

На правах рукописи

ХАЧАТРЯН

Зарине Варужановна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Кан Наталья Енкиновна
кандидат биологических наук Красный Алексей Михайлович

Официальные оппоненты:

Мурашко Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского;

Цахилова Светлана Григорьевна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии стоматологического факультета, профессор

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «09» марта 2021 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Hachatryn%20Z.V.-dissertation.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Задержка роста плода остается одной из ведущих проблем акушерства, занимая важное место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности. Частота задержки роста плода по данным современных авторов составляет от 5 до 18% беременностей по данным современных авторов (Макаров И.О. и соавт., 2012; Кан Н. Е. и соавт., 2014; Стрижаков А.Н. и соавт., 2017; Figueras F. et al., 2011; Gardosi J. et al., 2013; Gordijn S.J. et al., 2016). Данное осложнение беременности характеризуется патологическим ограничением генетически запрограммированного роста плода (Alfirevic Z. et al., 2013), а малые размеры для гестационного срока при рождении ассоциированы с высокой смертностью и заболеваемостью в перинатальном периоде (Conde-Agudelo A., 2006; Lees C. et al., 2015; Meher S. et al., 2017). Также маловесные к сроку гестации дети входят в группу риска по развитию сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний при достижении ими зрелого возраста (Barker D.J.P. et al., 2006; Menendez-Castro C. et al., 2018).

Отсутствие эффективных методов лечения обуславливают интерес не только к изучению этиопатогенетических механизмов задержки роста плода, но и совершенствованию ее диагностики. Современные протоколы ведения основаны на инструментальных методах исследования, однако, методологическая неоднородность и отсутствие единых референсных значений диктуют необходимость поиска новых неинвазивных маркеров данного осложнения беременности. Открытие внеклеточной фетальной ