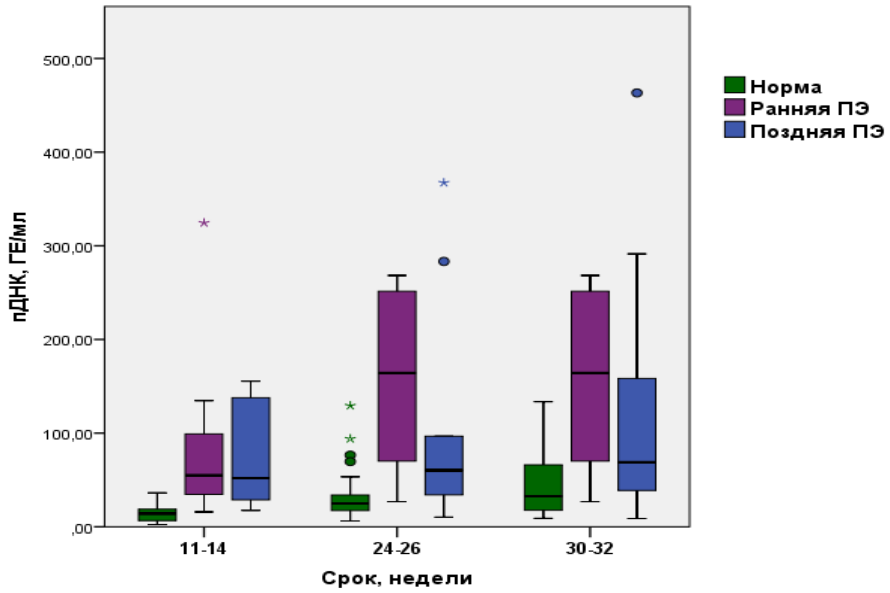

Рисунок 3.2.23. Концентрация пДНК при рПЭ, пПЭ и неосложненном течении беременности

Так как при пПЭ уровень пДНК не менялся в исследуемые сроки беременности, мы проанализировали еженедельный прирост концентрации пДНК у женщин с рПЭ, который составил 10.43 (3.74-13.03) и 64.78 (14.27-214.15) ГЕ/мл/нед до и после 24-26 недель и был достоверно выше, чем при неосложненном течении беременности (до 24-26 недель – медиана 1.47 (0.59-3.39) ГЕ/мл/нед, после 24-26 недель – 2.33 (0.74-5.16) ГЕ/мл/нед; **p=0.005** и **p=0.001**, соответственно).

Принимая во внимание различную степень тяжести течения ПЭ, целесообразно проанализировать уровень внеклеточной ДНК у женщин с умеренной (уПЭ) (65%) и тяжелой ПЭ (тПЭ) (35%).

Концентрация оДНК при уПЭ практически не менялась от первого триместра (медиана 746.89 (452.23-2458.45) ГЕ/мл) ко второму (медиана 752.53 (599.02-4328.74) ГЕ/мл), однако незначительно увеличивалась к 30-32 неделям до 1917 (719.79-4729.24) ГЕ/мл **(Рисунок 3.2.24)**. При тяжелой ПЭ уровень оДНК возрастал в течение беременности (медиана 627.02 (365.15-1044.41), 856.06 (300.81-2285.34), 1948.60 (544.59-8232.79) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно), однако достоверных различий не обнаружено **(Рисунок 3.2.24)**.

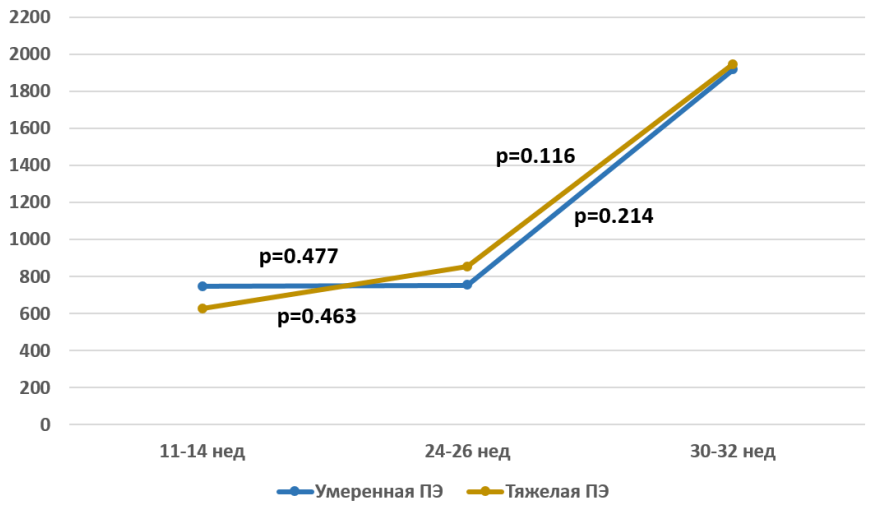

Рисунок 3.2.24. Концентрация оДНК в динамике беременности при умеренной и тяжелой ПЭ

Концентрация оДНК при уПЭ и тПЭ не различалась в исследуемые сроки беременности (p>0.05). При сравнительном анализе с неосложненным течением гестации выявлены достоверные различия в уровне оДНК как при умеренной (в 11-14 недель **p<0.001**, в 24-26 и 30-32 недели **p=0.001**), так и при тяжелой ПЭ (**p=0.004, 0.045, 0.012** в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) **(Рисунок 3.2.25)**.

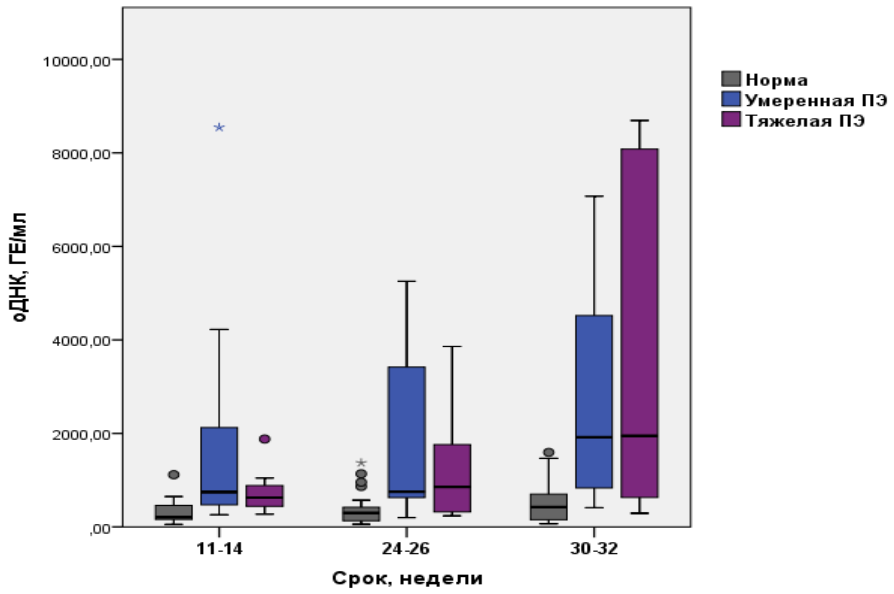

Рисунок 3.2.25. Концентрация оДНК при уПЭ, тПЭ и неосложненном течении беременности

Изменение уровня мДНК при уПЭ и тПЭ аналогично оДНК **(Рисунок 3.2.26)**. При уПЭ медиана концентрации мДНК в исследуемые сроки беременности составила 702.06 (429.09-2227.33), 718.44 (502.60-4045.42) и 1758.79 (710.97-4404.49) ГЕ/мл и не различалась от тПЭ (медиана 574.21 (334.97-1028.58), 793.25 (257.51-2086.14), 1734.79 (500.94-7039.99) ГЕ/мл) (p>0.05).

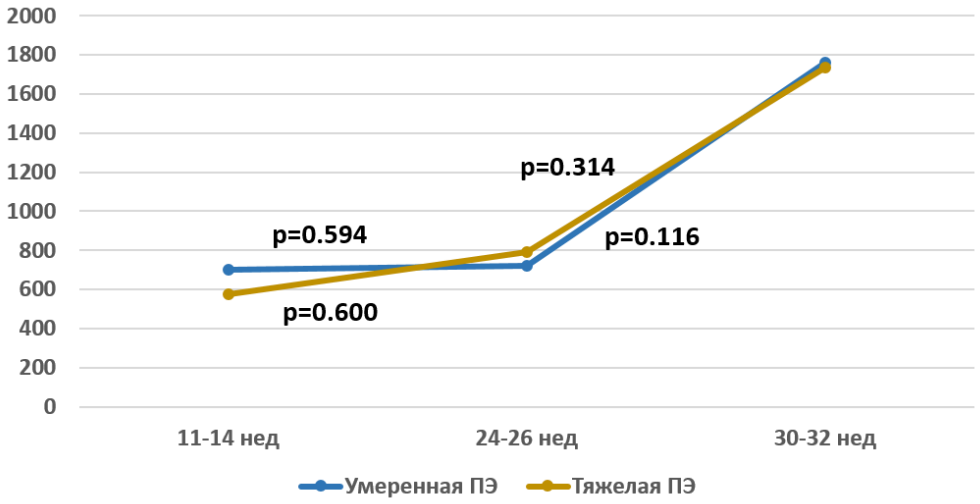

Рисунок 3.2.26. Концентрация мДНК в динамике беременности при умеренной и тяжелой ПЭ

По сравнению с неосложненным течением беременности концентрация мДНК была достоверно больше на всех исследуемых сроках при уПЭ **(p≤0.001)** и в 11-14 и 30-32 недели при тПЭ (**p=0.003 и 0.012**, соответственно) **(Рисунок 3.2.27)**.

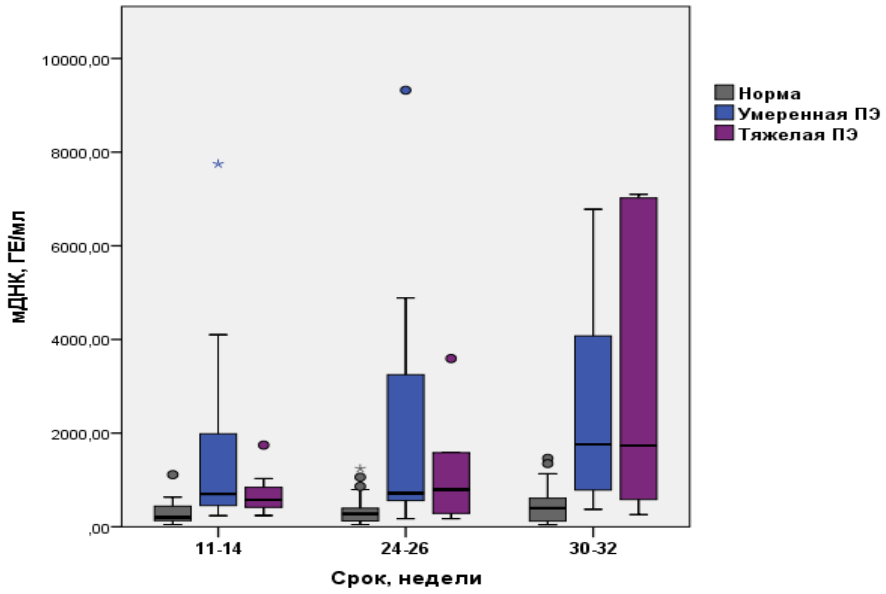

Рисунок 3.2.27. Концентрация мДНК при уПЭ, тПЭ и неосложненном течении беременности

При уПЭ концентрация пДНК увеличивалась незначительно в динамике беременности, медиана составила 61.25 (31.32-146.58), 96.72 (34.09-283.32), 158.30 (51.94-463.25) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно **(Рисунок 3.2.28)**. При тПЭ выявлено достоверное увеличение пДНК как в первой половине беременности (медиана 34.64 (17.38-69.97) и 81.77 (33.82-199.20) ГЕ/мл в 11-14 и 24-26 недель, соответственно), так и к 30-32 неделям (медиана 213.82 (43.65-1192.81) ГЕ/мл) **(Рисунок 3.2.28)**.

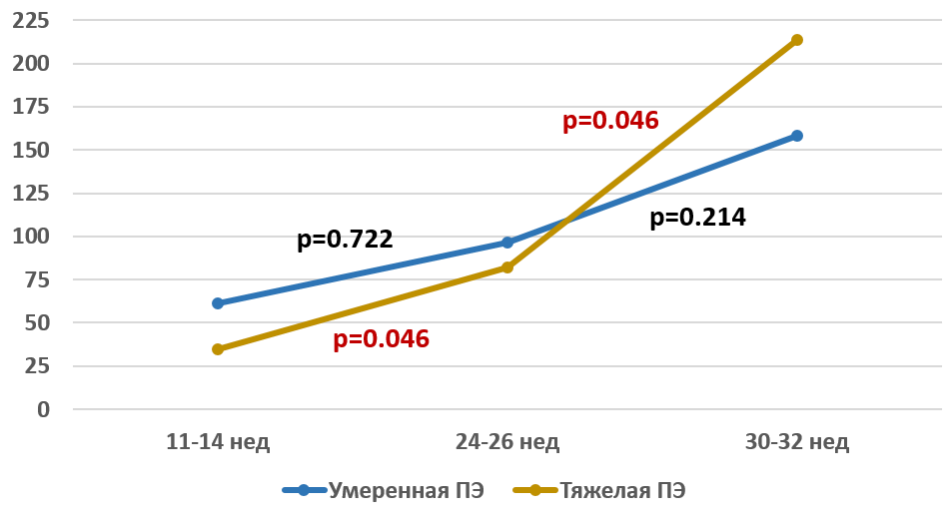

Рисунок 3.2.28. Концентрация пДНК в динамике беременности при умеренной и тяжелой ПЭ

Концентрация пДНК при уПЭ и тПЭ не различалась в исследуемые сроки беременности (p>0.05). Уровень пДНК был достоверно выше в обеих группах по сравнению с неосложненным течением беременности (в 11-14 недель **p<0.001** и **p=0.002**, в 24-26 недель **p=0.002** и **0.007**, в 30-32 недели **p=0.004** и **0.008** при уПЭ и тПЭ, соответственно) **(Рисунок 3.2.29)**.

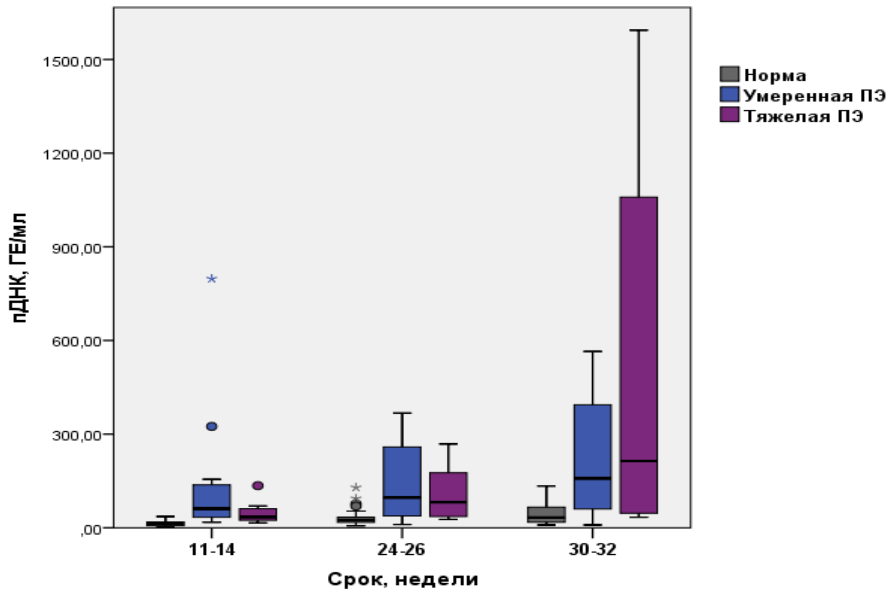

Рисунок 3.2.29. Концентрация пДНК при уПЭ, тПЭ и неосложненном течении беременности

В результате корреляционного анализа концентрации внеклеточной ДНК с клинико-лабораторными данными обнаружена обратная зависимость между концентрацией ХГЧ и уровнем оДНК **(p=0.047)**, мДНК **(p=0.047)** и пДНК **(p=0.014)** в 30-32 недели гестации **(Таблица 3.2.8)**. Чем выше был уровень пДНК в третьем триместре беременности, тем раньше манифестировала ПЭ **(p=0.035)**. Корреляционный анализ также показал, что существует обратная зависимость между концентрацией внеклеточной оДНК и фракций в 30-32 недели беременности и сроком родов, массой, длиной тела новорожденного **(p<0.05)**.

Таблица 3.2.8. Результаты корреляционного анализа внеклеточной ДНК с клинико-лабораторными показателями

Данные		**Коэффициент корреляции (r), p > 0.05**		
		оДНК	**мДНК**	**пДНК**
Возраст, лет	11-14 нед	0.245	0.320	0.359
	24-26 нед	0.136	0.135	0.277
	30-32 нед	0.350	0.350	0.456
Исходный ИМТ, кг/м^2	11-14 нед	0.337	0.398	0.092
	24-26 нед	0.246	0.270	0.273
	30-32 нед	0.320	0.320	0.202
ХГЧ, МЕ/л	11-14 нед	-0.173	-0.198	-0.129
	24-26 нед	-0.115	-0.130	-0.181
	30-32 нед	**-0.488***	**-0.488***	**-0.583***
PAPP-A, МЕ/л	11-14 нед	0.053	0.000	0.075
	24-26 нед	0.027	0.012	0.005
	30-32 нед	-0.100	-0.100	0.037
Срок манифестации ПЭ, дни	11-14 нед	-0.014	0.039	0.021
	24-26 нед	-0.161	-0.147	-0.363
	30-32 нед	-0.420	-0.420	**-0.513***

Протеинурия, г/л	11-14 нед	-0.203	-0.191	-0.188
	24-26 нед	0.052	0.055	0.060
	30-32 нед	0.038	0.038	0.012
PLGF, пг/мл	11-14 нед	0.405	0.405	0.214
	24-26 нед	0.214	0.214	0.179
	30-32 нед	0.464	0.464	0.286
sFlt-1, пг/мл	11-14 нед	0.190	0.190	0.381
	24-26 нед	0.536	0.536	0.571
	30-32 нед	0.464	0.464	0.357
sFlt-1 / PLGF	11-14 нед	0.018	0.18	0.442
	24-26 нед	0.283	0.283	0.417
	30-32 нед	0.150	0.150	0.217
Срок родов, дни	11-14 нед	0.149	0.099	0.123
	24-26 нед	-0.196	-0.210	-0.337
	30-32 нед	**-0.537***	**-0.537***	**-0.541***
Масса новорожденного, граммов	11-14 нед	0.057	0.048	0.017
	24-26 нед	-0.321	-0.301	-0.473
	30-32 нед	**-0.534***	**-0.534***	**-0.600***
Длина тела новорожденного, см	11-14 нед	0.148	0.149	0.012
	24-26 нед	-0.234	-0.201	-0.468
	30-32 нед	**-0.490***	**-0.490***	**-0.559***
Масса плаценты, граммов	11-14 нед	-0.014	-0.119	-0.119
	24-26 нед	-0.273	-0.236	-0.333
	30-32 нед	-0.464	-0.464	-0.436

* значения $p < 0.05$

При более высоких значениях мДНК в 11-14 недель наблюдалось увеличение сАД в 24-26 недель **(p=0.040) (Таблица 3.2.9)**. Также обнаружена зависимость

между увеличением концентрации пДНК и повышением сАД в 30-32 недели **(p=0.035)**.

Таблица 3.2.9. Результаты корреляционного анализа внеклеточной ДНК с показателями АД

Данные		**Коэффициент корреляции (r), p > 0.05**		
		оДНК	**мДНК**	**пДНК**
Исходное сАД, мм рт.ст.	11-14 нед	0.257	0.327	0.012
	24-26 нед	0.228	0.264	0.122
	30-32 нед	-0.153	-0.153	-0.071
Исходное дАД, мм рт.ст.	11-14 нед	0.278	0.328	0.049
	24-26 нед	0.427	0.436	0.356
	30-32 нед	-0.132	-0.132	-0.010
Исходное срАД, мм рт.ст.	11-14 нед	0.267	0.327	0.036
	24-26 нед	0.350	0.369	0.272
	30-32 нед	-0.131	-0.131	-0.008
сАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	11-14 нед	0.195	0.221	0.021
	24-26 нед	0.141	0.157	0.207
	30-32 нед	-0.116	-0.116	-0.066
дАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	11-14 нед	0.125	0.139	0.023
	24-26 нед	0.201	0.201	0.284
	30-32 нед	-0.062	-0.062	-0.000
срАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	11-14 нед	0.158	0.179	0.021
	24-26 нед	0.161	0.166	0.249
	30-32 нед	-0.119	-0.199	-0.052
сАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	11-14 нед	0.409	**0.489***	0.223
	24-26 нед	0.213	0.227	0.394
	30-32 нед	0.175	0.175	0.197

дАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	11-14 нед	0.322	0.392	0.212
	24-26 нед	0.219	0.219	0.433
	30-32 нед	0.201	0.201	0.234
срАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	11-14 нед	0.348	0.424	0.183
	24-26 нед	0.225	0.231	0.389
	30-32 нед	0.167	0.167	0.183
сАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	11-14 нед	0.126	0.149	-0.040
	24-26 нед	0.421	0.457	0.411
	30-32 нед	0.484	0.484	**0.546***
дАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	11-14 нед	-0.073	-0.054	-0.198
	24-26 нед	0.376	0.405	0.363
	30-32 нед	0.423	0.423	0.486
срАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	11-14 нед	-0.018	0.005	-0.163
	24-26 нед	0.359	0.392	0.341
	30-32 нед	0.441	0.441	0.500
Максимальное сАД, мм рт.ст. (ПЭ)	11-14 нед	-0.050	0.008	-0.206
	24-26 нед	0.123	0.153	0.115
	30-32 нед	0.137	0.137	0.077
Максимальное дАД, мм рт.ст. (ПЭ)	11-14 нед	0.176	0.207	-0.054
	24-26 нед	0.251	0.251	0.158
	30-32 нед	-0.012	-0.012	0.038
Максимальное срАД, мм рт.ст. (ПЭ)	11-14 нед	0.031	0.078	-0.095
	24-26 нед	0.165	0.178	0.167
	30-32 нед	0.065	0.065	0.067

* значения $p < 0.05$

Корреляционный анализ внеклеточной ДНК с данными допплерометрии показал обратную зависимость между ПИ МА скрининга первого триместра беременности и оДНК, мДНК в 24-26 недель **(p=0.048) (Таблица 3.2.10).**

Таблица 3.2.10. Результаты корреляционного анализа внеклеточной ДНК с данными допплерометрии

Данные		Коэффициент корреляции (r), p > 0.05		
		оДНК	**мДНК**	**пДНК**
МА, ПИ (средний) (11-14 недель)	11-14 нед	-0.232	-0.204	-0.157
	24-26 нед	**-0.486***	**-0.486***	-0.232
	30-32 нед	-0.162	-0.162	-0.085
МА, ПИ (средний) (24-26 недель)	11-14 нед	-0.174	-0.152	-0.130
	24-26 нед	-0.385	-0.379	-0.005
	30-32 нед	-0.231	-0.231	-0.280
Левая МА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	-0.196	-0.185	-0.161
	24-26 нед	-0.501	-0.498	-0.127
	30-32 нед	-0.354	-0.354	-0.406
Правая МА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	0.011	0.035	0.013
	24-26 нед	-0.072	-0.074	0.268
	30-32 нед	0.000	0.000	-0.014
АП, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	-0.272	-0.305	0.138
	24-26 нед	-0.130	-0.186	0.095
	30-32 нед	-0.373	-0.373	-0.255
СМА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	0.300	0.300	0.500
	24-26 нед	0.300	0.300	0.600
	30-32 нед	-0.100	-0.100	0.000
МА, ПИ (средний) (30-32 недель)	11-14 нед	0.129	0.152	0.120
	24-26 нед	0.251	0.253	0.312
	30-32 нед	0.257	0.257	0.224
Левая МА, ПИ (30-32 недели)	11-14 нед	0.079	0.143	0.025
	24-26 нед	0.305	0.327	0.363
	30-32 нед	0.363	0.363	0.310

Правая МА, ПИ (30-32 недели)	11-14 нед	0.075	0.039	0.257
	24-26 нед	-0.046	-0.081	0.174
	30-32 нед	0.059	0.059	0.073
АП, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	0.315	0.265	0.371
	24-26 нед	0.179	0.146	0.404
	30-32 нед	0.135	0.135	0.227
СМА, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	0.179	0.115	-0.103
	24-26 нед	0.133	0.133	0.467
	30-32 нед	0.033	0.033	0.150

* значения $p < 0.05$

Помимо внеклеточной ДНК мы определили корреляционную зависимость между цифрами АД и другими количественными показателями **(Таблица 3.2.11)**. Выявлена положительная корреляция между исходным ИМТ женщины и АД до беременности, а также в первой ее половине. При этом, чем больше срок беременности, тем более выраженная статистическая связь между показателями определялась. Срок манифестации ПЭ положительно коррелировал с АД в 30-32 недели беременности. Нами выявлена корреляционная зависимость между степенью протеинурии и дАД, срАД в 30-32 недели, однако наиболее значимая связь определялась с максимальными цифрами АД при ПЭ. Среднее АД, определенное во время скрининга первого триместра беременности, значимо коррелировало с соотношением sFlt-1 к PLGF при развитии клинической картины ПЭ. При больших показателях сАД и срАД в 24-26 недель беременности выявлялась меньшая концентрация PLGF при ПЭ. Обнаружена обратная зависимость между дАД в 30-32 недели и сроком родоразрешения, срАД на момент скрининга первого триместра беременности и массой плаценты.

Таблица 3.2.11. Результаты корреляционного анализа АД с клинико-лабораторными показателями

	Коэффициент корреляции (r), p > 0.05						
	ИМТ	**Срок манифест. ПЭ**	**Протеинурия**	**PLGF**	**sFlt-1/PLGF**	**Срок родов**	**Масса плаценты**
Исх. сАД, мм рт.ст.	**0.536***	0.232	-0.357	-0.638	0.100	-0.067	-0.292
Исх. дАД, мм рт.ст.	**0.533***	0.119	-0.088	-0.439	-0.052	-0.191	-0.196
Исх. срАД, мм рт.ст.	**0.556***	0.149	-0.235	-0.638	0.100	-0.159	-0.310
срАД (I скр.), мм рт.ст.	**0.542***	-0.010	0.013	-0.714	**0.738***	-0.487	**-0.764***
сАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	**0.560***	0.077	-0.234	0.051	0.162	0.062	-0.290
дАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	**0.544***	0.037	-0.099	0.224	0.000	-0.022	-0.286
срАД, мм рт.ст. (11-14 недель)	**0.561***	0.036	-0.173	0.051	0.162	-0.004	-0.308
сАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	**0.636***	-0.055	0.037	**-0.820***	0.488	-0.374	-0.478
дАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	**0.627***	-0.079	0.146	-0.676	0.332	-0.437	-0.435
срАД, мм рт.ст. (24-26 недель)	**0.665***	-0.067	0.106	**-0.820***	0.488	-0.431	-0.491
сАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	0.238	**-0.702***	0.333	-0.609	0.180	-0.432	-0.407
дАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	0.161	**-0.606***	**0.564***	-0.395	-0.115	**-0.502***	-0.338
срАД, мм рт.ст. (30-32 недель)	0.193	**-0.643***	**0.510***	-0.609	0.012	-0.469	-0.414

Макс. сАД, мм рт.ст. (ПЭ)	0.044	-0.055	**0.665***	0.098	-0.314	-0.315	0.164
Макс. дАД, мм рт.ст. (ПЭ)	0.068	0.012	**0.535***	0.365	-0.323	-0.173	0.286
Макс. срАД, мм рт.ст. (ПЭ)	0.016	-0.011	**0.642***	0.146	-0.252	-0.256	0.189

* значения $p < 0.05$

С целью выявления прогностической значимости определения внеклеточной ДНК в материнской крови, а также ее концентрации, при которой наиболее вероятно развитие ПЭ, был проведен ROC-анализ. Полученные данные показали, что в 11-14 недель концентрация оДНК 401.41 ГЕ/мл позволяет прогнозировать развитие ПЭ с чувствительностью 80.0% и специфичностью 72.7%, концентрация мДНК 334.46 ГЕ/мл – с чувствительностью 85.0% и специфичностью 72.7% (площадь под кривой 0.882, **p<0.001**) **(Рисунок 3.2.30)**.

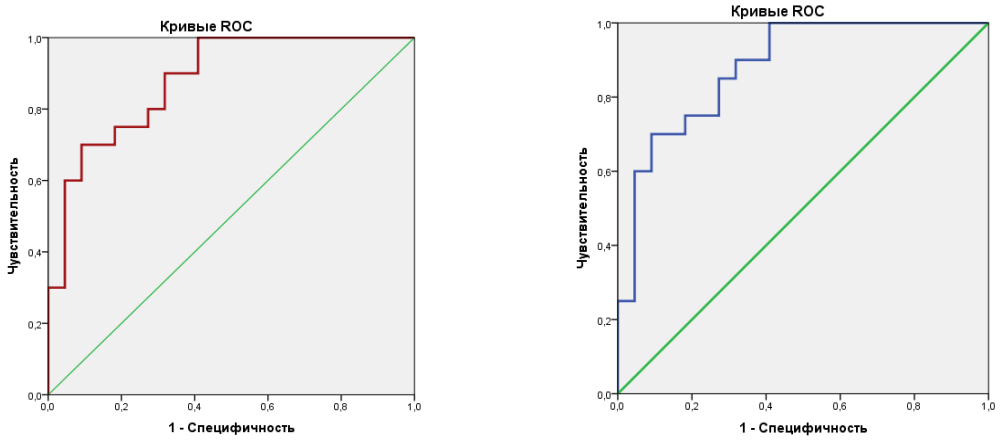

Рисунок 3.2.30. ROC-кривые оДНК и мДНК в 11-14 недель

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**) **(Рисунок 3.2.31)**.

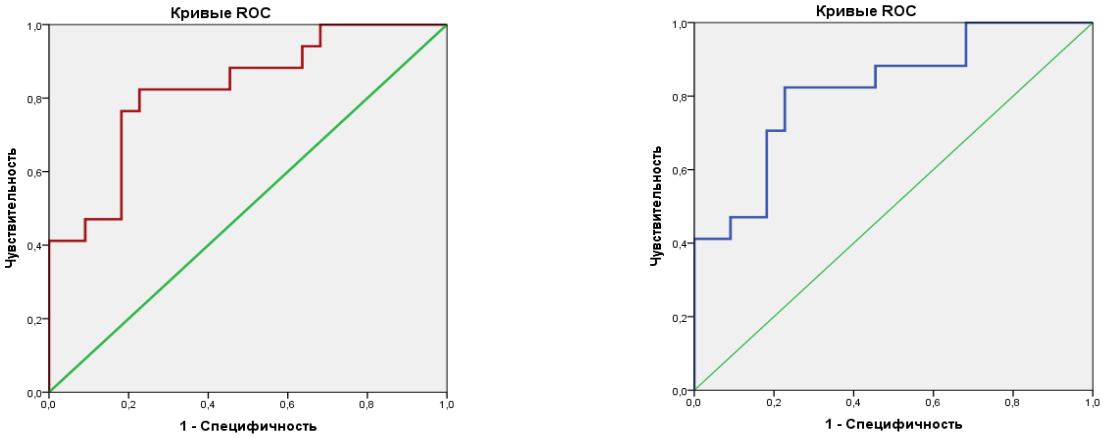

Рисунок 3.2.31. ROC-кривые оДНК и мДНК в 24-26 недель

В 30-32 недели при концентрации оДНК и мДНК 582.93 и 526.69 ГЕ/мл, соответственно, чувствительность составила 82.4%, специфичность – 71.4% (площадь под кривой 0.852 и 0.846, **p<0.001**) **(Рисунок 3.2.32)**.

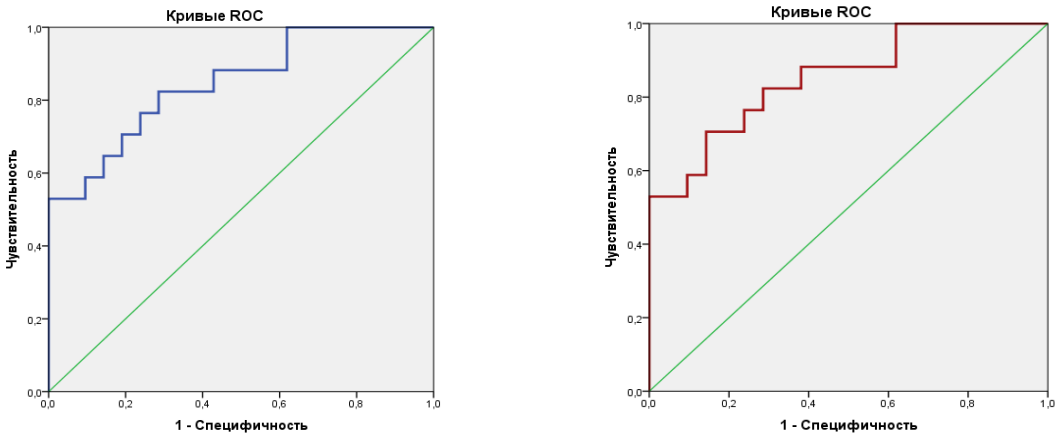

Рисунок 3.2.32. ROC-кривые оДНК и мДНК в 30-32 недели

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**) **(Рисунок 3.2.33)**.

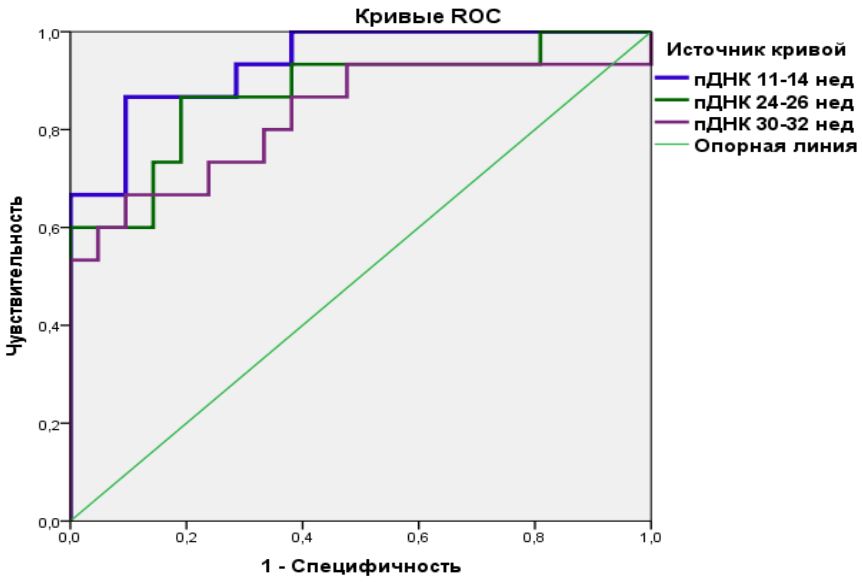

Рисунок 3.2.33. ROC-кривые пДНК в исследуемые сроки беременности

Полученные данные показали, что наибольшей прогностической значимостью в отношении развития ПЭ обладает концентрация пДНК в 11-14 недель беременности **(Рисунок 3.2.33)**.

Построение прогностической модели

Использование метода множественной логистической регрессии с пошаговым исключением переменных по алгоритму Вальда позволило нам разработать прогностическую модель развития ПЭ на основе полученных данных внеклеточной ДНК и выявленных значимых факторов риска по формуле:

$$p = 1 / (1 + e^{-z}), \text{ где}$$

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, что указывает на «хорошее» качество модели **(Рисунок 3.2.34)**. Пороговая точка отсечки (cutoff) составила 0.51 при уровне чувствительности 90.0% и специфичности 90.9% **(p<0.001)**.

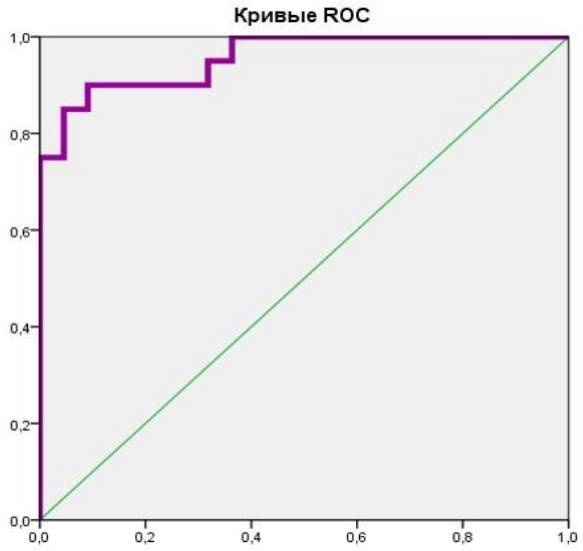

Рисунок 3.2.34. ROC-кривая, описывающая прогнозирование ПЭ на основании построенной модели

Таким образом, нами было выявлено, что при увеличении ИМТ женщины и исходного дАД повышался риск развития ПЭ. Во время беременности прогностическое значение имело увеличение сАД в третьем триместре по сравнению с первым и вторым, а также более высокие показатели ПИ МА при проведении скрининга первого триместра беременности. Клинически значимая протеинурия появлялась при наличии артериальной гипертензии. Концентрация внеклеточной ДНК коррелирует с цифрами АД, уровнем ХГЧ крови, показателями допплерометрии, со сроком манифестации ПЭ, сроком родоразрешения, массой и длиной тела новорожденного. Уровень внеклеточной оДНК и фракций обладает высокой чувствительностью и специфичностью при прогнозировании ПЭ, однако наибольшую прогностическую значимость имеет концентрация пДНК в 11-14 недель беременности.

3.3. Внеклеточная ДНК в материнской крови при преждевременных родах

Из 580 обследованных нами женщин отобраны 19 (3.3%) пациенток с преждевременным родоразрешением вследствие спонтанного развития регулярной родовой деятельности. 57 образцов материнской крови женщин с ПР были подвергнуты анализу на содержание внеклеточной ДНК. Ранние ПР произошли у 4 (21.1%) женщин при сроке беременности от 218 до 235 дней (медиана 222 дня). В остальных наблюдениях срок родоразрешения составил от 240 до 258 дней (медиана 255 дней).

Средний возраст женщин с ПР составил 31.05 ± 4.22 года, различий с контрольной группой не выявлено (**Таблица 3.3.1)**. На момент наступления беременности у 1 (5.3%) женщины с ПР наблюдался дефицит массы тела при ИМТ 16.5 кг/м^2, в остальных наблюдениях показатели ИМТ находились в пределах нормативных значений. Средний ИМТ в группе ПР составил 20.83 ± 2.45 кг/м^2 и не отличался от группы контроля. Из вредных привычек в обеих группах наблюдалось курение, однако значимых различий между группами не обнаружено. ПР в анамнезе выявлены у 5 (26.3%) женщин из основной группы.

Таблица 3.3.1. Клинико-анамнестические данные женщин в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПР (n=19)**	**p-value**
Возраст, лет	30.14 ± 4.07* (24 – 39)	31.05 ± 4.22* (26 – 39)	0.486
Исходный ИМТ, кг/м^2	20.70 ± 2.29* (15.6 – 26.0)	20.83 ± 2.45* (16.5 – 26.9)	0.877
Курение	6 (27.3%)	5 (26.3%)	0.945
ПР в анамнезе	0	5 (26.3%)	0.079

*Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (мин.-макс. значение)

При анализе экстрагенитальных заболеваний в исследуемых группах были выявлены различия в частоте встречаемости мутаций генов тромбофилии низкого риска **(p=0.021) (Таблица 3.3.2)**. Заболевания органов дыхания, зрения, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной системы встречались с одинаковой частотой в обеих группах.

Таблица 3.3.2. Частота встречаемости экстрагенитальных заболеваний в исследуемых группах

Нозология	**Норма (n=22)**	**ПР (n=19)**	**p-value**
Заболевания органов дыхания	12 (54.5%)	11 (57.9%)	0.829
Заболевания органов зрения	11 (50.0%)	6 (31.6%)	0.249
Заболевания сердечно-сосудистой системы	5 (22.7%)	4 (21.1%)	0.897
Мутации генов тромбофилии	2 (9.1%)	9 (47.4%)	**0.021**
Заболевания желудочно-кишечного тракта	5 (22.7%)	6 (31.6%)	0.525
Заболевания мочевыделительной системы	6 (27.3%)	5 (26.3%)	0.945

*Данные представлены как n (%)

Средний возраст начала половой жизни в группе ПР составил 20.00 ± 3.29 лет, в группе с неосложненным течением беременности 18.71 ± 3.26 лет и не различался. Сравнительный анализ данных гинекологического анамнеза показал, что у женщин с ПР чаще встречались ВЗОМТ **(p=0.019) (Рисунок 3.3.1)**. Не выявлено различий в частоте встречаемости эрозии шейки матки, синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) и миомы матки в исследуемых группах. Порок развития матки (внутриматочная перегородка) и эндометриоз отягощали анамнез женщин в группе ПР, однако статистически группы не различались по данной патологии.

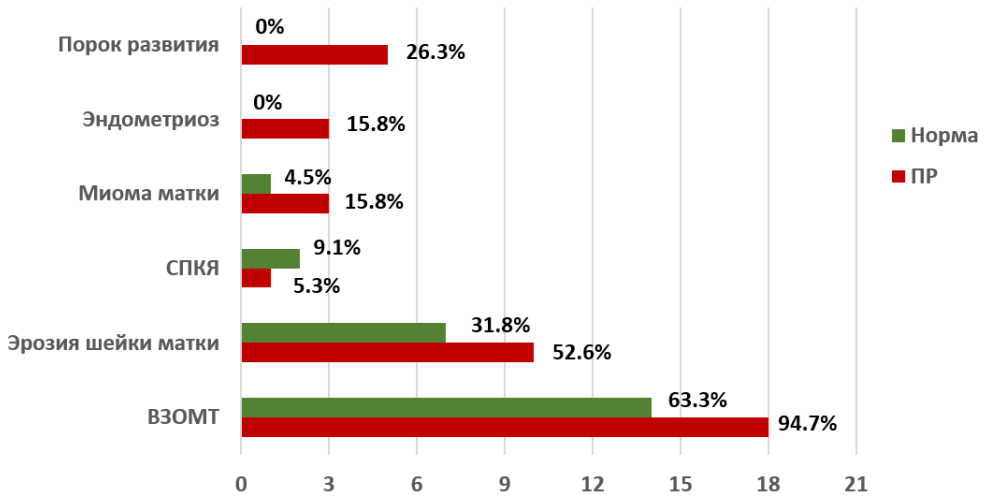

Рисунок 3.3.1. Структура и частота гинекологических заболеваний в исследуемых группах

Также не выявлено различий в приеме комбинированных оральных контрацептивов (КоК) между группами. У 8 (42.1%) женщин с ПР в анамнезе отмечена гистероскопия и выскабливание стенок полости матки в связи с наличием внутриматочной перегородки (5 наблюдений), синехий (1 наблюдение), полипа эндометрия (1 наблюдение), в сочетании с лапароскопической миомэктомией (1 наблюдение), что статистически различалось в исследуемых группах **(p=0.036)**.

У большинства женщин из группы ПР (89.5%) данная беременность была не первая, но лишь у 57.9% предстояли повторные роды (против 72.7% и 50.0% группы контроля, p>0.05). Статистически значимых различий в репродуктивном анамнезе в исследуемых группах не выявлено, однако у женщин с ПР отмечено больше случаев самопроизвольного и искусственного прерывания беременности, неразвивающейся беременности **(Рисунок 3.3.2)**.

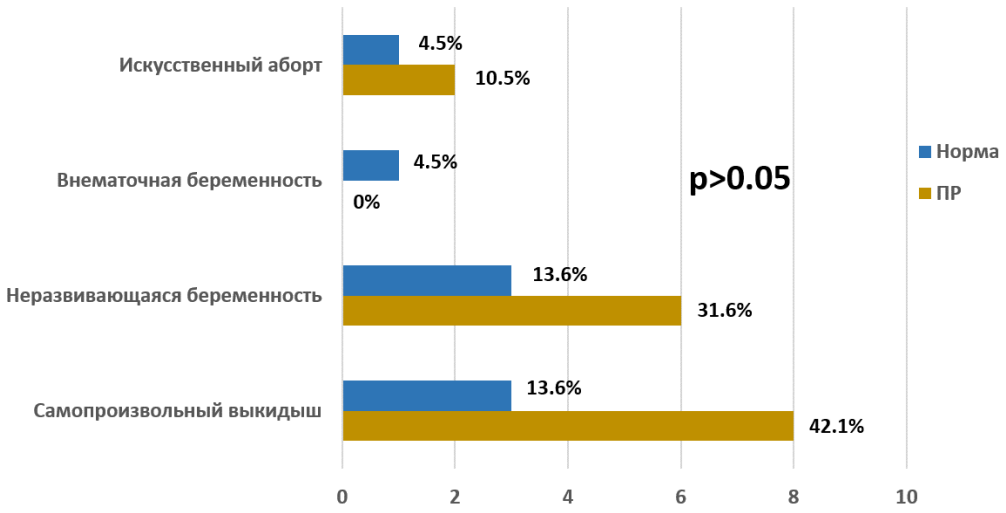

Рисунок 3.3.2. Исходы предыдущих беременностей в исследуемых группах

При изучении особенностей течения первого триместра беременности обнаружено, что токсикоз легкой степени, риниты и ОРВИ в равной степени встречались в группах **(Рисунок 3.3.3)**.

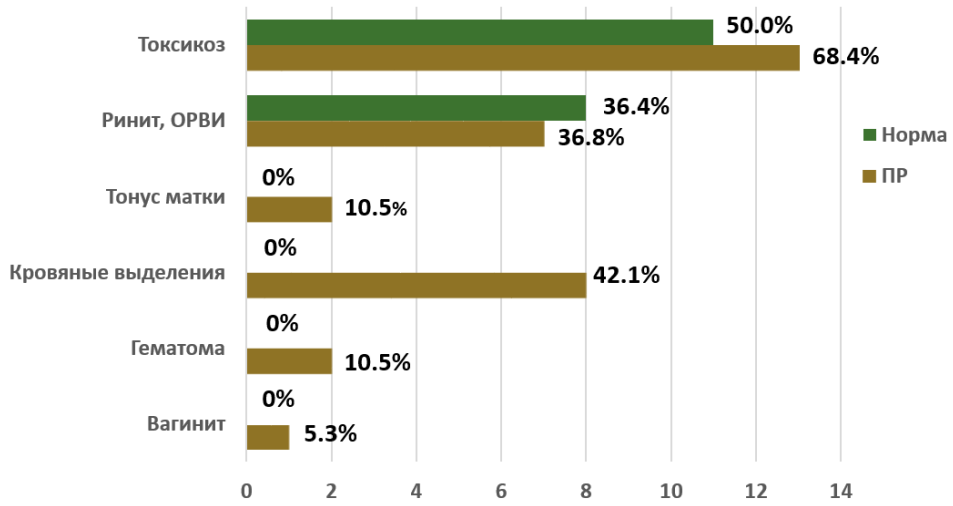

Рисунок 3.3.3. Характеристика течения первого триместра беременности в исследуемых группах

У достоверно большего количества женщин из группы ПР (63.1%) первый триместр был отягощен угрозой прерывания беременности: 2 (10.5%) случая – повышенный тонус матки, 8 (42.1%) случаев – кровяные выделения из наружных половых путей, 2 (10.5%) случая – гематома по данным УЗИ **(p=0.017)**. Нарушение

микрофлоры влагалища (неспецифический вульвовагинит) выявлено у одной пациентки из группы ПР (p>0.05).

Содержание биохимических маркеров скрининга первого триместра беременности не различалось в группах, медиана ХГЧ составила 44.3 (31.1-51.8) и 39.1 (27.8-68.2) МЕ/л, медиана PAPP-A – 2.5 (1.4-4.9) и 2.8 (2.1-4.6) МЕ/л в группе ПР и при неосложненном течении беременности, соответственно (p>0.05).

В первом триместре беременности все женщины в исследуемых группах принимали витамины. 94.7% беременные из группы ПР получали лечение гестагенами (дидрогестерон, микронизированный прогестерон), что значимо больше, чем в группе контроля **(p=0.017) (Рисунок 3.3.4)**.

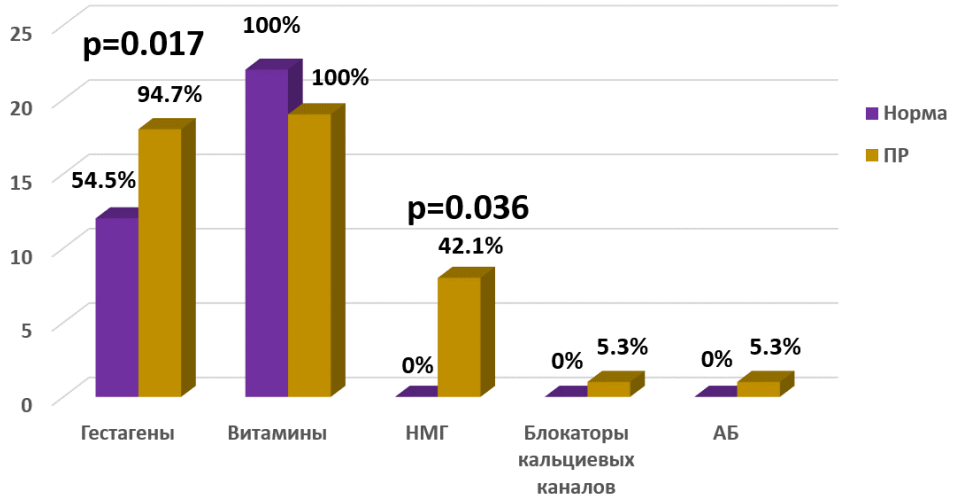

Рисунок 3.3.4. Лекарственные препараты, принимаемые в первом триместра беременности в исследуемых группах

Исследуемые группы также различались по частоте применения НМГ: 8 (42.1%) и 0 наблюдений в группах ПР и неосложненного течения беременности, соответственно **(p=0.036)**. Приём блокаторов кальциевых каналов и АБ имел место только у женщин в группе ПР.

Во втором триместре беременности угроза позднего выкидыша сохранялась у 10.5% женщин с повышенным тонусом матки и 5.3% с кровяными выделениями

из наружных половых органов, однако по данным факторам группы не различались (p>0.05) **(Рисунок 3.3.5)**.

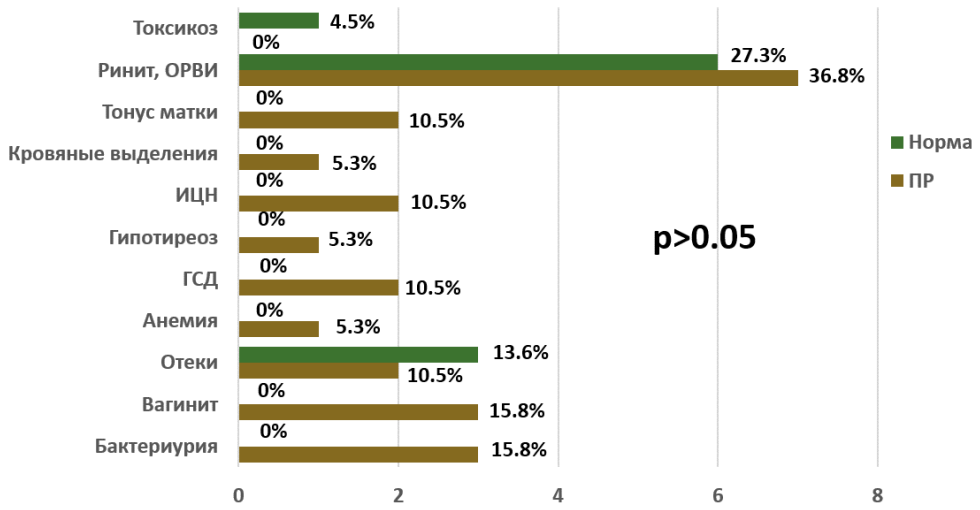

Рисунок 3.3.5. Характеристика течения второго триместра беременности в исследуемых группах

В группе ПР признаки истмико-цервикальной недостаточности по данным УЗИ обнаружены в 2 (10.5%) наблюдениях, 10 (52.6%) беременным произведено наложение швов на шейку матки, в связи с чем группы достоверно различались **(p=0.024)**. Отеки беременных выявлены в обеих группах (10.5% и 13.6%, p>0.05). В группе ПР у 1 (5.3%) женщины диагностирован гипотиреоз, у 2 (10.5%) – ГСД, у 1 (5.3%) – анемия легкой степени и в 3 (15.8%) случаях неспецифический вульвовагинит и бактериурия (p>0.05).

Во втором триместре беременности, аналогично первому триместру, достоверно больше женщин принимали гестагены (94.7% против 31.8%, **p<0.001**) и НМГ (42.1% против 0, **p=0.036**) в группе ПР **(Рисунок 3.3.6)**. Большинство беременных в исследуемых группах продолжали прием витаминов (p>0.05). Препараты железа принимали 1 (5.3%) пациентка в группе ПР в связи анемией легкой степени и 3 (13.6%) женщины с неосложненным течением беременности с профилактической целью (p>0.05). Учитывая наличие угрозы позднего выкидыша в группе ПР были назначены препараты группы b2-адреномиметиков (b2-АМ) и нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Следует также отметить,

что в данный промежуток времени достоверно больше женщин в группе ПР принимали антибактериальные препараты (АБ) (57.9% против 0%, **p=0.020**).

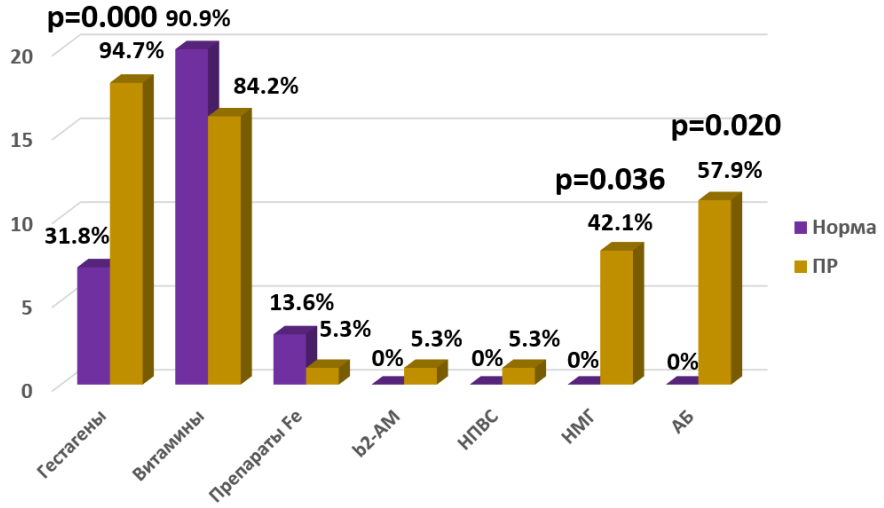

Рисунок 3.3.6. Лекарственные препараты, принимаемые во втором триместре беременности в исследуемых группах

В третьем триместре беременности по частоте осложнений достоверных различий между группами не обнаружено **(Рисунок 3.3.7)**. Однако у 1/3 беременных из группы ПР имели место клинические признаки угрожающих преждевременных родов. ИЦН по данным УЗИ диагностирована у 1 (5.3%) пациентки, при этом акушерский пессарий был установлен в 2 (10.5%) наблюдениях.

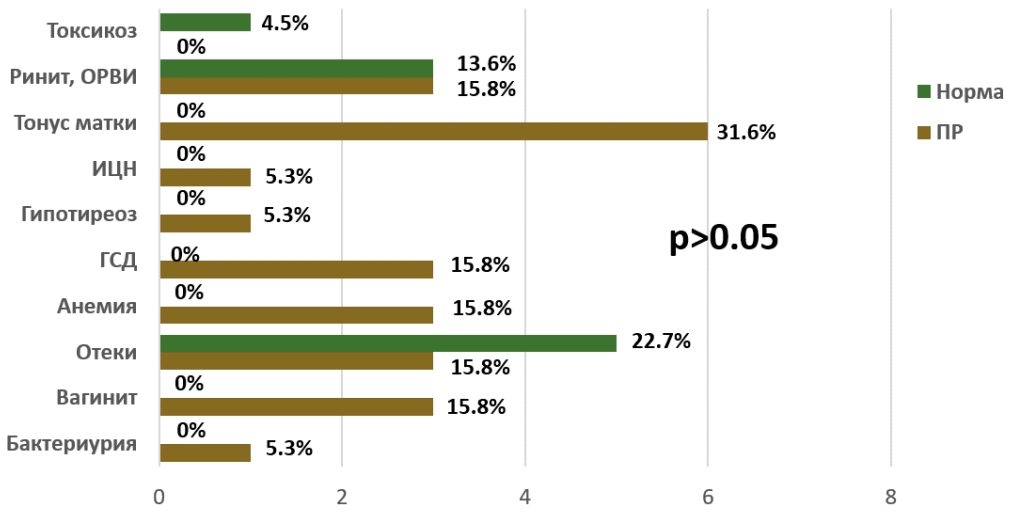

Рисунок 3.3.7. Характеристика течения третьего триместра беременности в исследуемых группах

Достоверно больше женщин в группе ПР принимали гестагены в третьем триместре беременности (57.9% против 18.2%, **p=0.018**), однако их количество практически в два раза уменьшилось по сравнению со вторым триместром **(Рисунок 3.3.8)**.

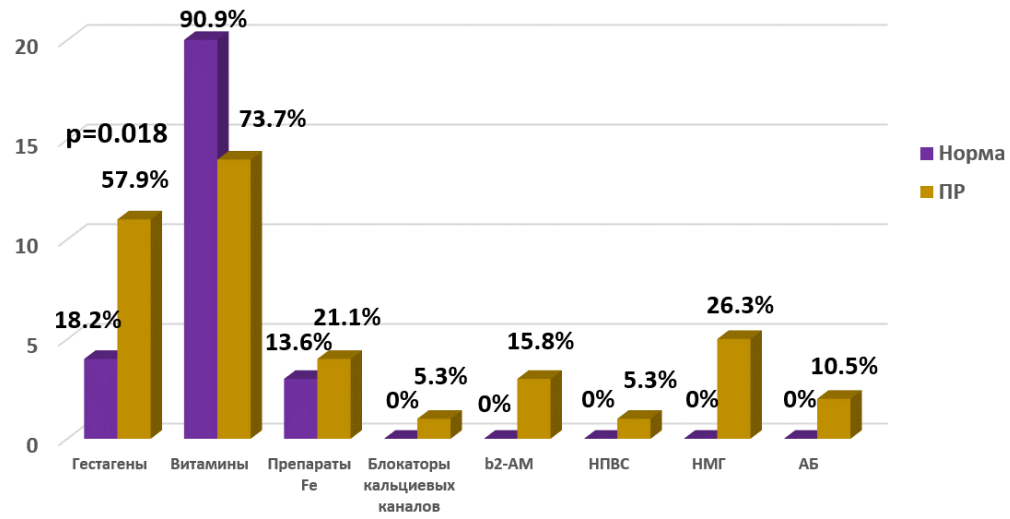

Рисунок 3.3.8. Лекарственные препараты, принимаемые в третьем триместре беременности в исследуемых группах

Также отмечалось уменьшение частоты наблюдений с применением НМГ и АБ в группе ПР – от 42.1% и 57.9% во втором до 26.3% и 10.5% в третьем триместре

беременности, соответственно. Прием витаминов продолжали большая часть женщин в исследуемых группах (73.7% и 90.9%, p>0.05). В связи с наличием клинических признаков угрожающих преждевременных родов в основной группе отмечен прием блокаторов кальциевых каналов (5.3%), b2-АМ (15.8%) и НПВС (5.3%), однако значимых различий с контрольной группой не выявлено (p>0.05).

Мы проанализировали данные цервикометрии в течение гестации в исследуемых группах **(Рисунок 3.3.9)**.

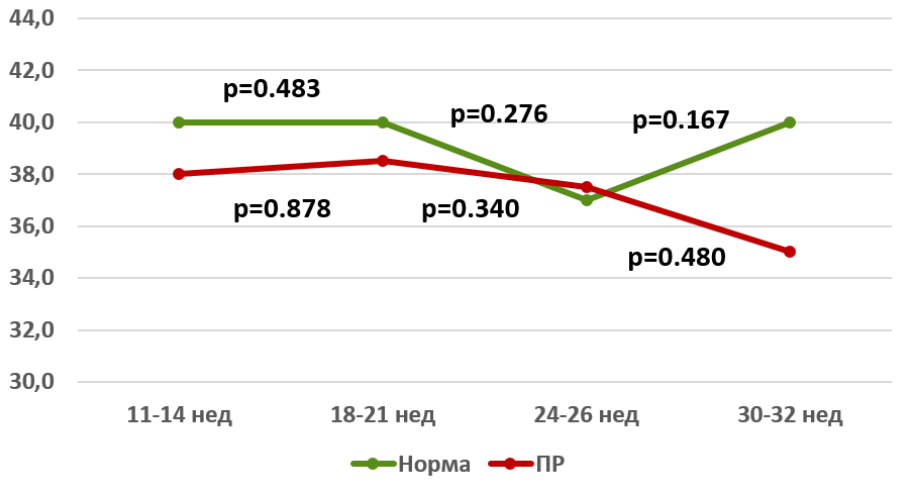

Рисунок 3.3.9. Изменение длины шейки матки в течение беременности в исследуемых группах

При проведении скрининга первого триместра беременности медиана длины шейки матки в группе ПР составила 38.0 (36.0-40.0) мм, при неосложненном течении беременности 40.0 (36.0-43.5) мм и не различалась (p=0.240). К 18-21 неделе уменьшения длины шейки матки в исследуемых группах не отмечено, медиана 38.5 (33.5-40.0) и 40.0 (37.3-43.3) мм при ПР и норме, соответственно (p>0.05). К 24-26 неделям обнаружено незначительное уменьшение показателей цервикометрии, при этом длина шейки матки в группах не различалась (медиана 37.5 (35.3-39.5) и 37.0 (36.5-38.5) мм при ПР и норме, соответственно) (p=0.743). При неосложненном течении беременности к 30-32 неделям отмечалось некоторое

увеличение длины шейки матки до 40.0 (35.0-41.0) мм, а при ПР уменьшение до 35.0 (29.0-40.0) мм, однако значимых различий между группами не обнаружено (p=0.079).

Принимая во внимание наличие швов на шейке матки у 10 (52.6%) женщин из группы ПР, целесообразно провести анализ данных цервикометрии обособленно. Как видно на **рисунке 3.3.10**, достоверных изменений длины шейки матки в течение беременности в исследуемых группах не выявлено (p>0.05).

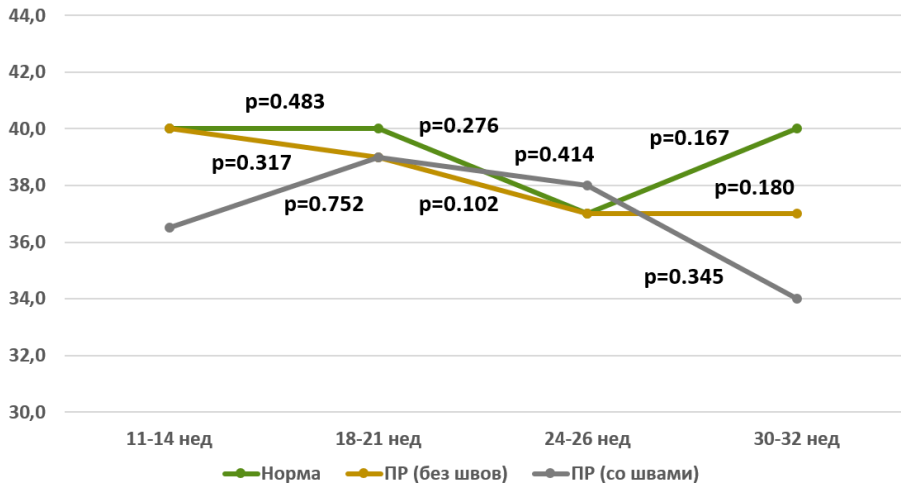

Рисунок 3.3.10. Изменение длины шейки матки в течение беременности в зависимости от наличия или отсутствия швов

Однако при сравнительном анализе обнаружено, что длина шейки матки в 11-14 недель была достоверно меньше у женщин, которым впоследствии произведено зашивание шейки матки, по сравнению с беременными без швов в группе ПР **(Таблица 3.3.3).**

Таблица 3.3.3. Сравнительный анализ показателей цервикометрии

Срок беременности	**Длина шейки матки, мм**			**p-value**
	Норма	**ПР (без швов)**	**ПР (швы)**	
11-14 недель	40.0 (36.0-43.5)	**40.0 (37.0-42.0)**	**36.5 (34.0-40.0)**	**0.043**

18-21 неделя	40.0 (37.3-43.3)	39.0 (38.0-42.0)	39.0 (32.0-40.0)	>0.05
24-26 недель	37.0 (36.5-38.5)	37.0 (30.0-40.0)	38.0 (35.5-39.0)	>0.05
30-32 недели	40.0 (35.0-41.0)	37.0 (30.0-45.0)	34.0 (27.0-36.0)	>0.05

*Данные представлены как медианы (интерквартильный интервал)

При анализе данных допплерометрии было выявлено достоверное уменьшение среднего ПИ МА к 24-26 неделям в группе ПР и при неосложненном течении беременности **(Рисунок 3.3.11)**.

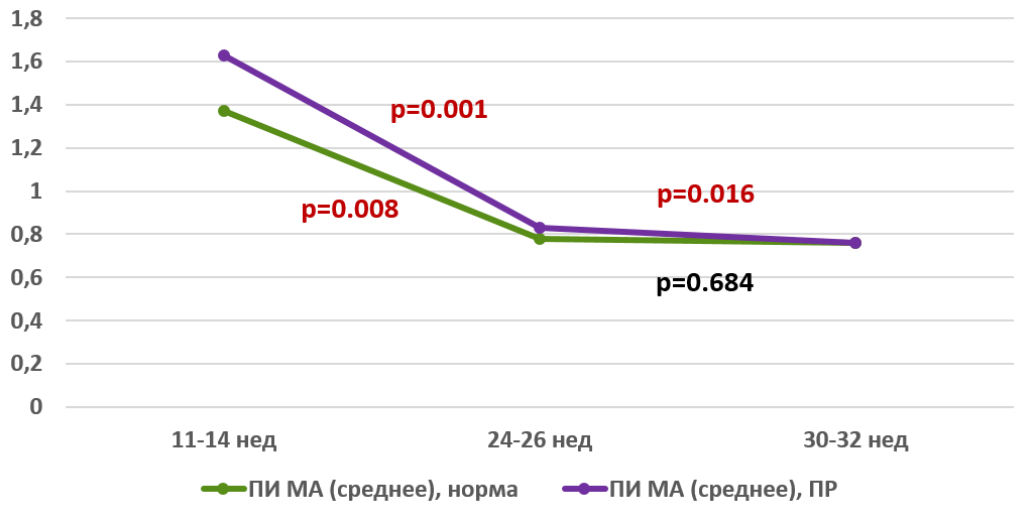

Рисунок 3.3.11. Средний ПИ маточных артерий в динамике неосложненной беременности и при ПР

Во второй половине беременности отмечено уменьшение среднего ПИ МА только в группе ПР, при этом достоверно снижался ПИ левой МА **(p=0.036)**. Сравнительный анализ данных допплерометрии выявил более высокое значение ПИ МА в группе ПР при проведении скрининга первого 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**).

В основной группе медиана ПИ АП в 24-26 недель составила 1.15 (1.09-1.32) и уменьшалась к 30-32 неделям до 0.96 (0.82-1.06) **(p=0.016)**, однако значимых различий с контрольной группой не обнаружено **(Рисунок 3.3.12)**.

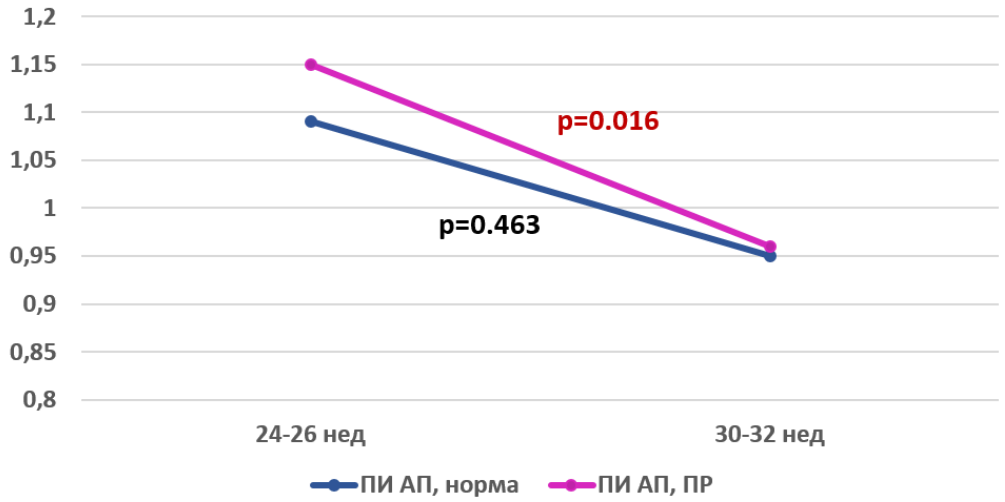

Рисунок 3.3.12. ПИ артерии пуповины при неосложненной беременности и ПР

Допплерометрические показатели кровотока в СМА плода не различались между группами: медиана в 24-26 недель – 1.91 (1.70-1.98) и 1.87 (1.69-2.05), в 30-32 недели – 1.60 (1.43-1.85) и 1.32 (1.13-1.61) в группе ПР и контрольной группе, соответственно (p>0.05).

Срок родоразрешения 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. При сравнении клинико-анамнестических данных женщин группы ПР с преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО) и без ПРПО значимых различий не выявлено **(Таблица 3.3.4)**.

Таблица 3.3.4. Сравнительный анализ клинико-анамнестетических данных женщин группы ПР с ПРПО и без ПРПО

	ПР без ПРПО (n=10)	**ПР с ПРПО (n=9)**	**p-value**
ВЗОМТ	9 (90.0%)	9 (100%)	0.496
Швы на шейке матки	5 (50.0%)	5 (55.6%)	0.808

Акушерский пессарий	0	2 (22.2%)	0.251
Бактериурия	2 (20.0%)	2 (22.2%)	0.905
Вагинит	3 (30.0%)	4 (44.4%)	0.519

*Данные представлены как n (%)

Экстренное кесарево сечение произведено у 8 (42.1%) беременных в связи с тазовым предлежанием плода (2 случая) и наличием рубца на матке (после кесарева сечения – 2 случая, миомэктомии – 3 случая, тубэктомии – 1 случай). По частоте оперативного родоразрешения группы не различались (p>0.05). Обезболивание родов проведено у 12 (63.2%) женщин в группе ПР и у 13 (59.1%) с неосложненным течением беременности. По частоте и методе обезболивания родов группы не различались **(Таблица 3.3.5).**

Таблица 3.3.5. Обезболивание родов в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПР (n=19)**	**p-value**
Обезболивание родов	13 (59.1%)	12 (63.2%)	0.789
Эпидуральная анальгезия / анестезия	7 (53.8%)	4 (33.3%)	0.320
Спинальная анестезия	5 (38.5%)	7 (58.3%)	0.329
Спинально-эпидуральная анестезия	1 (7.7%)	0	0.518
Эндотрахеальный наркоз	0	1 (8.4%)	0.459

*Данные представлены как n (%)

В группе ПР родилось 15 (78.9%) мальчиков, что достоверно больше, чем в контрольной группе **(p=0.035) (Таблица 3.3.6)**. По массе и длине тела новорожденных также выявлены значимые различия **(p<0.001)**.

Таблица 3.3.6. Данные новорожденных в исследуемых группах

	Норма (n=22)	**ПР (n=19)**	**p-value**
Мужской пол плода	10 (45.5%)	15 (78.9%)	**0.035**
Масса новорожденных, граммов	3305.0* (2855.0 – 3902.0)	2690.0* (1492.0 – 3320.0)	**<0.001**
Длина новорожденных, см	51.5* (49.0 – 55.0)	48.0* (38.0 – 53.0)	**<0.001**
Оценка по шкале Апгар, 1 мин	8.0* (8.0 – 9.0)	8.0* (7.0 – 8.0)	**0.003**
Оценка по шкале Апгар, 5 мин	9.0* (8.0 – 9.0)	8.0* (7.0 – 9.0)	**<0.001**
Поступление ОРИТН	0	7 (36.8%)	**0.046**

*Данные представлены как медианы (мин.-макс. значения), n (%)

При ПР оценка состояния новорожденного по шкале Апгар на 1-й и 5-й минуте была достоверно меньше, чем в контрольной группе **(p=0.003 и p<0.001)**. Распределение баллов по Апгар на 1-й и 5-й минуте после рождения в исследуемых группах представлено на **рисунке 3.3.13**. При этом частота поступления новорожденных в ОРИТН также была выше (**p=0.046**).

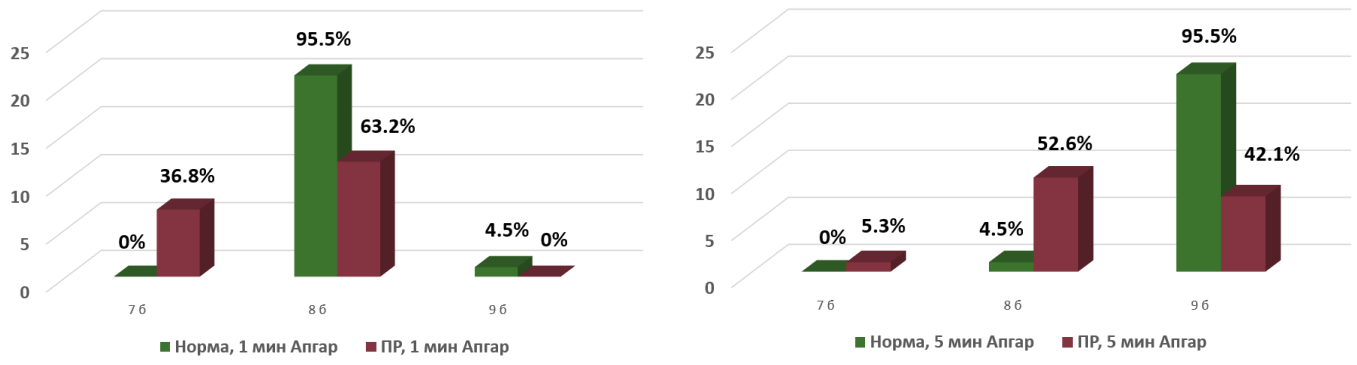

Рисунок 3.3.13. Распределение баллов по шкале Апгар на 1-й и 5-й минуте после рождения в исследуемых группах

Кровопотеря во время родов в обеих группах не превышала допустимую норму с учетом метода родоразрешения. Определение массы плаценты было доступно у 9 женщин с ПР и 18 женщин группы контроля, медиана составила 303.0 (237.0-523.0) и 438.5 (310.0-553.0) граммов, соответственно **(p=0.027)**.

Патоморфологическое исследование плаценты

Проведено гистологическое исследование 9 образцов (5 со спонтанным началом родов, 4 с ПРПО).

Ворсинчатое дерево характеризовались балансом зрелых и незрелых промежуточных ворсин, единичными терминальными ворсинами. Развитие ворсинчатого дерева соответствовало сроку гестации 33-36 недель. В строме ворсин обнаружены лимфоциты, макрофаги, единичные нейтрофилы. Выявлен отек, очаговая инфильтрация макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами экстраплацентарных оболочек. Афункциональные зоны до 3-х из 10 полей зрения. Обнаружены множественные инфаркты ворсинчатого дерева. Повреждение СЦТ не превышало 25%, однако имело место выраженная вакуолизация, обусловленная стрессом эндоплазматического ретикулума, гидропической дистрофией.

Анализ внеклеточной ДНК

Концентрация внеклеточной оДНК у женщин с ПР, аналогично неосложненному течению беременности, не менялась в первой ее половине, медиана составила 507.26 (299.96-916.92) ГЕ/мл в 11-14 недель и 486.52 (307.27-691.63) ГЕ/мл в 24-26 недель ($p>0.05$). Однако в 30-32 недели значимого увеличения уровня оДНК не наблюдалось (медиана 558.34 (343.57-1890.99) ГЕ/мл, $p=0.125$). При сравнительном анализе выявлено, что по сравнению с неосложненной беременностью концентрация оДНК была значимо выше в группе

ПР в 11-14 недель (медиана 507.26 (299.96-916.92) против 208.11 (156.95-461.35) ГЕ/мл, **p=0.001**) и в 24-26 недель (медиана 486.52 (307.27-691.63) против 298.68 (126.66-458.85) ГЕ/мл, **p=0.044**) **(Рисунок 3.3.14)**. В 30-32 недели значимых различий в уровне оДНК между группами не обнаружено (медиана 558.34 (343.57-1890.99) против 424.79 (154.43-739.99) ГЕ/мл, p=0.147).

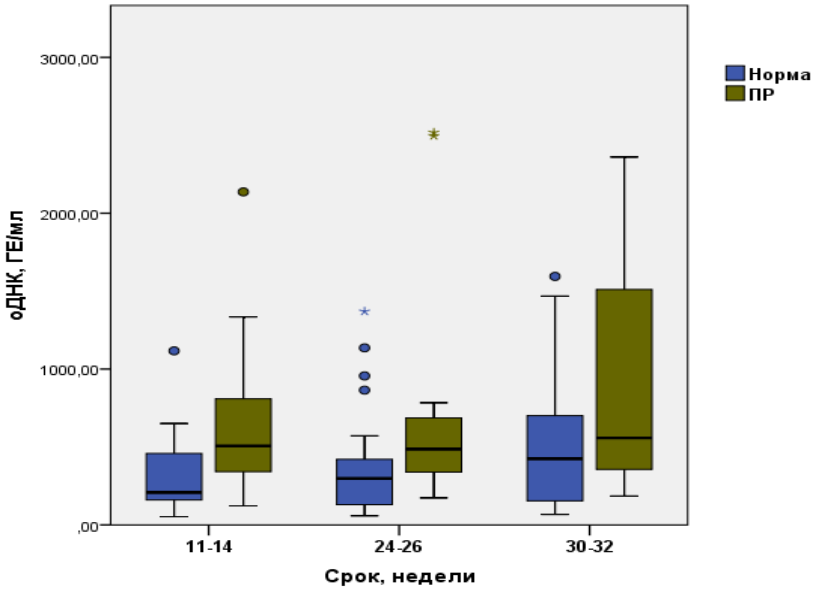

Рисунок 3.3.14. Концентрация оДНК при неосложненном течении беременности и ПР

При изучении концентрации мДНК в группе ПР значимых различий в 11-14, 24-26 и 30-32 недели не выявлено. По сравнению с неосложненным течением беременности уровень мДНК был достоверно выше в 11-14 недель (медиана 497.55 (285.29-877.26) против 201.80 (131.97-442.70) ГЕ/мл, **p=0.002**) и в 24-26 недель (медиана 469.76 (277.41-664.59) против 275.73 (115.89-428.16) ГЕ/мл, **p=0.047**) **(Рисунок 3.3.15)**.

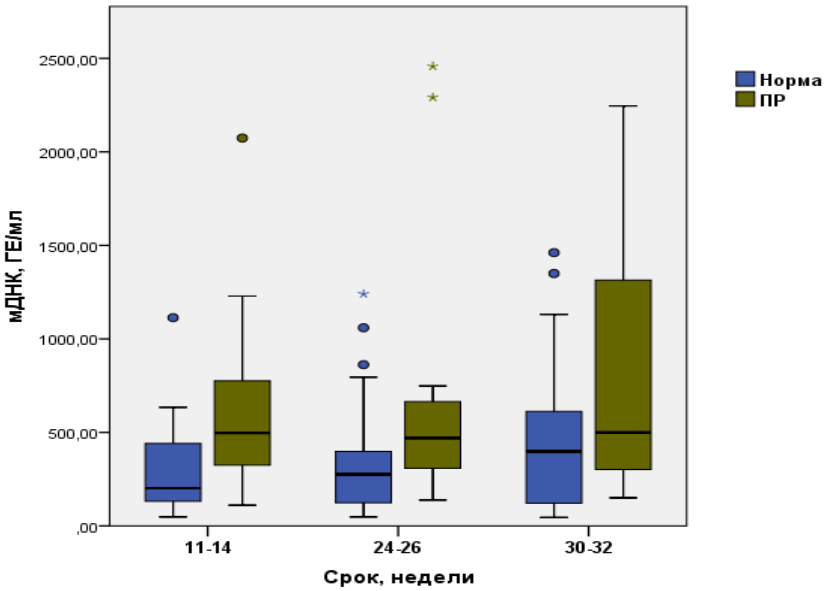

Рисунок 3.3.15. Концентрация мДНК при неосложненном течении беременности и ПР

Концентрация пДНК при ПР увеличивалась незначительно в первой половине беременности – от 22.76 (14.24-40.45) в 11-14 недель до 35.54 (24.43-39.46) ГЕ/мл в 24-26 недель (p>0.05), однако в 11-14 недель была выше, чем в контрольной группе **(p=0.016) (Рисунок 3.3.16).** К 30-32 неделям отмечалось значительное увеличение уровня пДНК до 49.11 (42.06-108.94) ГЕ/мл **(p=0.003)**, однако различий с концентрацией пДНК при неосложненном течении беременности не выявлено (p=0.063).

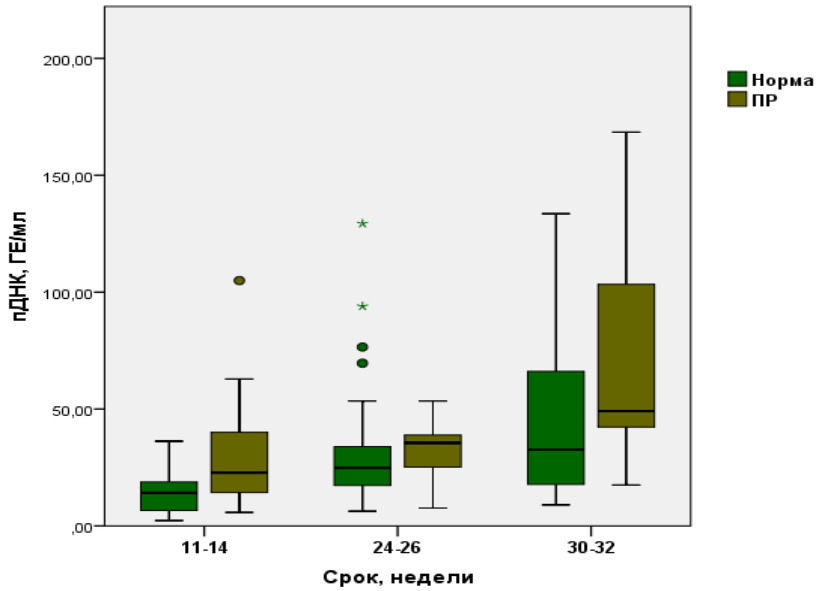

Рисунок 3.3.16. Концентрация пДНК при неосложненном течении беременности и ПР

Процентное содержание пДНК от оДНК увеличивалось от 4.33 % (3.00-8.00) до 6.62 % (3.75-11.25) в 11-14 и 24-26 недель **(p=0.014) (Рисунок 3.3.17).**

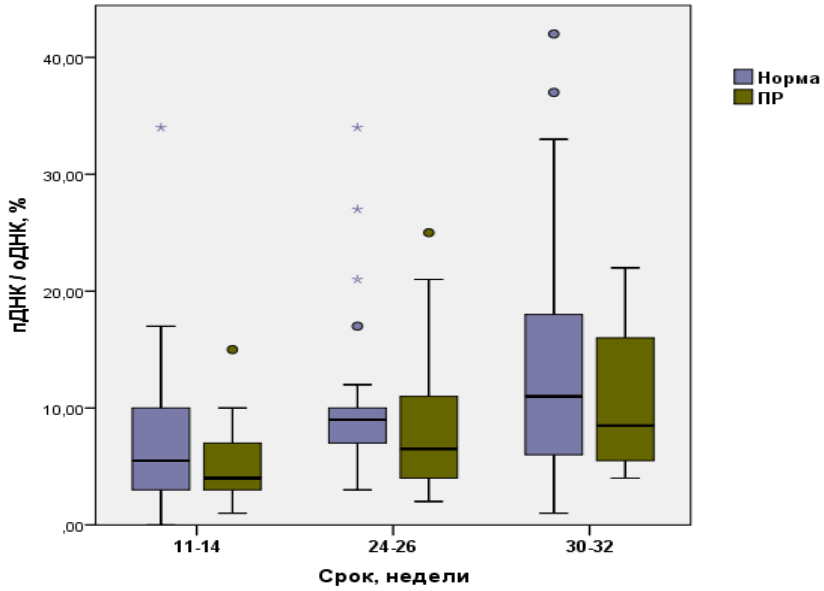

Рисунок 3.3.17. Процентное содержание пДНК от оДНК при неосложненном течении беременности и ПР

К 30-32 неделям доля пДНК от оДНК увеличивалась незначительно (медиана 8.59% (5.25-16.50), p=0.210). При сравнительном анализе с контрольной группой в изученные сроки беременности различий не выявлено (p>0.05).

Мы проанализировали концентрацию внеклеточной ДНК в группе ПР с учетом ПРПО у 9 (47.4%) беременных.

Уровень внеклеточной оДНК не менялся в течение беременности при ПР без ПРПО (медиана 564.86 (287.46-933.67), 543.53 (203.89-691.63), 523.13 (257.45-749.98) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) и незначительно увеличивался к 30-32 неделям при ПР с ПРПО (медиана 507.26 (347.78-1017.77), 434.43 (338.98-1991.16), 650.37 (355.86-2315.96) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) **(Рисунок 3.3.18)**.

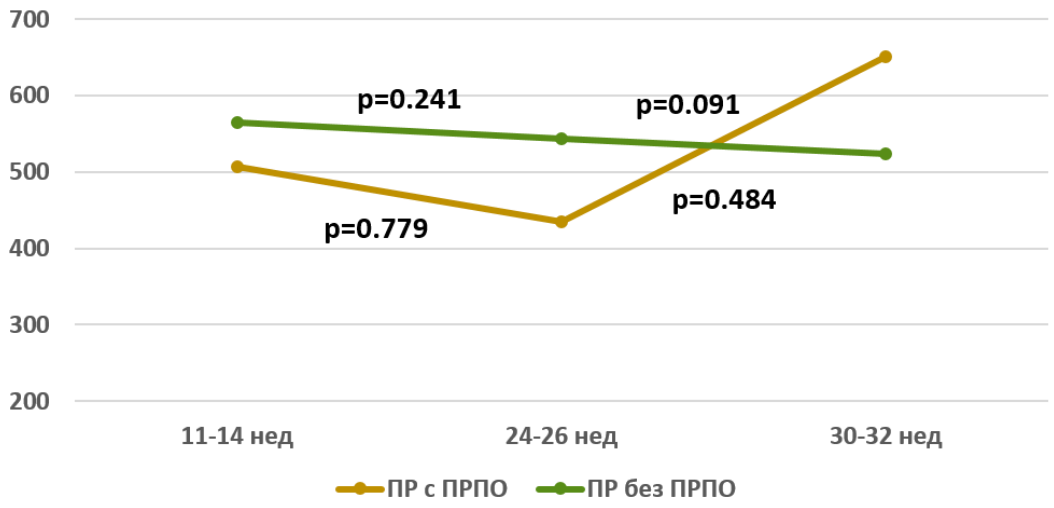

Рисунок 3.3.18. Концентрация оДНК в динамике беременности при ПР с ПРПО и ПР без ПРПО

На всех исследуемых сроках беременности концентрация оДНК в группе ПР не различалась у женщин с ПРПО и без (p>0.05). При сравнительном анализе с неосложненным течением беременности уровень оДНК был достоверно выше у женщин как с ПРПО, так и без в 11-14 недель (**p=0.004 и p=0.014**, соответственно) и не различался в 24-26 и 30-32 недели (p>0.05) **(Рисунок 3.3.19)**.

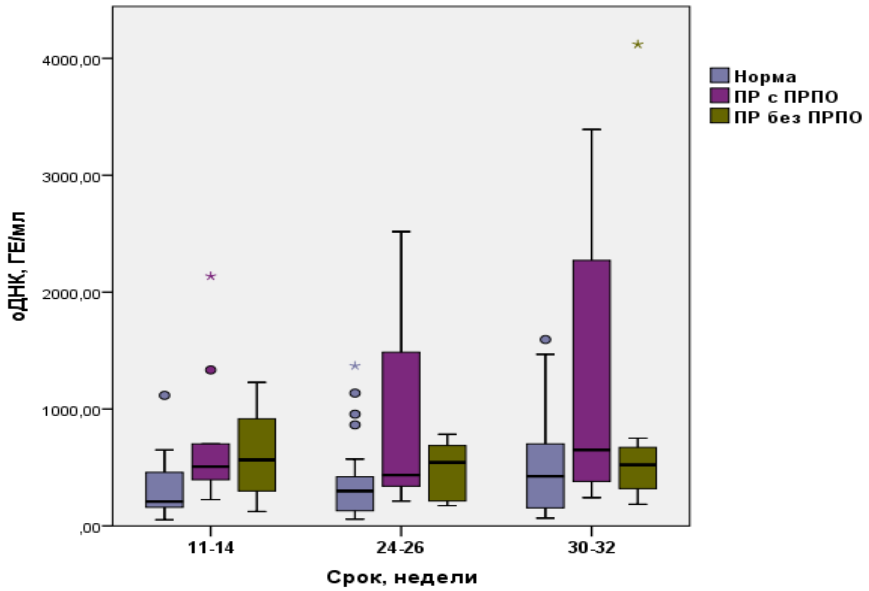

Рисунок 3.3.19. Концентрация оДНК при ПР с ПРПО, ПР без ПРПО и неосложненном течении беременности

Концентрация мДНК, аналогично оДНК, не менялась в течение беременности при ПР без ПРПО (медиана 537.36 (249.69-893.81), 511.39 (158.09-664.59), 477.60 (214.23-702.96) ГЕ/мл в 11-14, 24-26 и 30-32 недели, соответственно) **(Рисунок 3.3.20)**. При ПР с ПРПО уровень мДНК незначительно уменьшался от 497.55 (327.88-952.18) в 11-14 недель до 394.35 (314.27-1835.44) в 24-26 недель, далее увеличивался до 599.17 (301.32-2086.26) к 30-32 неделям **(Рисунок 3.3.20)**. На всех исследуемых сроках беременности концентрация мДНК в группе ПР не различалась у женщин с ПРПО и без ($p>0.05$).

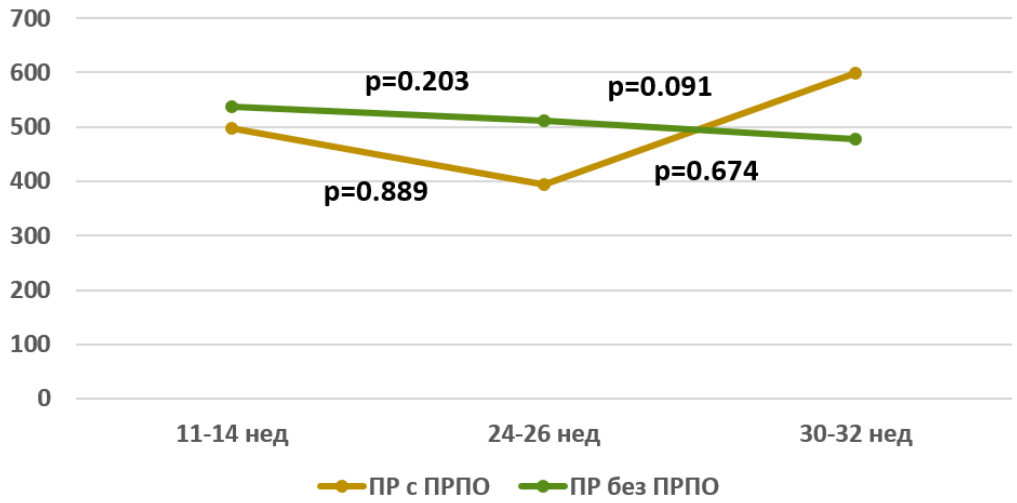

Рисунок 3.3.20. Концентрация мДНК в динамике беременности при ПР с ПРПО и ПР без ПРПО

При сравнительном анализе с неосложненным течением беременности уровень мДНК был достоверно выше у женщин как с ПРПО, так и без в 11-14 недель (**p=0.004 и p=0.020**, соответственно) и не различался в 24-26 и 30-32 недели (p>0.05) **(Рисунок 3.3.21)**

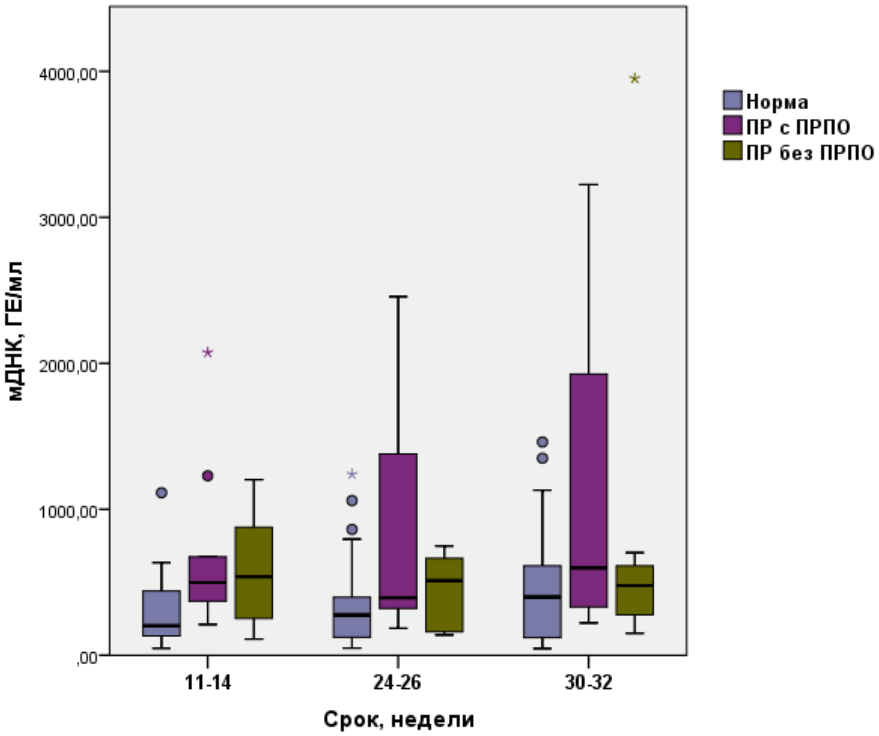

Рисунок 3.3.21. Концентрация мДНК при ПР с ПРПО, ПР без ПРПО и неосложненном течении беременности

При ПР с ПРПО и без ПРПО концентрация пДНК увеличивалась незначительно в первой половине беременности (медиана 14.68 (9.75-48.82) и 24.29 (18.29-41.74) в 11-14 недель, 33.68 (12.89-42.12) и 35.54 (24.43-38.00) в 24-26 недель, соответственно) **(Рисунок 3.3.22)**.

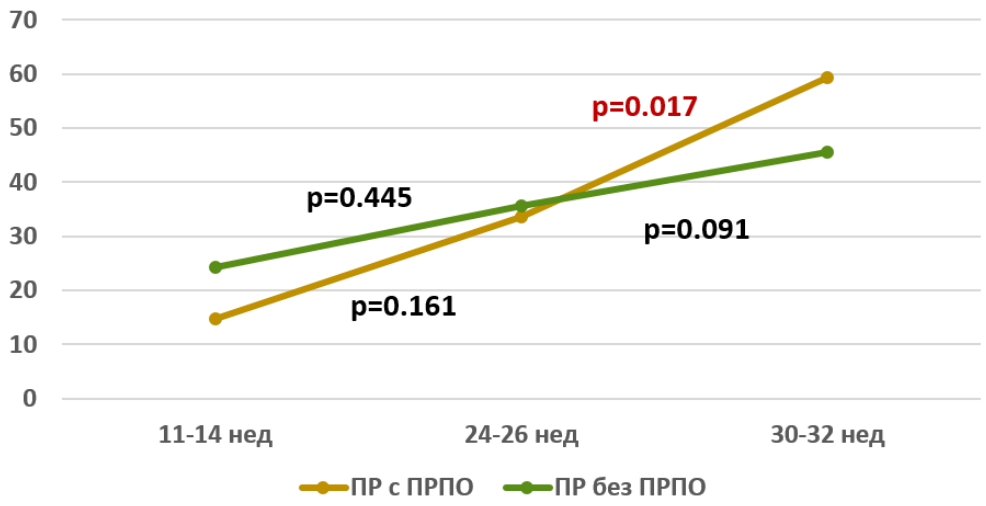

Рисунок 3.3.22. Концентрация пДНК в динамике беременности при ПР с ПРПО и ПР без ПРПО

Однако к 30-32 неделя уровень пДНК у женщин с ПРПО достоверно повышался до 59.24 (31.15-141.47) ГЕ/мл **(p=0.017)**. На всех исследуемых сроках беременности концентрация пДНК в группе ПР не различалась у женщин с ПРПО и без (p>0.05).

При сравнительном анализе с неосложненным течением беременности концентрация пДНК была достоверно больше только у женщин со спонтанными ПР без ПРПО в 11-14 недель **(p=0.005) (Рисунок 3.3.23)**.

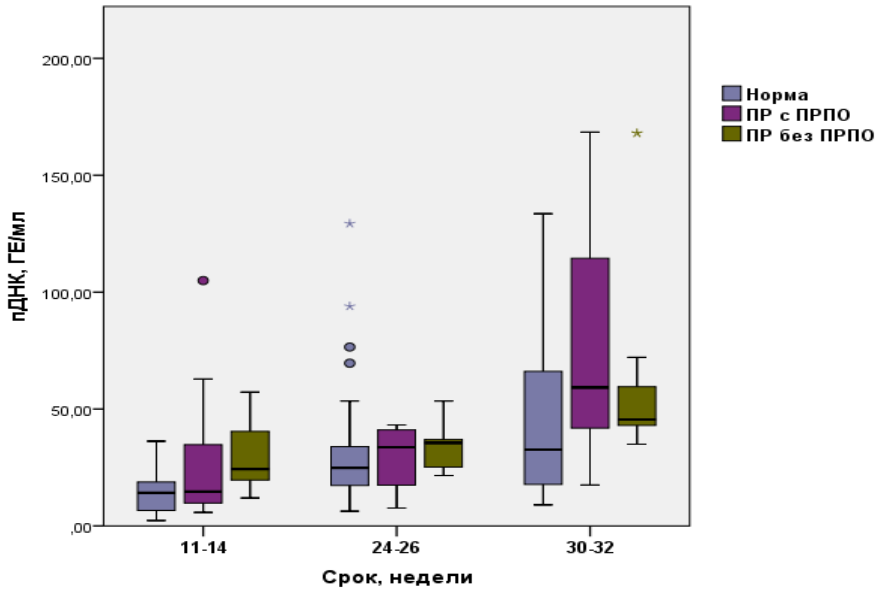

Рисунок 3.3.23. Концентрация пДНК при ПР с ПРПО, ПР без ПРПО и неосложненном течении беременности

В результате корреляционного анализа концентрации внеклеточной ДНК с данными допплерометрии было выявлено, что при увеличении уровня пДНК в первой половине беременности наблюдалось уменьшение ПИ АП в 24-26 недель **(p<0.001) (Таблица 3.3.7)**. Значение ПИ правой МА в 30-32 недели обратно коррелировало с концентрацией оДНК и мДНК **(p=0.020 и 0.022)** на данном сроке, в то время как обнаружена прямая корреляция с долей пДНК от оДНК на всех исследуемых сроках (в 11-14 недель **r= 0.566, p=0.044**, в 24-26 недель **r= 0.611, p=0.035**, в 30-32 недели **r= 0.788, p=0.002**). С увеличением уровня пДНК в 24-26 недель отмечалось уменьшение длины шейки матки на данном сроке **(p=0.043)**.

Таблица 3.3.7. Результаты корреляционного анализа внеклеточной ДНК с данными допплерометрии и цервикометрии

Данные		**Коэффициент корреляции (r), p > 0.05**		
		оДНК	**мДНК**	**пДНК**
МА, ПИ (11-14 недель)	11-14 нед	-0.154	-0.177	0.054
	24-26 нед	0.073	0.048	0.224

	30-32 нед	-0.214	-0.215	0.010
МА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	0.096	0.050	-0.105
	24-26 нед	0.109	-0.011	0.032
	30-32 нед	0.027	0.018	0.055
Левая МА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	0.421	0.377	0.168
	24-26 нед	0.301	0.217	0.081
	30-32 нед	0.173	0.136	0.173
Правая МА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	-0.193	-0.226	-0.322
	24-26 нед	-0.067	-0.175	-0.151
	30-32 нед	-0.128	-0.082	-0.046
АП, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	-0.490	-0.484	**-0.861***
	24-26 нед	-0.536	-0.532	**-0.851***
	30-32 нед	-0.178	-0.169	-0.342
СМА, ПИ (24-26 недель)	11-14 нед	0.400	0.400	0.000
	24-26 нед	-0.200	-0.200	-0.400
	30-32 нед	0.500	0.300	0.500
МА, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	0.017	0.039	0.166
	24-26 нед	0.077	0.028	0.289
	30-32 нед	-0.268	-0.296	-0.007
Левая МА, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	0.198	0.242	0.016
	24-26 нед	0.182	0.147	0.007
	30-32 нед	0.196	0.168	0.252
Правая МА, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	-0.242	-0.280	0.231
	24-26 нед	-0.035	-0.091	0.538
	30-32 нед	**-0.657***	**-0.650***	-0.231
АП, ПИ (30-32 недель)	11-14 нед	0.129	0.127	0.107
	24-26 нед	0.172	0.203	0.077
	30-32 нед	-0.224	-0.217	-0.294
СМА, ПИ	11-14 нед	0.418	0.418	0.226

(30-32 недель)	24-26 нед	0.263	0.347	-0.048
	30-32 нед	0.008	-0.059	-0.268
Длина шейка матки, мм (11-14 недель)	11-14 нед	0.089	0.084	0.130
	24-26 нед	0.088	0.124	-0.229
	30-32 нед	-0.218	-0.256	-0.222
Длина шейка матки, мм (18-21 неделя)	11-14 нед	0.494	0.494	0.189
	24-26 нед	0.152	0.140	-0.213
	30-32 нед	0.571	0.555	0.395
Длина шейка матки, мм (24-26 недель)	11-14 нед	-0.036	-0.036	-0.494
	24-26 нед	-0.145	-0.108	**-0.723***
	30-32 нед	-0.414	-0.468	-0.162
Длина шейка матки, мм (30-32 недели)	11-14 нед	0.242	0.218	0.474
	24-26 нед	0.183	0.224	0.187
	30-32 нед	0.179	0.067	0.330

* значения $p < 0.05$

Концентрация пДНК в 24-26 недель коррелировала со сроком родов **(r=0.549, p=0.018)** и длиной тела новорожденного **(r=0.486, p=0.041)**, тогда как с массой новорожденного взаимосвязи не обнаружено. Не выявлено корреляций между уровнем внеклеточной ДНК и возрастом, ИМТ женщины, показателями АД, КТР плода, ХГЧ, PAPP-A, массой плаценты ($p>0.05$).

При увеличении исходного ИМТ женщины отмечалось увеличение среднего АД во время скрининга первого триместра беременности **(r= 0.588, p=0.017)**, ПИ левой МА в 24-26 недель **(r= 0.616, p=0.025)** и уменьшение содержания ХГЧ в 11-14 недель **(r= -0.532, p=0.019)**.

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) **(Рисунок 3.3.24)**.

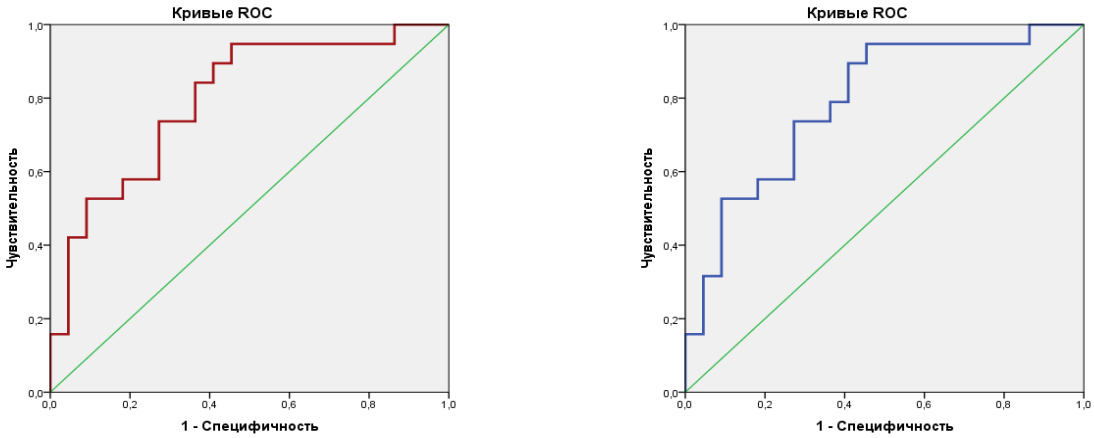

Рисунок 3.3.24. ROC-кривые оДНК и мДНК в 11-14 недель

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) **(Рисунок 3.3.25)**.

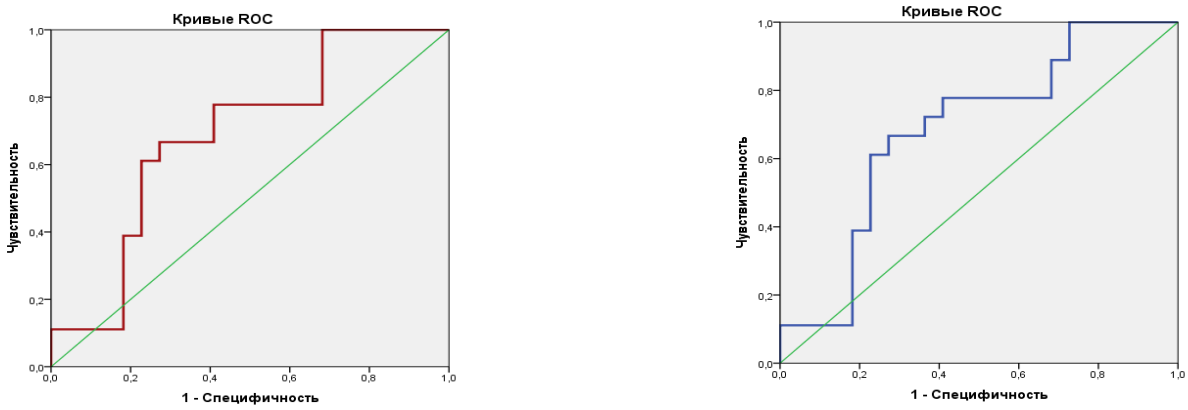

Рисунок 3.3.25. ROC-кривые оДНК и мДНК в 24-26 недель

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 чувствительность 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**). В 24-26 недель уровень пДНК не обладает достоверной прогностической значимостью в отношении ПР **(Рисунок 3.3.26)**.

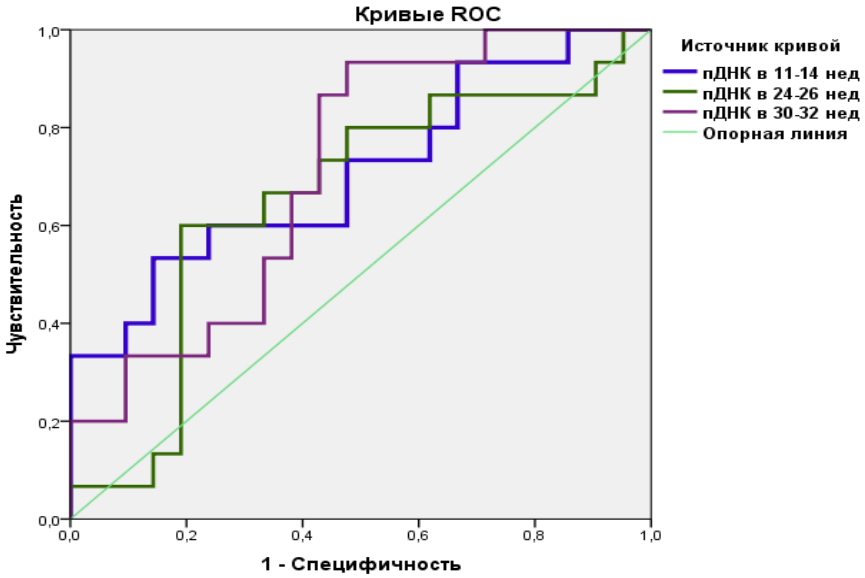

Рисунок 3.3.26. ROC-кривые пДНК в исследуемые сроки беременности

Построение прогностической модели

Использование метода множественной логистической регрессии с пошаговым исключением переменных по алгоритму Вальда позволило нам разработать прогностическую модель развития ПР на основе полученных данных внеклеточной ДНК и выявленных значимых факторов риска по формуле:

$$p = 1 / (1 + e^{-z}), \text{ где}$$

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 **(Рисунок 3.3.27)**.

Пороговая точка отсечки (cutoff) составила 0.99 при уровне чувствительности 63.2% и специфичности 100% **(p=0.006)**.

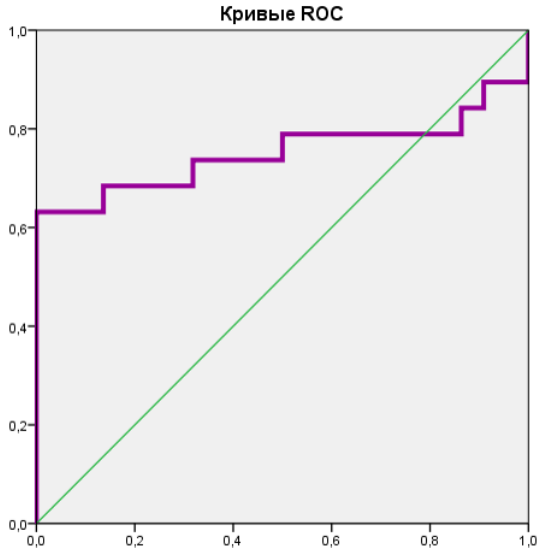

Рисунок 3.3.27. ROC-кривая, описывающая прогнозирование ПР на основании построенной модели

Таким образом, нами было выявлено, что мутации генов тромбофилии низкого риска, воспалительные заболевания органов малого таза, а также внутриматочные оперативные вмешательства с выскабливанием стенок полости матки, встречались чаще у женщин с ПР. Течение беременности достоверно чаще осложнялось угрозой прерывания и преждевременных родов в связи с чем большинство женщин из группы ПР принимали препараты, направленные на пролонгирование беременности. Зашивание шейки матки проведено у половины беременных в группе ПР. Длина шейки матки в первом триместре беременности имеет прогностическое значение в отношении необходимости последующей хирургической коррекции. ПИ сосудов, участвующих в маточно-плацентарном и плодово-плацентарном кровообращении, уменьшался с прогрессированием беременности, однако на сроке 11-14 недель значение ПИ МА было достоверно выше в группе ПР. У женщин с ПР достоверно чаще рождались мальчики, оценка состояния новорожденного по шкале Апгар была значимо меньше, необходимость

в переводе в ОРИТН больше. Уровень внеклеточной оДНК и мДНК при прогнозировании ПР обладает высокой чувствительностью и специфичностью в первой половине беременности, в то время как концентрация пДНК в 11-14 и 30-32 недели.

3.4. Сравнительный анализ внеклеточной ДНК у женщин с преэклампсией и преждевременными родами

Принимая во внимание полученные результаты, целесообразно провести сравнительный анализ содержания внеклеточной оДНК и ее фракций у женщин с преэклампсией и преждевременными родами.

Концентрация оДНК и мДНК была достоверно больше при ПР в 11-14 и 24-26 недель, при ПЭ на всех исследуемых сроках по сравнению с неосложненным течением беременности. Сравнительный анализ выявил значимые различия в уровне оДНК и мДНК при ПЭ и ПР во второй половине беременности. При ПЭ медиана концентрации оДНК составила 752.53 (555.97-3186.03) ГЕ/мл в 24-26 недель, 1917.09 (674.24-5901.21) ГЕ/мл в 30-32 недели и была достоверно больше, чем при ПР (медиана 486.52 (307.27-691.63) и 558.34 (343.57-1890.99) ГЕ/мл, соответственно) **(p=0.015** и **p=0.008) (Рисунок 3.4.1)**.

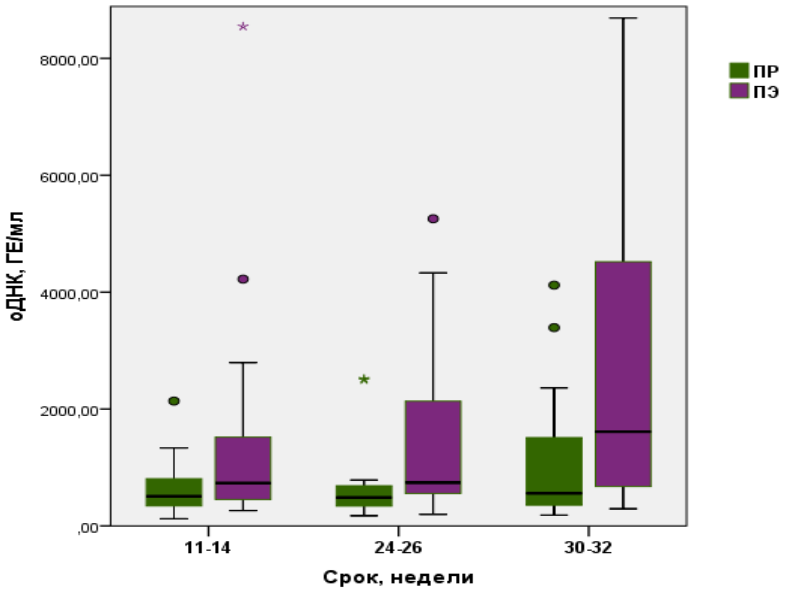

Рисунок 3.4.1. Концентрация оДНК в динамике беременности при ПЭ и ПР

Концентрация мДНК была достоверно больше при ПЭ по сравнению с ПР в 24-26 недель (медиана 718.44 (474.72-3021.68) против 469.76 (277.41-664.59) ГЕ/мл, **p=0.027**) и в 30-32 недели (медиана 1758.79 (646.37-5593.17) против 499.53 (286.68-1620.56) ГЕ/мл, **p=0.007**) **(Рисунок 3.4.2)**.

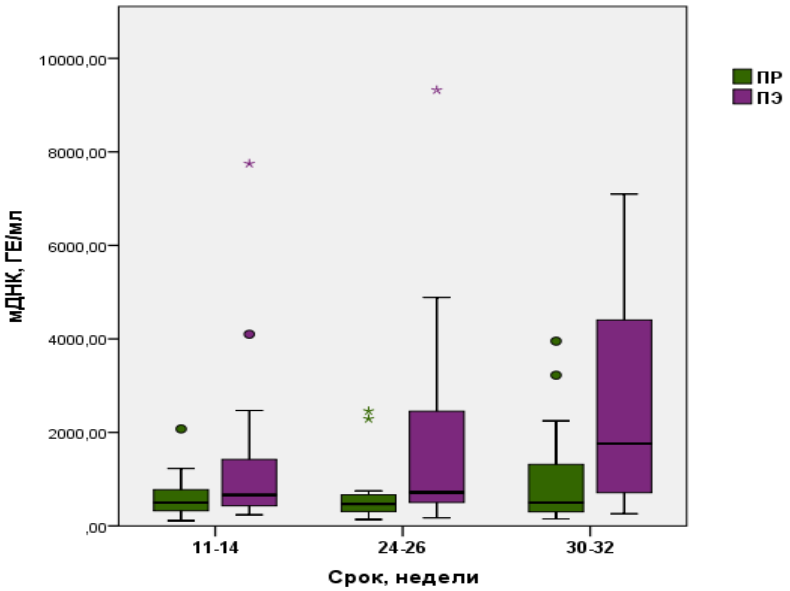

Рисунок 3.4.2. Концентрация мДНК в динамике беременности при ПЭ и ПР

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 исследуемых сроках. При сравнительном анализе выявлено, что уровень пДНК на всех исследуемых сроках выше при ПЭ, чем при ПР **(Таблица 3.4.1, рисунок 3.4.3)**.

Таблица 3.4.1. Сравнительный анализ концентрации пДНК при ПЭ и ПР

Срок	**ПЭ (n=20)**	**ПР (n=19)**	**p-value**
11-14 недель	54.85 (29.10-131.83)	22.76 (14.24-40.45)	**0.003**
24-26 недель	96.72 (35.11-251.39)	35.54 (24.43-39.46)	**0.004**
30-32 недели	158.30 (49.43-514.16)	49.11 (42.06-108.94)	**0.041**

*Данные представлены как медианы (интерквартильный интервал), ГЕ/мл

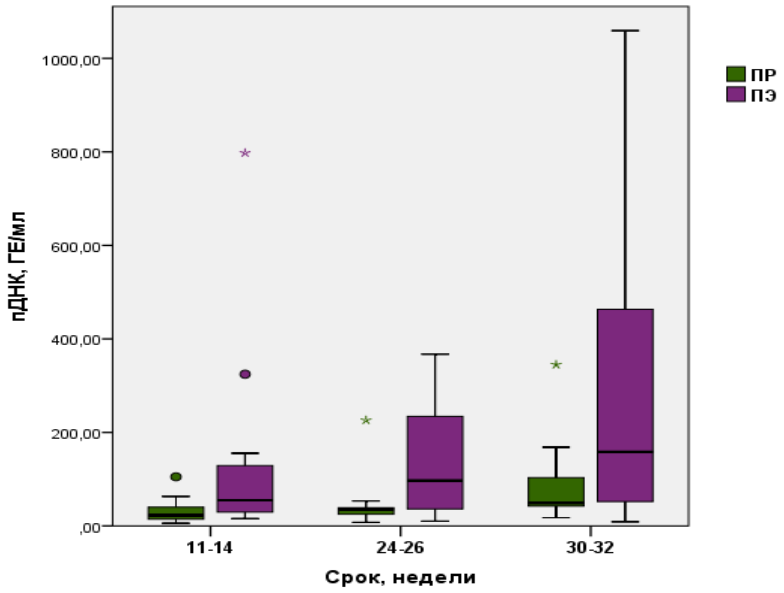

Рисунок 3.4.3. Концентрация пДНК в динамике беременности при ПЭ и ПР

Процентное содержание пДНК от оДНК не различалось при ПЭ и ПР от неосложненного течения беременности. Однако при сравнительном анализе выявлено, что в 11-14 недель пДНК/оДНК было значимо больше при ПЭ по сравнению с ПР (медиана 8.03% (5.00-11.50) и 4.33% (3.00-8.00), соответственно; **p=0.025) (Рисунок 3.4.4)**.

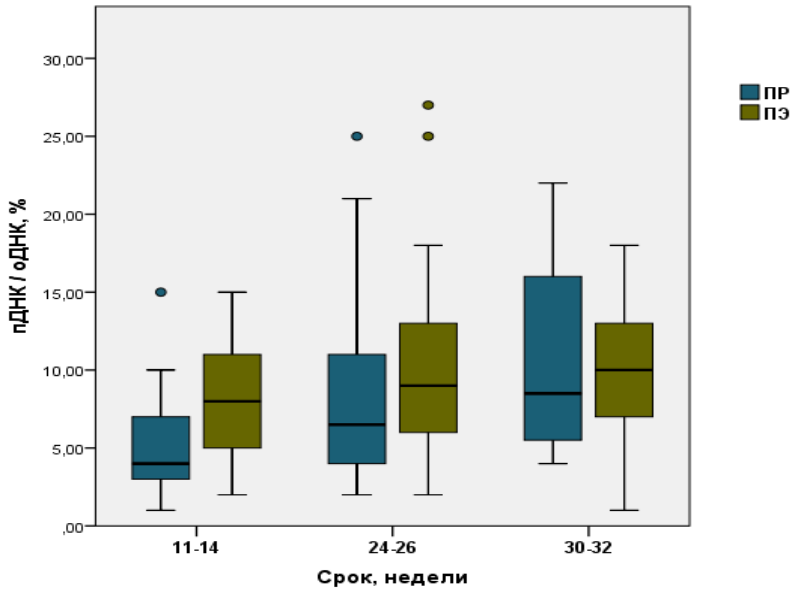

Рисунок 3.4.4. Процентное содержание пДНК от оДНК в динамике беременности при ПЭ и ПР

Таким образом, в первом триместре беременности концентрация оДНК и мДНК была значимо повышена при развитии ПЭ или ПР по сравнению с неосложненным течением гестации. В 24-26 недель также определялись высокие уровни оДНК и мДНК при развитии осложнений беременности, однако при ПЭ значения были достоверно выше, чем при ПР. В 30-32 недели только при развитии ПЭ уровни оДНК и мДНК значимо превышали норму.

Концентрация пДНК в 11-14 недель была достоверно больше при развитии ПЭ и ПР, однако при ПЭ уровень был значимо выше, чем при ПР. Далее достоверных различий в концентрации пДНК при развитии ПР по сравнению с неосложненным течением беременности не наблюдалось, в то время как при ПЭ уровень достоверно повышался на всех исследуемых сроках беременности.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

На протяжении нескольких лет в мировой литературе обсуждается роль внеклеточной пДНК в прогнозировании «больших акушерских синдромов», развитие которых связывают с плацентарной дисфункцией. Важным аспектом является понимание патофизиологических механизмов, приводящих к изменению уровней внеклеточных нуклеиновых кислот в материнской крови. Однако на сегодняшний день у исследователей нет однозначного мнения о характере изменений концентрации внеклеточной ДНК как при неосложненной беременности, так и развитии данных осложнений. Таким образом, на первом этапе является актуальным определение диапазона значений внеклеточной ДНК при неосложненном течении беременности с учетом изменений в организме женщины.

В данной работе вначале мы проанализировали концентрацию внеклеточной оДНК в динамике. Не было обнаружено существенных изменений концентрации в первой половине беременности, что коррелирует с данными других исследователей [126]. После 24-26 недель уровень оДНК значимо повышался. Нами найдена всего одна публикация, где авторы изучили концентрацию оДНК в динамике беременности, однако корреляции со сроком не обнаружили [28]. Так как концентрация внеклеточной оДНК меняется в соответствии с изменением ее фракций, необходим анализ уровня мДНК и пДНК.

В нашей работе концентрация мДНК, аналогично оДНК, была относительно стабильна до 24-26 недель, однако далее значимо повышалась с увеличением срока беременности. В работе Lo и соавторов (1998) мДНК определяли в 11-17 недель и в 37-43 недели [156]. Авторы заключили, что концентрация мДНК увеличивается со сроком гестации, предположительно вследствие уменьшения выведения внеклеточной ДНК в связи с физиологическими изменениями в организме беременной женщины [156]. Нами не найдено других исследований с анализом концентрации мДНК в динамике беременности.

Присутствие внеклеточных нуклеиновых кислот в крови здорового человека впервые продемонстрировали Mandel и Metais в 1948 г. При последующих

исследованиях было установлено, что их содержание меняется при определенных заболеваниях, таких как инфаркт миокарда, сахарный диабет, системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др., а также при онкологических заболеваниях, травме и стрессовом состоянии [192]. Продолжается изучение появления нуклеиновых кислот в крови как в условиях нормы, так и при патологии. На сегодняшний день известно несколько возможных патофизиологических механизмов, участвующих в реализации внеклеточной ДНК в крови: некроз, апоптоз и высвобождение из неповрежденных клеток (Зайцев, 2009), поступление в кровоток по завершению дифференцировки эритробластов (Lui, 2003), в процессе созревания тромбоцитов и эритроцитов (Tamkovich, 2008), в результате апоптоза макрофагов (Jiang, 2003) [3, 23, 115, 135]. В настоящее время существует множество доказательных опровержений концепции относительной иммунной супрессии во время беременности [195]. Известно, что материнская иммунная система функционально активна в течение гестации [130]. При неосложненном течении беременности степень оксидативного стресса положительно коррелирует со сроком, что указывает на важную роль оксида азота NO в адаптации сердечно-сосудистой системы женщины [136]. Следовательно, с прогрессированием гестации происходит повышение соотношения нейтрофилов к лимфоцитам вследствие усиления иммунного воспалительного ответа, что на наш взгляд объясняет увеличение концентрации мДНК во второй половине беременности.

Проведено небольшое количество исследований, где концентрация пДНК была определена в динамике. Мы обнаружили значимое увеличение уровня пДНК от 11-14 до 24-26 недель и далее в 30-32 недели. По данным Galbiati и соавторов (2005) концентрация пДНК также повышалась в динамике беременности [78]. При этом исследователями отмечен 2-х кратный прирост пДНК во втором и 9-ти кратный в третьем триместре беременности по сравнению с первым ($p<0.001$) [78]. Однако представленное исследование имеет ряд недостатков: пДНК была определена у разных женщин в течение беременности, использованный маркер пДНК (*SRY)* ограничивал выборку по полу плода, забор крови производили без четкого определения сроков гестации. Напротив, Zhao и соавторы (2010) путем

определения гиперметилированных *RASSF1A* генов не обнаружили значимого увеличения пДНК в первой половине беременности, что совпадает с данными Kim и соавторов (2013), а также Zhou и соавторов (2015) [28, 67, 157]. Недостатком данных исследований также является определение пДНК в динамике беременности у разных женщин.

Учитывая широкий диапазон значений внеклеточной оДНК и ее фракций у соматически неотягощенных женщин с неосложненным течением беременности, мы посчитали наиболее целесообразным определение процентного содержания пДНК от оДНК, которое составило 5.36%, 8.89% и 10.66% соответственно изученным срокам беременности ($p<0.05$). Полученные нами данные коррелируют с данными исследований, в которых определяли степень апоптоза плаценты в динамике беременности. Так, Smith и соавторы (1997) показали, что апоптоз плаценты наблюдается с ранних сроков и прогрессирует со сроком гестации ($p<0.01$) [173]. Таким образом, обнаруженная нами динамика концентрации пДНК отражает степень выраженности апоптотических изменений плаценты в течение беременности.

По данным Levine и соавторов (2004) концентрация пДНК остается низкой до третьего триместра беременности, далее увеличивается на 7.5 ГЕ/мл/нед [184]. Мы обнаружили повышение уровня пДНК в среднем на 1.47 и 2.34 ГЕ/мл/нед в первой и во второй половине беременности, соответственно. Различия в полученных данных могут быть обусловлены более жесткими критериями неосложненного течения гестации в нашем исследовании, а также ограничением сбора материала в начале третьего триместра беременности, а не его окончании.

Элиминация пДНК из материнской крови происходит в среднем в течение 2-х часов после родов и не обнаруживается спустя сутки, что характеризует отсутствие различий в концентрации пДНК у перво- и повторнородящих женщин в нашем исследовании [164].

Мы не обнаружили различий в уровне пДНК у женщин с различным полом плода, так как использованный нами маркер *RASSF1A* обладает высокой

чувствительностью и позволяет определить пДНК как у плодов мужского, так и женского пола.

В интервале 24-39 лет мы не обнаружили корреляции возраста женщины с концентрацией мДНК и пДНК, что совпадает с данными Wataganara и соавторов (2004) и Zhou и соавторов (2015), исследовавших пДНК у беременных 16-50 лет [67, 109]. Следовательно, увеличение уровня внеклеточной ДНК с возрастом женщины возможно в случае развития или прогрессирования соматической патологии.

Нет однозначного мнения среди исследователей относительно влияния ИМТ на концентрацию внеклеточной ДНК. В результате нашего исследования было выявлено, что уровень внеклеточной оДНК и фракций не коррелирует с ИМТ при нормальных его значениях. Таким образом, необходимо определять влияние ИМТ на внеклеточную ДНК только в наблюдениях с дефицитом массы тела или избыточным весом, а также у женщин с патологической прибавкой во время беременности.

Как известно, основным источником пДНК являются клетки трофобласта, что обусловило необходимость изучения корреляции пДНК с массой плаценты. Wataganara и соавторы (2005) измеряли массу плаценты с помощью 3-мерного ультразвукового исследования в первом триместре беременности и не обнаружили зависимости [140]. Нами также не обнаружено корреляции пДНК с массой плаценты после родов при неосложненном течении беременности. Следовательно, концентрация пДНК не зависит от массы плаценты при отсутствии патологических процессов, активирующих апоптоз клеток трофобласта.

При анализе концентрации пДНК и массы тела новорожденного нами не обнаружено статистически значимых зависимостей, что также подтверждает плацентарное происхождение данного маркера.

PAPP-A и b-ХГЧ, определение концентрации которых используют при проведении биохимического скрининга первого триместра беременности, продуцируются трофобластом. Их уровень отражает развитие плаценты и подвергается изменениям при нарушении плацентации или патологии плода [149].

При неосложненном течении беременности мы не обнаружили корреляции указанных маркеров с уровнем мДНК и пДНК в изученные сроки.

Несмотря на многочисленные исследования, ПЭ продолжает оставаться «болезнью теорий» с неясной этиологией. В настоящее время существуют подтвержденные данные, что ПЭ не является только осложнением беременности, а оказывает значительное влияние на здоровье женщины и ребенка в отдаленном периоде жизни [25, 27, 131]. За последние 15 лет большой прогресс произошел в понимании патогенеза данного заболевания, что необходимо для ранней диагностики и рациональных методов лечения [21, 22]. Однако известно, что наиболее эффективными являются профилактические мероприятия при их применении на ранних сроках беременности. Следовательно, необходима тщательная идентификация группы высокого риска.

Мы провели проспективное исследование 580 женщин с первого триместра беременности. ПЭ была диагностирована в 3.4% наблюдений, что коррелирует с мировыми данными [131]. Ранняя и поздняя ПЭ наблюдались у равного количества беременных, однако тяжелое течение выявлено у большего количества женщин с ранней ПЭ (50% и 20%). Накопленные данные свидетельствуют о различных механизмах развития ранней и поздней ПЭ. Предполагается, что ранняя ПЭ развивается вследствие нарушения плацентации и протекает менее благоприятно как для матери, так и для плода, в то время как поздняя ПЭ в основном связана с предрасполагающими материнскими факторами [116]. При изучении плаценты было выявлено, что при ранней ПЭ отмечается меньшая масса (менее 10 центиля), значительно большее количество патологических инфарктов, что характеризует больший процент тяжелого течения в данной группе женщин [30].

В литературе описано большое количество факторов риска развития ПЭ, основными из которых являются: возраст женщины, ПЭ в анамнезе, ХАГ, ГСД, заболевания почек, аутоиммунные заболевания, метаболические нарушения, многоплодная беременность, чрезмерная прибавка массы тела во время беременности [6]. Хронические заболевания почек, аутоиммунные заболевания и

многоплодная беременность явились критериями исключения из исследования ввиду отсутствия возможности адекватной оценки внеклеточной ДНК.

При анализе возрастного распределения статистически значимых различий между ПЭ и неосложненным течением беременности мы не обнаружили. В результате проведенных исследований было установлено, что риск развития ПЭ возрастает у женщин 40 лет и старше [117]. Следует отметить, что в нашем исследовании только одной пациентке в группе ПЭ было 45 лет, в остальных наблюдениях возраст пациенток в обеих группах не превышал 39 лет.

Как известно, ожирение является фактором риска ПЭ, при котором вероятность развития осложнения повышается в 2-3 раза [193]. При сравнительном анализе ИМТ мы обнаружили достоверно высокие значения в группе ПЭ, что свидетельствует о повышении риска развития ПЭ с увеличением ИМТ и коррелирует с данными других исследований [117, 193].

ПЭ в анамнезе была отмечена у 23 (3.9%) из 580 обследованных нами женщин, у 13.0% развилось осложнение повторно во время настоящей беременности **(p=0.013)**. Следовательно, наличие ПЭ в анамнезе пациентки является фактором риска развития осложнения при последующей беременности. По данным литературы у женщин с ПЭ в анамнезе риск развития ПЭ во время следующей беременности повышен в 7 раз [63]. ХАГ и отеки в третьем триместре беременности также достоверно чаще встречались в группе ПЭ.

Нами не было выявлено статистически значимых различий в паритете родов среди обследованных групп. Однако, как известно по данным литературы, ПЭ чаще встречается у первобеременных женщин ввиду развития иммунной толерантности к отцовским аллоантигенам после контакта с семенной жидкостью [150].

При анализе течения беременности у женщин с ПЭ первый триместр достоверно чаще осложнялся угрозой прерывания. Хорошо известно, что нарушение плацентации с последующей дисфункцией является непосредственной причиной не только развития «больших акушерских синдромов», но также позднего выкидыша и отслойки плаценты [19, 180].

Нами было отмечено, что в 35.0% наблюдений пациентки получали лечение НМГ ввиду наличия факторов риска развития плаценто-ассоциированных осложнений беременности. Существует предположение, что в нарушении имплантации и плацентации важную роль играют иммунологические факторы, а также микротромбозы в плацентарном ложе, тем самым назначение НМГ с целью улучшения реологических свойств крови, кровоснабжения плаценты и восстановления иммунологического баланса снижает риск развития осложнений, ассоциированных с плацентарной дисфункцией [119]. В ряде исследований продемонстрировано отсутствие эффективности профилактики НМГ плаценто-ассоциированных осложнений беременности [181]. В нашем исследовании применение НМГ во втором триместре достигло статистической значимости в группе ПЭ.

Обращает на себя внимание появление и прогрессирование симптомов ПЭ во втором триместре беременности: отеки наблюдались у 3-х женщин с развитием ранней ПЭ и 2-х с поздней манифестацией заболевания, повышение артериального давления зафиксировано в одном наблюдении с последующим развитием ранней ПЭ во втором триместре. В настоящее время отеки беременных не являются обязательным критерием для постановки диагноза ПЭ, однако в нашем исследовании к 30-32 неделям выявлены у 60.0% женщин с развитием ПЭ, что достоверно больше, чем в группе с неосложненным течением беременности [170]. Следовательно, появление и прогрессирование отеков беременных является настораживающим признаком. Протеинурия во всех наблюдениях с ПЭ выявлялась позже появления артериальной гипертензии, что может свидетельствовать о вторичном характере вовлечения почек.

Анализ данных АД в течение беременности выявил значимое повышение сАД к 30-32 неделям группе ПЭ и значительную разницу в сАД, дАД и срАД между группами на данном сроке, что связано с ранней манифестацией ПЭ у 5 женщин. По данным исследований с конца первого триместра беременности срАД достоверно больше у женщин с развитием ПЭ, однако нами не обнаружено значимых различий между группами [91]. При этом, в результате раздельного

анализа сАД и дАД авторы отмечают значимое различие в сАД у женщин с развитием ПЭ по сравнению с неосложненной беременностью на ранних сроках [151]. В нашем исследовании показатели исходного дАД, а также дАД в первом и втором триместрах беременности были значимо выше при ПЭ. Значение сАД указывает на напряжение между сердцем и сосудами в систолу, в то время как дАД на тонус сосудистых стенок. Повышение дАД свидетельствует о высокой сопротивляемости сосудистых стенок, нарушении проходимости, спазме. Следовательно, обнаруженное нами высокое значение дАД в группе ПЭ характеризует патогенетические изменения при развитии ПЭ.

Содержание b-ХГЧ и PAPP-A при проведении скрининга первого триместра беременности не различалось в группах. Ряд авторов обнаружили уменьшение концентрации b-ХГЧ и PAPP-A в связи со снижением их продукции плацентой у женщин с развитием ПЭ, однако в большинстве работ значимых различий не выявлено, что коррелирует с нашими данными [92, 152].

При неосложненном течении беременности происходит снижение сосудистого сопротивления начиная с ранних сроков до 24 недель, далее не меняется во второй половине беременности [75]. Нами обнаружена аналогичная динамика изменения среднего ПИ маточных артерий в контрольной группе и при развитии ПЭ. Однако, в 11-14 недель средний ПИ маточных артерий был достоверно выше в группе ПЭ, что коррелирует с данными литературы и связано с нарушением инвазии трофобласта, неполным ремоделированием спиральных артерий [153]. Cnossen и соавторы (2008) провели метаанализ исследований и заключили, что наибольшей прогностической значимостью обладает повышение ПИ маточных артерий во втором триместре беременности в группе как высокого, так и низкого риска развития ПЭ [197]. По данным Valino и соавторов (2016) ПИ в маточных артериях в 30-34 недели был достоверно выше у женщин с ПЭ и ЗРП [197]. Различие полученных результатов возможно обусловлено большим количеством тяжелого течения заболевания с ЗРП в представленных исследованиях. Описаны более высокие значения ПИ в артерии пуповины в группе ПЭ, что авторы также связали с нарушением плацентации и ремоделирования

сосудов [132]. Однако обнаруженные нами незначительные различия ПИ в артерии пуповины между группами на наш взгляд связаны с проведением допплерометрии в начале третьего триместра беременности и отсутствием манифестации ПЭ у большинства женщин на данном сроке. Показатели ПИ в средней мозговой артерии были выше в группе ПЭ, что свидетельствует об отсутствии централизации кровообращения плода, следовательно, гипоксии на данном сроке [132]. Таким образом, прогностически значимым в отношении осложнений беременности, ассоциированных с дисфункцией плаценты, является определение ПИ в маточных артериях в 11-14 недель гестации.

Срок родоразрешения при развитии ПЭ был достоверно меньше, количество ПР больше, что свидетельствует об отсутствии на сегодняшний день эффективного метода лечения ПЭ и значительном увеличении частоты ПР за счет развития ПЭ [131]. Частота операций кесарева сечения была значимо выше в группе ПЭ, при этом большинство женщин родоразрешены в экстренном порядке. Тем самым, при тяжелом течении и нарастании тяжести ПЭ предпочтительным способом родоразрешения является кесарево сечение. Обезболивание родов при ПЭ не различалось от неосложненного течения беременности, методом выбора также является регионарная анестезия. Мы не обнаружили значимых различий в массе и длине тела новорожденных между группами. Состояние новорожденных на 5 минуте после родов оценивалось как менее удовлетворительное у женщин с ПЭ, что указывает на снижение адаптационных возможностей детей к условиям внешней среды. По частоте поступления новорожденных в отделение реанимации различий не обнаружено, основной причиной явилась недоношенность.

Согласно основной патогенетической модели, существуют 2 стадии развития ПЭ: на первой стадии происходит снижение плацентарной перфузии, на второй – системная воспалительная реакция с нарушениями в клетках эндотелия, которые впоследствии обусловливают развитие гипертензии [104]. Вследствие нарушения кровоснабжения плаценты предполагается усиление апоптоза клеток трофобласта с повышением концентрации внеклеточной пДНК. Так как ПЭ представляет собой

сложный комплекс патофизиологических изменений с вовлечением материнской иммунной системы, необходимо изучение также внеклеточной мДНК.

На первом этапе мы оценили оДНК и обнаружили значимое изменение концентрации во второй половине беременности. При этом по сравнению с неосложненным течением беременности уровень оДНК был достоверно выше на всех исследуемых сроках, что характеризует изменение ее фракций – мДНК и/или пДНК.

Концентрация мДНК также значимо повышалась во второй половине беременности и была достоверно выше на всех исследуемых сроках при ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности. Как указано было ранее, при неосложненном течении беременности происходит повышение уровня активных форм кислорода, усиление иммунного воспалительного ответа с увеличением количества клеток крови, что определило повышение уровня мДНК во второй половине беременности в нашем исследовании. При развитии ПЭ нарушение инвазии трофобласта приводит к ишемии и повреждению клеток, которое сопровождается нарушением продукции ангиогенных и антиангиогенных факторов [154]. В результате происходит усиление системной воспалительной реакции, эндотелиальная активация, развитие оксидативного стресса с увеличением нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения [136]. Как известно, при увеличении количества клеток крови происходит увеличение концентрации внеклеточной мДНК. Данные патофизилогические процессы начинаются на ранних сроках беременности, когда в норме происходит плацентация (до 12 недель), что объясняет достоверно высокую концентрацию мДНК при ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности. На сегодняшний день в литературе нет данных об изучении внеклеточной мДНК в динамике беременности у женщин с развитием ПЭ.

Мы обнаружили достоверное повышение концентрации пДНК в 11-14 недель при ПЭ. Медиана пДНК при ПЭ в 4 раза превышала медиану при неосложненном течении беременности. Данные результаты подтверждают, что пДНК является маркером ишемии плаценты и развития ПЭ с ранних сроков беременности. Наши

выводы коррелируют с данными Sifakis и соавторов (2009), Illanes и соавторов, Papantoniou и соавторов (2013), изучавших пДНК на раннем сроке беременности различными методами [85, 111, 168]. На ранней стадии развития ПЭ происходит активация ангиогенеза и пролиферации трофобласта, что является компенсаторным механизмом в результате гипоксии и оксидативного стресса [133]. Мы обнаружили значимое уменьшение ПИ в маточных артериях и незначительное увеличение пДНК к 24-26 неделям беременности, что подтверждает данный механизм. Однако, ввиду ограниченности компенсаторных возможностей на более поздних сроках происходит срыв механизмов адаптации с усилением гипоксии, апоптоза и оксидативного стресса, что объясняет достоверное увеличение как концентрации пДНК, так и мДНК к 30-32 неделям беременности. При этом мы не обнаружили изменения соотношения пДНК к оДНК в динамике беременности, что также свидетельствует о повышении мДНК. Таким образом, обнаруженная нами динамика повышения уровня пДНК и мДНК характеризуется морфологическими изменениями плацентарной ткани и развитием иммунного воспалительного ответа в патогенезе ПЭ. Следовательно, высокая концентрация оДНК в ранних сроках беременности и значимое увеличение к 30-32 неделям при развитии ПЭ обусловлено увеличением концентрации как пДНК, так и мДНК.

При изучении внеклеточной ДНК в зависимости от срока манифестации ПЭ было выявлено, что при рПЭ концентрация пДНК достоверно увеличивалась в изученные сроки беременности, в то время как при пПЭ не менялась. Объяснением обнаруженной динамики является различие в степени прогрессирования апоптоза. В 30-32 недели уровень пДНК при рПЭ был достоверно выше, чем при поздней, что свидетельствует о значительном повышении концентрации непосредственно перед клинической манифестацией заболевания. Уровень мДНК не менялся в первой половине беременности при ранней и поздней ПЭ, однако далее значимо повышался и был достоверно выше в 30-32 недели при рПЭ. Согласно вышеизложенному механизму, перед появлением клинической симптоматики заболевания происходит усиление оксидативного стресса, продукция NO, дисфункция эндотелия, сопровождающаяся активацией иммунной системы,

увеличением количества клеток и, следовательно, мДНК, что и обнаружено при рПЭ.

Концентрация оДНК значимо увеличивалась в течение беременности и была достоверно выше при рПЭ, согласно изменениям ее фракций. Однако, следует отметить, что уровень оДНК, мДНК и пДНК был достоверно выше при ранней и поздней ПЭ по сравнению с неосложненным течением беременности начиная с 11-14 недель. Данное заключение является ключевым в понимании пусковых механизмов развития различных фенотипов ПЭ. На сегодняшний день считается, что в основе развития рПЭ находится дисфункция плаценты, а пПЭ – влияние материнских факторов на более поздних сроках беременности [36]. Ряд авторов изучили плаценты при рПЭ и пПЭ и обнаружили значительно больше патологических инфарктов рПЭ [30]. При этом их количество незначительно различалось при пПЭ и неосложненном течении беременности. Тем самым авторы заключили, что механизмы развития ранней и поздней ПЭ различны. Важно отметить, что на более поздних сроках при неосложненном течении беременности также усиливается апоптоз клеток трофобласта. Для определения различий в механизмах развития форм ПЭ необходимо изучение плаценты на ранних сроках беременности, что не представляется возможным. Следовательно, согласно полученным нами данным, можно заключить, что в основе развития как рПЭ, так и пПЭ лежит процесс нарушения плацентации, с последующим развитием плацентарной дисфункции различной степени.

При изучении внеклеточной ДНК в зависимости от тяжести течения ПЭ было выявлено, что при тПЭ концентрация пДНК достоверно увеличивалась в изученные сроки беременности, в то время как при уПЭ не менялась. Следует отметить, что 70% женщин в группе тПЭ имели раннюю манифестацию заболевания. При уПЭ и тПЭ концентрация пДНК была достоверно выше по сравнению с неосложненным течением беременности на всех исследуемых сроках. Мы не обнаружили значимого изменения мДНК в динамике беременности и различий при уПЭ и тПЭ. Однако концентрация мДНК при тПЭ достоверно превышала норму в первом и третьем триместрах, при уПЭ – на всех исследуемых

сроках. Уровень оДНК увеличивался незначительно при уПЭ и тПЭ, не различался в группах и достоверно превышал норму независимо от тяжести течения. Таким образом, на ранних сроках беременности концентрация пДНК была значимо выше при ПЭ по сравнению с неосложненным течением гестации независимо от срока манифестации заболевания и тяжести течения, что свидетельствует о высокой прогностической значимости данного маркера.

Проведенный нами ROC-анализ показал, что уровень оДНК, мДНК и пДНК без комбинирования с другими факторами риска обладает высокой чувствительностью и специфичностью в прогнозировании ПЭ, однако наибольшая специфичность выявлена у пДНК в 11-14 недель.

При определении корреляционной зависимости внеклеточной ДНК с другими параметрами было выявлено, что уровень мДНК на ранних сроках коррелировал с сАД в середине гестации. Как было указано выше, при развитии оксидативного стресса происходит усиление иммунного воспалительного ответа с увеличением количества клеток и мДНК. Следовательно, прямая зависимость между изменением концентрации мДНК и сАД отражает механизм развития оксидативного стресса. Чем выше АД, тем усиливается ишемия плаценты, апоптоз клеток, что объясняет взаимосвязь сАД с концентрацией пДНК.

Мы не обнаружили значимых различий в содержании b-ХГЧ между группами. Однако выявлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией внеклеточной ДНК и b-ХГЧ, что связано с нарушением плацентации.

Наиболее важным с клинической точки зрения явилось обнаружение обратной корреляции внеклеточной ДНК в 30-32 недели со сроком манифестации ПЭ, сроком родоразрешения, массой, длиной тела новорожденного. Тем самым, можно сделать вывод, что уровень внеклеточной ДНК на данном сроке характеризует степень тяжести развития ПЭ и необходимость в досрочном родоразрешении.

Выявлена зависимость между исходным ИМТ женщины и показателями АД, следовательно, с увеличением ИМТ повышается риск развития гипертензивных

осложнений во время беременности. Обратная зависимость между АД в 30-32 недели и сроком манифестации ПЭ обусловлена развитием клинической картины ПЭ у 5 женщин на данном сроке в нашем исследовании.

В результате прогрессирования тяжести ПЭ происходит увеличение степени повреждения почек, протеинурии [155]. Мы также обнаружили корреляцию максимальных значений АД со степенью протеинурии.

ПР по-прежнему являются основной причиной заболеваемости и смертности детей [12, 13]. Несмотря на углубленное изучение этиологии, механизмов развития, способов предотвращения и лечения, частота ПР остается высокой и колеблется в пределах 5-18% в разных странах [11, 20, 65]. В результате изучения многочисленных этиологических факторов Di Renzo и соавторы (2018) заключили, что результирующий механизм развития ПР един – активация воспалительного каскада [65].

Общая частота ПР в нашем исследовании составила 8.4%, что соответствует данным литературы, при этом в 5.3% наблюдений – это ПР со спонтанным развитием родовой деятельности при интактных оболочках и преждевременном разрыве плодных оболочек.

У подавляющего большинства женщин со спонтанным началом родовой деятельности в сроке недоношенной беременности ИМТ находился в пределах нормативных значений. По данным литературы ИМТ является фактором риска ПР при его низких значениях, то есть при нарушении питания и дефиците питательных веществ [105, 194].

Риск рецидива ПР варьирует от 15% до 50% по различным источникам и зависит от количества ПР в анамнезе и сроков беременности на момент родов. По нашим данным ПР в анамнезе имели 26.3% женщин из основной группы, однако не выявлено значимых различий с контрольной группой. Анализ экстрагенитальных заболеваний выявил значимо больше женщин в группе ПР с мутацией генов тромбофилии низкого риска. Наследственные тромбофилии являются фактором риска прерывания беременности и развития осложнений, таких как ПЭ, ПР, ЗРП, отслойка нормально расположенной плаценты, кровотечение,

антенатальная гибель плода [137]. Однако наиболее значимыми являются мутации генов тромбофилии высокого риска, такие как дефицит протеина C, S, антитромбина III, мутация фактора V Лейдена и протромбина. Обнаружение различий в мутации генов тромбофилии низкого риска в исследуемых группах скорее всего обусловлено отсутствием проведения данного исследования у женщин с неосложненным течением беременности ввиду неотягощенного анамнеза.

В группе ПР достоверно больше выявлено беременных с ВЗОМТ и внутриматочными оперативными вмешательствами с выскабливанием стенок полости матки. Как известно, дилатация шейки матки с проведением кюретажа в несколько раз повышают риск развития ПР [66].

Течение беременности у женщин с ПР достоверно чаще в первом триместре осложнялось угрозой прерывания, у более половины – признаками отслойки хориона, тем самым с самого начала беременности в данной группе имелись признаки высокого риска развития ПР [158].

В настоящее время дискутируется возможность прогнозирования ПР по длине шейки матки и динамике ее изменения [2]. Greco и соавторы (2011) изучили параметры шейки матки в 11-13 недель и заключили, что при комбинации ее длины с материнскими факторами возможно идентифицировать 55.0% беременных с ранними ПР [93]. Напротив, Ozdemir и соавторы (2005) не обнаружили значимости в определении длины шейки матки в 10-14 недель [198]. По данным авторов наиболее важным сроком для прогнозирования ПР является 20-24 недели [198]. Carvalho и соавторы (2003) отметили, что у женщин с ПР наиболее выражено укорочение длины шейки матки от первого ко второму триместру [43]. В то же время по данным других исследований длина шейки матки не является значимой в прогнозировании ПР [182]. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные неоднозначные. Мы определили длину шейки матки в 11-14, 18-21, 24-26, 30-32 недели и проанализировали динамику ее изменения. При неосложненном течении беременности отмечено незначимое укорочение шейки матки от 18-21 до 24-26 недель, далее увеличение ее длины к 30-32 неделям. При ПР отмечалось

уменьшение длины шейки матки с 18-21 недели, в том числе при наличии швов, на фоне приема гестагенов, препаратов, снижающих тонус матки. Однако по нашим данным изменение длины шейки матки было незначительным. При сравнительном анализе данных цервикометрии у женщин со швами на шейке матки и без было выявлено, что в 11-14 недель медиана длины шейки матки у женщин без швов была аналогичной неосложненному течению беременности, в то время как по сравнению с беременными при наличии швов – достоверно больше. Таким образом, при относительно короткой шейке матки при проведении скрининга первого триместра беременности повышается риск развития ИЦН и ПР.

Нами выявлено уменьшение среднего ПИ в маточных артериях в изученные сроки беременности у женщин с ПР, что способствует улучшению кровоснабжения матки аналогично неосложненному течению гестации [75]. Однако в 11-14 недель средний ПИ в маточных артериях достоверно превышал значение в контрольной группе, что, по нашему мнению, является следствием нарушения инвазии трофобласта [153].

Ранние ПР произошли в 21.1% наблюдений, медиана срока родов в группе ПР составила 254 дня (218 - 258 дней). По частоте кесарева сечения группы не различались, оперативное родоразрешение произведено по показаниям аналогичным при доношенной беременности. Следовательно, преждевременное начало родовой деятельности в сроках 218 – 258 дней не влияют на частоту кесарева сечения. По частоте и методе обезболивания родов группы не различались. При ПР также как при неосложненном течении беременности предпочтение отдается регионарным методам обезболивания.

Существует большое число исследований, в которых изучали роль пола плода в развитии осложнений беременности. Ghidini и соаторы (2005) обнаружили повышенную частоту воспалительных поражений тканей в области имплантации плаценты при мужском поле плода [96]. Более того, у женщин с ПР и плодом мужского пола концентрация провоспалительных цитокинов в крови была значимо больше [40]. Мы также обнаружили, что у женщин с ПР достоверно больше родилось мальчиков (78.9%).

Ввиду спонтанного начала родовой деятельности и отсутствия возможности полноценного проведения профилактики респираторного дистресс синдрома плода оценка состояния новорожденных по шкале Апгар на 1-й и 5-й минуте была достоверно меньше, а частота перевода в ОРИТН больше в группе ПР. Масса плаценты была значимо меньше в группе ПР, однако соответствовала сроку гестации.

При неосложненном течении беременности уровень оДНК и мДНК значимо повышался во второй половине беременности, согласно иммунологическим процессам в организме беременной, характерным для данного срока гестации. Однако в группе ПР значимого изменения концентрации оДНК и мДНК нами не обнаружено. Мы провели сравнительный анализ и выявили достоверное увеличение уровня оДНК и мДНК в 11-14 и 24-26 недель при ПР по сравнению с неосложненным течением беременности, что свидетельствует о наличии патологических процессов в первой половине беременности. Уровень пДНК не менялся в первой половине беременности, далее значимо повышался к 30-32 неделям. Напротив, при неосложненном течении беременности отмечено увеличение концентрации пДНК на всех исследуемых сроках. Однако при сравнительном анализе было выявлено, что концентрация пДНК в 11-14 недель была значимо повышена в группе ПР. Таким образом, уровень внеклеточной оДНК, мДНК и пДНК достоверно выше в первой половине беременности, преимущественно в 11-14 недель, у женщин с ПР. Так как пДНК попадает в кровоток матери вследствие апоптоза клеток трофобласта, то увеличение концентрации в 11-14 недель свидетельствует о повышенном разрушении клеток, которое приводит к активации иммунной системы матери с последующим увеличением количества клеток крови, мДНК. Полученные данные подтверждают роль нарушения плацентации в инициации ПР.

В 9 наблюдениях роды начались после преждевременного разрыва плодных оболочек. Следовательно, целесообразно было оценить уровень внеклеточной ДНК у женщин с ПРПО и без ПРПО раздельно. Мы не обнаружили значимых различий в концентрации оДНК и мДНК у женщин с ПРПО и без на всех исследуемых

сроках, а также в динамике беременности. По сравнению с неосложненным течением беременности достоверные различия обнаружены в 11-14 недель в обеих группах. Концентрация пДНК при ПР с ПРПО и без не различалась на всех исследуемых сроках. У женщин с ПР без ПРПО уровень пДНК увеличивался незначительно в динамике беременности, в то время как при ПРПО достоверно возрастал к 30-32 неделям, что возможно явилось следствием активации иммунологических механизмов.

Проведенный нами ROC-анализ показал, что уровень оДНК и мДНК обладает высокой чувствительностью и специфичностью при прогнозировании ПР в первой половине беременности и не информативен в 30-32 недели. По концентрации пДНК возможно прогнозировать развитие ПР в 11-14 и 30-32 недели беременности, однако для увеличения чувствительности и специфичности необходимо комбинирование с другими факторами риска.

Как известно, увеличение концентрации пДНК сопровождается повышением иммунного воспалительного ответа посредством стимуляции TLR9 [88]. Таким образом, при увеличении содержания пДНК повышается тонус миометрия, происходит укорочение шейки матки, что объясняет обнаруженную нами обратную корреляцию между пДНК и длиной шейки матки в 24-26 недель.

Исходный ИМТ женщин коррелировал с показателем срАД во время скрининга первого триместра беременности и ПИ в 24-26 недель, что свидетельствует о повышении риска развития плаценто-ассоциированных осложнений беременности при увеличении ИМТ. Более того, обнаружена обратная корреляция ИМТ с содержанием b-ХГЧ, что также ассоциировано с развитием дисфункции плаценты.

В результате сравнительного анализа внеклеточной ДНК при ПЭ и ПР нами были выявлены значимые различия. В 11-14 недель концентрация пДНК была значимо выше при ПЭ и ПР по сравнению с неосложненным течением беременности, однако уровень пДНК при ПЭ достоверно превышал значение пДНК при ПР. Следовательно, у женщин с развитием ПЭ более выражено нарушение инвазии хориона, что сопровождается более высокой интенсивностью

апоптоза клеток трофобласта по сравнению с ПР. У женщин с развитием ПЭ, в отличие от ПР, происходит прогрессирование апоптоза плаценты в течение беременности, что обусловливает значимые различия в уровне пДНК в 24-26 и 30-32 недели. В 11-14 недель концентрация оДНК и мДНК была значимо повышена и не различалась при ПЭ и ПР. Однако в 24-26 и 30-32 недели уровень как оДНК, так и мДНК был достоверно выше при ПЭ по сравнению с ПР, что связано с прогрессирование дисфункции плаценты и материнского иммунного воспалительного ответа.

Таким образом, процессы роста и запрограммированной гибели клеток являются основополагающими в развитии и поддержании гомеостаза в организме. Внеклеточная пДНК попадает в материнскую кровь вследствие апоптоза клеток трофобласта, следовательно, является маркером запрограммированного разрушения клеток плаценты при беременности. При неосложненном течении гестации концентрация внеклеточной пДНК достоверно увеличивается со сроком, что отражает данный механизм. Уровень внеклеточной мДНК значимо возрастает во второй половине беременности, отражая усиление оксидативного стресса и иммунного воспалительного ответа. Осложнения беременности, ассоциированные с дисфункцией плаценты, сопровождаются повышенным апоптозом клеток трофобласта, соответственно, увеличением концентрации внеклеточной пДНК в материнской крови. Так при ПЭ уровень пДНК достоверно превышает содержание при неосложненной беременности, начиная с ранних сроков. При этом увеличение содержания пДНК прогрессирует со сроком гестации и наиболее выражено при ранних и тяжелых формах ПЭ. Внеклеточная мДНК также повышена в течение беременности, значительно нарастает во второй ее половине, отражая характерное для ПЭ повышение уровня оксидативного стресса. Нарушение инвазии трофобласта, сопровождающееся повышенным апоптозом его клеток, в том числе, может приводить к преждевременному развитию родовой деятельности, что отражает значимое увеличение внеклеточной пДНК на ранних сроках гестации у женщин с ПР. Однако у женщин с ПЭ содержание пДНК превышает значение в

группе женщин с ПР на всех сроках, мДНК – во второй половине беременности, что свидетельствует о более тяжелой степени плацентарной дисфункции и оксидативного стресса при ПЭ. Полученные нами данные внеклеточной ДНК и выявленные факторы риска позволили построить прогностические модели ПЭ и ПР, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью в 11-14 недель беременности.

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 СОКРАЩЕНИЙ

АБ	антибактериальные препараты
АД	артериальное давление
АЛТ	аланинаминотрансфераза
АП	артерия пуповины
АСТ	аспартатаминотрансфераза
АФП	альфа-фетопротеин
ВЗОМТ	воспалительные заболевания органов малого таза
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ГАГ	гестационная артериальная гипертензия
ГСД	гестационный сахарный диабет
дАД	диастолическое артериальное давление
ЗРП	задержка роста плода
ИМТ	индекс массы тела
ИЦН	истмико-цервикальная недостаточность
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
МА	маточные артерии
мДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота матери
НМГ	низкомолекулярные гепарины
оДНК	общая дезоксирибонуклеиновая кислота
ОРИТН	отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных
пДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота плода
ПИ	пульсационный индекс
ПМК	пролапс митрального клапана
ПР	преждевременные роды
ПРПО	преждевременный разрыв плодных оболочек
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭ	преэклампсия
пПЭ	поздняя преэклампсия

рПЭ	ранняя преэклампсия
сАД	систолическое артериальное давление
срАД	среднее артериальное давление
СД	сахарный диабет
СМА	средняя мозговая артерия
СПКЯ	синдром поликистозных яичников
СЦТ	синцитиотрофобласт
тПЭ	тяжелая преэклампсия
уПЭ	умеренная преэклампсия
ХАГ	хроническая артериальная гипертензия
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека
PAPP-A	плазменный белок-А, ассоциированный с беременностью
PLGF	плацентарный фактор роста
PP-13	плацентарный белок 13
sEng	растворимый эндоглобин
sFlt-1	растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апоптоз в плаценте при преэклампсии / П.А. Ховхаева [и др.] // Медицинский совет. - 2016. - № 2. - С. 102-104.

2. Белоцерковцева Л.Д., Коваленко Л.В., Мирзоева Г.Т. Факторы риска формирования истмико-цервикальной недостаточности, приводящие к преждевременным родам // Вестник Сургу. Медицина. - 2014. - № 2 (20). - С. 26-30.

3. Внеклеточные нуклеиновые кислоты: происхождение и функции. Миниобзор / Л.Е. Муравлева [и др.] // Биологические науки. - 2010. - № 2. - С. 15-20.

4. Гистологические изменения плаценты и васкуляризация ее ворсин при ранней и поздней преэклампсии / А.И. Щеголев [и др.] // Архив патологии. - 2016. - № 1. - С. 13-18.

5. Грачева М.И., Кан Н.Е., Красный А.М. Роль внеклеточной фетальной ДНК в ранней диагностике осложнений беременности // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 10. - С. 5-11.

6. Клинико-анамнестические факторы риска развития преэклампсии у беременных / Н.Е. Кан [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 6. - С. 39-45.

7. Клиническое значение изменений трансмиграционной активности лейкоцитов в диагностике тяжелой преэклампсии / И.А. Панова [и др.] // Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга. - 2018. - № 8. - С. 77-84.

8. Наследственные факторы риска развития преэклампсии / И.Н. Фетисова [и др.] // Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга. - 2018. - № 2. - С. 18-18а.

9. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом секвенирования внеклеточной ДНК. Современный взгляд на проблему / Н.К. Тетруашвили [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 10. - С. 4-7.

10. Новые подходы к проведению пренатального скрининга хромосомной патологии: ДНК-скрининг по крови матери / Г.Т. Сухих [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 8. - С. 72-78.

11. Очень ранние преждевременные роды: современный подход / О.Ф. Серова [и др.] // Эффективная фармакотерапия. - 2014. - № 38. - С. 4-9.

12. Плацентарное ложе и преэклампсия / З.С. Ходжаева [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2013. - № 12. - С. 10-15.

13. Поиск новых маркеров преэклампсии / К.Т. Муминова [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 7. - С. 41-45.

14. Преждевременные роды: есть ли перспективы? / В.Е. Радзинский [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2015. - № 2. - С. 99-103.

15. Преждевременные роды, как важнейшая проблема современного акушерства / Г.М. Савельева [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 8-2. - С. 4-10.

16. Преждевременные роды как основная причина перинатальной заболеваемости и смертности / Г.М. Савельева [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2015. - № 2. - С. 70-73.

17. Преэклампсия сегодня: патогенез и возможности прогнозирования и лечения / А.Н. Стрижаков [и др.] // Вопросы гинекология, акушерства и перинатологии. - 2016. - № 3. - С. 24-31.

18. Свободная эмбриональная ДНК в прогнозировании исхода беременности при акушерской патологии / Н.Г. Парсаданян [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 6. - С. 10-13.

19. Свободная эмбриональная ДНК в плазме крови как предиктор самопроизвольных потерь беременности у женщин с привычным выкидышем / Н.И. Федорова [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 6. - С. 9-14.

20. Серов В.Н., Сухорукова О.И. Преждевременные роды – диагностика и терапия // Медицинский совет. - 2014. - № 9. - С. 50-53.

21. Сидорова И.С., Никитина Н.А. Научно обоснованная система прогнозирования преэклампсии // Акушерство и гинекология. - 2017. - № 3. - С. 55-61.

22. Скрининг ранней преэклампсии в I триместре беременности на основе комбинированной оценки материнского сывороточного плацентарного фактора роста и допплерометрии маточных артерий / А.М. Холин [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2015. - № 5. - С. 42-48.

23. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике // Молекулярная биология. - 2008. - № 1. - С. 12-23.

24. Тест ActimTMPartus в диагностике угрозы преждевременных родов / Р.И. Шалина [и др.] // Вопросы гинекология, акушерства и перинатологии. - 2007. - № 2. - С. 14-18.

25. Тяжелая преэклампсия и эклампсия – критические состояния для матери и плода / И.С. Сидорова [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2013. - № 12. - С. 34-40.

26. Уровень свободной эмбриональной ДНК при угрожающем, привычном выкидыше и неосложненном течении беременности в сроках до 22 недель / Н.Г. Парсаданян [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2015. - № 2. - С. 33-38.

27. Ходжаева З.С., Холин А.М., Вихляева Е.М. Ранняя и поздняя преэклампсия: парадигмы патобиологии и клиническая практика // Акушерство и гинекология. - 2013. - № 10. - С. 4-11.

28. Association of fetal-derived hypermethylated RASSF1A concentration in placenta-mediated pregnancy complications / M.J. Kim [et al.] // Placenta. - 2013. - Vol. 34 № 1. - P. 57–61.

29. Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody / P.M. Chiu [et al.] // Histopathology. - 2001. - Vol. 38 № 3. - P. 243–249.

30. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease — what does the placenta reveal? J.L. van der Merwe [et al.] // Hypertens. Pregnancy. - 2010. - Vol. 29 № 4. - P. 457–467.

31. Alfirevic Z., Stampalija T., Medley N. Fetal and umbilical Doppler ultrasound in normal pregnancy // Cochrane Database. - 2015. - Vol. 15 № 4.

32. Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in first-trimester decidua / T. Morgan [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 1999. - Vol. 180 № 1. - P. 95–102.

33. Absolute first trimester cell-free DNA levels and their associations with adverse

pregnancy outcomes / F.F. Thurik [et al.] // Prenat. Diagn. - 2016. - Vol. 36 № 12. - P. 1104-1111.

34. Assessment of plasma cell-free fetal DNA using hypermethylated RASSF1A in maternal plasma in cases of spontaneous preterm labor / W. El-Garf [et al.] // Medical Research Journal. - 2013. - Vol. 12 № 2. - P. 49-51.

35. Accuracy of circulating placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in the prediction of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis / C.E. Kleinrouweler [et al.] // BJOG. - 2012. - Vol. 119 № 7. - P. 778-787.

36. An analysis of the differences between early and late preeclampsia with severe hypertension / X.L. Li [et al.] // Pregnancy Hypertens. - 2016. - Vol. 6 № 1. - P. 47-52.

37. Bianchi D.W. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis // British Journal of Haemotology. - 1999. - Vol. 105 № 3. - P. 574–583.

38. Bianchi D.W., LeShane E.S., Cowan J.M. Large amounts of cell-free Fetal DNA are present in amniotic fluid // Clinical Chemistry. - 2001. - Vol. 47 № 10. - P. 1867–1869.

39. Bianchi D.W. Circulating fetal DNA : Its origin and diagnostic potential — a review // Placenta. - 2004. -Vol. 18 № 25. - P. 93–101.

40. Brettell R., Yeh P.S., Impey L.W. Examination of the association between male gender and preterm delivery // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2008. – Vol. 141 № 2. – P. 123-126.

41. Comparison of activin A and cell-free fetal DNA levels in maternal plasma from patients at high risk for preeclampsia / C.H. Diesch [et al.] // Prenat. Diagn. - 2006. - Vol. 26 № 13. - P. 1267-1270.

42. Can detection of late-onset PE at triage by sflt-1 or PlGF be improved by the use of additional biomarkers? / I. Kaufmann [et al.] // Prenat. Diagn. - 2012. - Vol. 32 № 13. - P. 1288-1294.

43. Cervical length at 11-14 weeks' and 22-24 weeks' gestation evaluated by transvaginal sonography, and gestational age at delivery / M.H. Carvalho [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2003. - Vol. 21 № 2. - P. 135-139.

44. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination

of pregnancy / T. Wataganara [et al.] // Fertil. Steril. - 2004. - Vol. 81 № 3. - P. 638–644.
45. Cell-free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF / P.D. Pan [et al.] // Hum. Reprod. - 2005. - Vol. 20 № 11. - P. 3152–3156.
46. Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis / O. Samura [et al.] // Clin. Chem. - 2003. - Vol. 49 № 7. - P. 1193–1195.
47. Cell-free fetal DNA in maternal circulation after chorionic villous sampling / M. Di Tommaso [et al.] // Prenat. Diagn - 2013. - Vol. 33 № 7. - P. 695–699.
48. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding / A. Yin [et al.] // Hum. Reprod. - 2007. - Vol. 22 № 6. - P. 1736–1743.
49. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia / R.J. Levine [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2004. - Vol. 350 № 7. - P. 672–683.
50. Chau K., Hennessy A., Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia // J. Hum. Hypertens. - 2017. - Vol. 31 № 12. - P. 782–786.
51. Chan R.L. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women // Clin. Perinatol. - 2014. - Vol. 2014. - P. 1–8.
52. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction / A. Sekizawa [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2003. - Vol. 188 № 2. - P. 480–484.
53. Circulating maternal total cell-free DNA , cell-free fetal DNA and soluble endoglin levels in preeclampsia : predictors of adverse fetal outcome? / R.M. AbdelHalim [et al.] // Mol. Diagn. Ther. - 2016. - Vol. 20 № 2. - P. 135-149.
54. Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies / W. Stein [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. - 2013. - Vol. 166 № 1. - P. 10-13.
55. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies / M. Smid [et al.] // Prenat. Diagn. - 2006. - Vol. 26 № 9. - P. 785-790.
56. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor / I. Hoesli [et al.] // Science. - 2002. - Vol. 100 № 5. - P. 992-996.
57. Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth / L. Dugoff [et al.] // Am. J. Obstet.

Gynecol. - 2016. - Vol. 215 № 2. - P. 231.e1-e7.

58. Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of women during the peripartum period / R.M. Angert [et al.] // American Journal of Obstetrics and Gynecology. - 2004. Vol. 190 № 4. - P. 1087–1090.

59. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report / E. Flori [et al.] // Hum. Reprod. - 2004. - Vol. 19 № 3. - P. 723–724.

60. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia / X.Y. Zhong [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2001. - № 945. - P. 138-140.

61. Detection of fetal DNA in the peritoneal cavity during pregnancy / R. Cioni [et al.] // European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. - 2003. Vol. 107 № 2. - P. 210–211.

62. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia // Semin. Perinatol. - 2009. - Vol. 33 № 3. - P. 130–137.

63. Ditisheim A., Sibai B.M. Diagnosis and management of HELLP syndrome complicated by liver hematoma // Clin. Obstet. Gynecol. - 2017. - Vol. 60 № 1. - P. 190–197.

64. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies // BMJ. - 2005. - Vol. 330 № 7491. - P. 565.

65. Di Renzo G.C., Tosto V., Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. - 2018. P. 1-10.

66. Dilatation and curettage increases the risk of subsequent preterm birth: a systematic review and meta-analysis / M. Lemmers [et al.] // Hum. Reprod. - 2016. - Vol. 31 № 1. - P. 34-45.

67. Effects of maternal and fetal characteristics on cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma / Y. Zhou [et al.] // Reprod. Sci. - 2015. - Vol. 22 № 11. - P. 1429–1435.

68. Elevated plasma levels of hypermethylated RASSF1A gene sequences in pregnant women with Intrahepatic cholestasis / P. Yi [et al.] // Cell Biochem. Biophys. - 2013. - Vol. 67 № 3. - P. 977–981.

69. Epidemiology and causes of preterm birth / R.L. Goldenberg [et al.] // Lancet. - 2008.

- Vol. 371 № 9606. - P. 75–84.

70. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia / X.Y. Zhong [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2001. - Vol. 184 № 3. - P. 414–419.

71. Early prediction of hypertensive disorders of pregnancy using cell-free fetal DNA, cell-free total DNA, and biochemical markers / S.Y. Kim [et al.] // Fetal Diagn. Ther. - 2016. - Vol. 40 № 4. - P. 255-262.

72. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: a systematic review and meta-analysis / S. Roberge [et al.] // Fetal. Diagn. Ther. - 2012. - Vol. 31 № 3. - P. 141-146.

73. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth / G.C. Smith [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2002. - Vol. 87 № 4. - P. 1762-1767.

74. Evaluation of fetal hypermethylated RASSF1A in pre-eclampsia and its relationship with placental protein-13, pregnancy associated plasma protein-A and urine protein / S. Saraswathy [et al.] // Pregnancy Hypertens. - 2016. - Vol. 6 № 4. - P. 306-312

75. Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review / S. Kuc [et al.] // Obstet. Gynecol. Surv. - 2011. - Vol. 66 № 4. - P. 225-239.

76. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women / K. Koide [et al.] // Prenatal diagnosis. - 2005. № 25. - P. 604–607.

77. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast / M. Alberry [et al.] // Prenatal Diagnosis. - 2007. - Vol. 27 № 5. - P. 415–418.

78. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation / S. Galbiati [et al.] // Hum Genet. - 2005. - Vol. 117 № 2-3. - P. 243–248.

79. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics / G. Ashoor [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2013. - Vol. 41 № 1. - P. 26–32.

80. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their

implications for noninvasive prenatal testing / S.L. Kinnings [et al.] // Prenat. Diagn. - 2015. - Vol. 35 № 8. - P. 816–822.

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

82. Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies / M. Smid [et al.] // Clin. Chem. - 2003. - Vol. 49 № 9. - P. 1526–1528.

83. Frequent apoptosis in placental villi from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and without maternal symptoms / H. Endo [et al.] // Int. J. Mol. Med. - 2005. - Vol. 16 № 1. - P. 79–84.

84. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes / Y.M. Kim [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2003. - Vol. 189 № 4. - P. 1063–1069.

85. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia / S. Sifakis [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2009. - Vol. 201 № 5. - P. 472.e1-7.

86. Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia . A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients / A. Farina [et al.] // Prenat. Diagn. - 2004. - Vol. 24 № 2. - P. 83-86.

87. Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia / A. Crowley [et al.] // Transfusion. - 2007. - № 27. - P. 174-179.

88. Fetal and placental DNA stimulation of TLR9: a mechanism possibly contributing to the pro-inflammatory events during parturition / I.T. Goldfarb [et al.] // Reprod. Sci. - 2018. - Vol. 25 № 5. - P. 788-796.

89. Free fetal DNA levels in patients at risk of preterm labour / S. Illanes [et al.] // Prenat. Diagn. - 2011. - Vol. 31 № 11. - P. 1082-1085.

90. First-trimester uterine artery Doppler and spontaneous preterm delivery Soares / S.C. Soares [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2007. - Vol. 29 № 2. - P. 146-149.

91. First trimester prediction of preeclampsia / U.D. Anderson [et al.] // Curr. Hypertens. Rep. - 2015. - Vol. 17 № 9. - P. 584.

92. First trimester screening for early and late preeclampsia based on maternal

characteristics, biophysical parameters, and angiogenic factors / F. Crovetto [et al.] // Prenat. Diagn. - 2015. - Vol. 35 № 2. - P. 183-191.

93. First-trimester screening for spontaneous preterm delivery with maternal characteristics and cervical length / E. Greco [et al.] // Fetal Diagn. Ther. - 2012. - Vol. 31 № 3. - P. 154-161.

94. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma / E. Wang [et al.] // Prenat. Diagn. - 2013. - Vol. 33 № 7. - P. 662–666.

95. Goldenberg R.L., Hauth J.C., Andrews W.W. Intrauterine infection and preterm delivery // N. Engl. J. Med. - 2000. - Vol. 342 № 20. - P. 1500–1507.

96. Ghidini A., Salafia C.M. Gender differences of placental dysfunction in severe prematurity // BJOG. - 2005. - Vol. 112 № 2. - P. 140-144.

97. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report / X.Y. Zhong [et al.] // Prenat. Diagn. - 2000. - Vol. 20 № 10. - P. 838–841.

98. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum / D.W. Swinkels [et al.] // Clin. Chem. - 2002. - Vol. 48 № 4. - P. 650-653.

99. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis / K.C. Chan [et al.] // Clin. Chem. - 2006. - Vol. 52 № 12. - P. 2211-2218.

100. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery / A. Farina [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2005. - Vol. 193 № 2. - P. 421-425.

101. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery / T.R. Jakobsen [et al.] // Prenat. Diagn. - 2012. - Vol. 32 № 9. - P. 840-845.

102. Harrington K. Early screening for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2011. - Vol. 37 № 5. - P. 623–624.

103. Hypertension in pregnancy: changes in activin A maternal serum concentration / F. Petraglia [et al.] // Placenta. - 1995. - Vol. 16 № 5. - P. 447-454.

104. Hartley J.D., Ferguson B.J., Moffett A. The role of shed placental DNA in the systemic inflammatory syndrome of preeclampsia // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2015. - Vol. 213 № 3. - P. 268-277.

105. Hermesch A.C., Allshouse A.A., Heyborne K.D. Body mass index and the spontaneous onset of parturition // Obstet. Gynecol. - 2016. - Vol. 128 № 5. - P. 1033-1038.

106. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood / D.W. Bianchi [et al.] // Proc. Natl. Sci. USA. - 1990. - Vol. 87 № 9. - P. 3279–3283.

107. Illanes S., Avent N., Soothill P.W. Cell-free fetal DNA in maternal plasma: an important advance to link fetal genetics to obstetric ultrasound // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2005. - Vol. 25 № 4. - P. 317-322.

108. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women / M. Haghiac [et al.] // Obesity. - 2012. - Vol. 20 № 11. - P. 2213–2219.

109. Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels / T. Wataganara [et al.] // Obstet. Gynecol. - 2004. - Vol. 104 № 3. - P. 545–550.

110. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. N. Ishihara [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2002. - Vol. 186 № 1. - P. 158–166.

111. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction / S. Illanes [et al.] // Prenat. Diagn. - 2009. - Vol. 29 № 12. - P. 1118-1122.

112. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia / T.N. Leung [et al.] // Clin. Chem. - 2001. - Vol. 47 № 1. - P. 137-139.

113. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia / A.M. Cotter [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2004. - Vol. 191 № 2. - P. 515-520.

114. Identifying mild and severe preeclampsia in asymptomatic pregnant women by

levels of cell-free fetal DNA / T.R. Jakobsen [et al.] // Transfusion. - 2013. - Vol. 53 № 9. - P. 1956-1964.

115. Jiang N., Reich C.F. 3rd, Pisetsky D.S. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells // Blood. - 2003. - Vol. 102 № 6. - P. 2243–2250.

116. Jim B., Karumanchi S.A. Preeclampsia: pathogenesis, prevention, and long-term complications // Semin. Nephrol. - 2017. - Vol. 37 № 4. - P. 386–397.

117. Jeyabalan A. Epidemiology of preelampsia: impact of obesity // Nutr. Rev. - 2013. - Vol. 71 № 1. - P. 18–25.

118. Khalil A.A., Cooper D.J., Harrington K.F. Pulse wave analysis: a preliminary study of a novel technique for the prediction of pre-eclampsia // BJOG. - 2009. - Vol. 116 № 2. - P. 268-276.

119. Low-molecular-weight heparin for prevention of placenta-mediated pregnancy complications: protocol for a systematic review and individual patient data meta-analysis (AFFIRM) / M.A. Rodger [et al.] // Syst. Rev. - 2014. - № 3. - P. 69.

120. Maternal hemoglobin concentration and hematocrit values may affect fetus development by influencing placental angiogenesis / A. Stangret [et al.] // J. Matern. Fetal Neonatal. Med. - 2017. - Vol. 30 № 2. - P. 100–204.

121. Mutter W.P., Karumanchi S.A. Molecular mechanisms of preeclampsia // Microvasc. Res. - 2008. - Vol. 75 № 1. - P. 1–8.

122. Morgan T.K. Role of the placenta in preterm birth : a review // Am. J.Perinatol. - 2016. - Vol. 33 № 3. - P. 258–266

123. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients / X.Q. Chen [et al.] // Nature medicine. - 1996. - Vol. 2 № 9. - P. 1033–1035.

124. Manokhina I., Singh T.K., Robinson W.P. Cell-free placental DNA in maternal plasma in relation to placental health and function // Fetal Diagn. Ther. - 2017. - Vol. 41 № 4. - P. 258–264.

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

126. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia / D.L. Rolnik [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2015. - Vol. 45 № 1. - P. 106-111.

127. Maternal placental vasculopathy and infection: two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm ruptured membranes / F. Arias [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 1993. - Vol. 168 № 2. - P. 585-591.

128. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour / T.N. Leung [et al.] // Lancet. - 1998. - Vol. 352 № 9144. - P. 1904-1905.

129. Maternal serum placental growth factor (PlGF) in small for gestational age pregnancy at 11 (+ 0) to 13 (+ 6) weeks of gestation / L.C. Poon [et al.] // Prenat. Diagn. - 2008. - Vol. 28 № 12. - P. 1110-1115.

130. Mor G., Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity // Am. J. Reprod. Immunol. - 2010. - Vol. 63 № 6. - P. 425–433.

131. Maternal pre-eclampsia and long-term offspring health: is there a shadow cast? / S.M. Goffin [et al.] // Pregnancy Hypertens. - 2018. - № 12. - P. 11-15.

132. Marsal K. Physiological adaptation of the growth-restricted fetus // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. - 2018. - № 49. - P. 37-52.

133. Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia / C.S. Roland [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. - 2016. - Vol. 73 № 2. - P. 365-376.

134. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes / Z. Sultana [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2017. - Vol. 77 № 5. - P. 1–10.

135. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation / Y.Y. Lui [et al.] // Clin. Chem. - 2003. - Vol. 49 № 3. - P. 495-496.

136. Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study / D. Mannaerts [et al.] // BMC Pregnancy Childbirth. - 2018. - Vol. 18 № 1. - P. 60.

137. Obstetric outcomes of recurrent pregnancy loss patients diagnosed wıth inherited thrombophilia / C. Karadag [et al.] // Ir. J. Med. Sci. - 2017. - Vol. 186 № 3. - P. 707-713.

138. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum / Y.M.D. Lo [et al.] // Lancet.

- 1997. - Vol. 16 № 350(9076). - P. 485–487.

139. Persistent elevation of cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after selective laser coagulation of chorionic plate anastomoses in severe midgestational twin-twin transfusion syndrome / T. Wataganara [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2005. - Vol. 192 № 2. - P. 604–609.

140. Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA / T. Wataganara [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2005. - Vol. 193 № 2. - P. 496–500.

141. Placental aging and oxidation damage in a tissue micro-array model : an immunohistochemistry study / A.P. Londero [et al.] // Histochem. Cell Biol. - 2016. - Vol. 146 № 2. - P. 191–204.

142. Placental apoptosis in health and disease / A.N. Sharp [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2010. - Vol. 64 № 3. - P. 159–169.

143. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth / F.F. Tu [et al.] // Obstet. Gynecol. - 1998. - Vol. 92 № 3. - P. 446–449.

144. Placental blood flow and the risk of preterm delivery / V.K. Misra [et al.] // Placenta. - 2009. - Vol. 30 № 7. - P. 619–624.

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

146. Phillippe M. Cell-free fetal DNA — a trigger for parturition // N. Engl. J. Med. - 2014. - Vol. 370 № 26. - P. 2534–2536.

147. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis / E. Bujold [et al.] // Anesthesiology and pain management. - 2010. - № 116. - P. 402-414.

148. Papageorghiou A.T., Yu C.K., Nicolaides K.H. The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. - 2004. - Vol. 18 № 3. - P. 383–396.

149. Park H.J., Shim S.S., Cha D.H. Combined screening for early detection of pre-eclampsia // Int. J. Mol. Sci. - 2015. - Vol. 16 № 8. - P. 17952–17974.

150. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology / T.

Chaiworapongsa [et al.] // Nat. Rev. Nephrol. - 2014. - Vol. 10 № 8. - P. 466-480.

151. Pears S., Makris A., Hennessy A. The chronobiology of blood pressure in pregnancy // Pregnancy Hypertens. - 2018. - № 12. - P. 104-109.

152. Performance of first trimester biochemical markers and mean arterial pressure in prediction of early-onset pre-eclampsia / J. Nevalainen [et al.] // Metabolism. - 2017. - № 75. - P. 6-15.

153. Prediction of early and late pre-eclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during first trimester of pregnancy / M. Parra-Cordero [et al.] // Ultrasound. Obstet. Gynecol. - 2013. - Vol. 41 № 5. - P. 538-544.

154. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia / H. Zeisler [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2016. - Vol. 374 № 1. - P. 13-22.

155. Proteinuria in preeclampsia : not essential to diagnosis but related to disease severity and fetal outcomes / X. Dong [et al.] // Pregnancy Hypertens. - 2017. - № 8. - P. 60-64.

156. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for noninvasive prenatal diagnosis / Y.M.D. Lo [et al.] // Am. J. Hum. Genet. - 1998. - № 62. - P. 768–775.

157. Quantification and application of the placental epigenetic signature of the RASSF1A gene in maternal plasma / F. Zhao F [et al.] // Prenat. Diagn. - 2010. - Vol. 30 № 8. - P. 778–782.

158. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia / Y.M.D. Lo [et al.] // Clin. Chem. - 1999. - Vol. 45 № 2. - P. 184–188.

159. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction / M.S. Alberry [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2009. - Vol. 200 № 1. - P. 98.

160. Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia / H. Yu [et al.] // Int. J. Mol. Sci. - 2013. - Vol. 14 № 4. - P. 7571-7582.

161. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia / D.W. Tsui [et al.] // Prenat. Diagn. - 2007. - Vol. 27 № 13. - P. 1212-1218.

162. Quantification of extracellular DNA using hypermethylated RASSF1A, SRY, and

GLO sequences - evaluation of diagnostic possibilities / I. Hromadnikova [et al.] // DNA Cell Biol. - 2010. - Vol. 29 № 6. - P. 295-301.

163. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities / M. Smid [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2001. - № 945. - P. 132-137.

164. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma / Y.M. Lo [et al.] // Am. J. Hum. Genet. - 1999. - Vol. 64 № 1. - P. 218–224.

165. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells / V. Dubinsky [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2010. - Vol. 63 № 3. - P. 193–199.

166. Romero R., Dey S.K., Fisher S.J. Preterm labor: one syndrom, many causes // Science. - 2014. - Vol. 345 № 6198. - P. 760–765.

167. Ramsey P.S., Andrews W.W. Biochemical predictors of preterm labor: fetal fibronectin and salivary estriol // Clin. Perinatol. - 2003. - Vol. 30 № 4. - P. 701–733.

168. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia / N. Papantoniou [et al.] // Prenat. Diagn. - 2013. - Vol. 33 № 7. - P. 682-687.

169. Relationship between second-trimester uterine artery Doppler and spontaneous early preterm delivery / E. Fonseca [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2006. - Vol. 27 № 3. - P. 301-305.

170. Ramos J.G.L., Sass N., Costa S.H.M. Preeclampsia // Rev. Bras. Ginecol. Obstet. - 2017. - Vol. 39 № 9. - P. 496-512.

171. Significant correlation between maternal body mass index at delivery and in the second trimester, and second trimester circulating total cell-free DNA levels / O. Lapaire [et al.] // Reprod. Sci. - 2009. - Vol. 16 № 3. - P. 274–279.

172. Smith S.C., Baker P.N. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies // Br. J. Obstet. Gynaecol. - 1999. - Vol. 106 № 8. - P. 861–862.

173. Smith S.C., Baker P.N., Symonds E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy // Am. J. Obstet. Gynecol. - 1997. - Vol. 177 № 1. - P. 57–67.

174. Scifres C.M., Nelson D.M. Intrauterine growth restriction , human placental development and trophoblast cell death // J. Physiol. - 2009. - Vol. 587 № 14. - P. 3453–3458.

175. Serum placental growth factor in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history / A. Tsiakkas [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2015. - Vol. 45 № 5. - P. 591–598.

176. Son M., Miller E.S. Predicting preterm birth: cervical length and fetal fibronectin // Semin. Perinatol. - 2017. - Vol. 41 № 8. - P. 445–451.

177. Serum inhibin A and activin A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia / S. Muttukrishna [et al.] // Hum. Reprod. - 2000. - Vol. 15 № 7. - P. 1640-1645.

178. Screening for pre-eclampsia by using maternal serum inhibin A, activin A, human chorionic gonadotropin, unconjugated estriol, and alpha-fetoprotein levels and uterine artery Doppler in the second trimester of pregnancy / E. Ay [et al.] // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. - 2005. - Vol. 45 № 4. - P. 283-288.

179. Second-trimester uterine artery Doppler and spontaneous preterm delivery / F. Cobian-Sanchez [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2004. - Vol. 24 № 4. - P. 435-439.

180. Sibley C.P. Treating the dysfunctional placenta // J. Endocrinol. - 2017. - Vol. 234 № 2. - P. 81-97.

181. Skeith L., Rodger M. Anticoagulants to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications: Is it time to put the needles away? // Thromb. Res. - 2017. - Vol. 151 № 1. - P. 38-42.

182. Second trimester cervical length measurement for prediction spontaneous preterm birth in an unselected risk population / A.B. Peixoto [et al.] // Obstet. Gynecol. Sci. - 2017. - Vol. 60 № 4. - P. 329-335.

183. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications / Y.M.D. Lo [et al.] // Blood. - 1996. - Vol. 88 № 11. - P. 4390–4395.

184. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia / R.J. Levine [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2004. - Vol. 190 № 3. - P. 707–713.

185. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure / J. Hempstock J [et al.] // Hum. Pathol. - 2003. - Vol. 34 № 12. - P. 1265–1275.

186. The preterm parturition syndrome / R. Romero [et al.] // BJOG. - 2006. - Vol. 113

№ 3. - P. 17–42.

187. The preterm prediction study: fetal fibronectin testing and spontaneous preterm birth / R.L. Goldenberg [et al.] // Obstet. Gynecol. - 1996. - Vol. 87 № 5. - P. 643–648.

188. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA / M.L. Tjoa [et al.] // Am. J. Pathol. - 2006. - Vol. 169 № 2. - P. 400-404.

189. Total and fetal circulating cell-free DNA, angiogenic, and antiangiogenic factors in preeclampsia and HELLP syndrome / R. Munoz-Hernandez [et al.] // Am. J. Hypertans. - 2017. - Vol. 30 № 7. - P. 673-682.

190. Thaxton J.E., Romero R., Sharma S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes // J. Immunol. - 2009. - Vol. 183 № 2. - P. 1144–1154.

191. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia / A. Scharfe-Nugent [et al.] // J. Immunol. - 2012. - Vol. 188 № 11. - P. 5706-5712.

192. Tong Y.K., Lo Y.M.. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids // Clin. Chim. Acta. - 2006. - Vol. 363 № 1-2. - P. 187–196.

193. The effect of prepregnancy body mass index on birth weight, preterm birth, cesarean section, and preeclampsia in pregnant women / M. Mohammadi [et al.] // J. Matern. Fetal Neonatal Med. - 2018. - № 17. - P. 1-16.

194. The preterm prediction study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth / I. Hendler [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2005. - Vol. 192 № 3. - P. 882-886.

195. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy / K. Racicot [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2014. - Vol. 72 № 2. - P. 107-116.

196. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis / J.S. Cnossen [et al.] // CMAJ. - 2008. - Vol. 178 № 6. - P. 701-711.

197. Uterine artery pulsatility index at 30-34 weeks' gestation in the prediction of adverse perinatal outcome / N. Valino [et al.] // Ultrasound Obstet. Gynecol. - 2016. - Vol. 47 № 3. - P. 308-315.

198. Ultrasonographic cervical length measurement at 10-14 and 20-24 weeks gestation and the risk of preterm delivery / I. Ozdemir [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. - 2007. - Vol. 130 № 2. - P. 176-179.

199. Wang A., Rana S., Karumanchi S.A. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis // Physiology. - 2009. № 24. - P. 147–158.

200. Women with preeclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin A, activin A, and soluble E-selectin / N.A. Bersinger [et al.] // Hypertens. Pregnancy. - 2003. - Vol. 22 № 1. - P. 45-55.

201. Zhong X.Y., Holfgang W., Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction // British Journal of Obstetrics and Gynecology. - 2000. - Vol. 107. - P. 766–769.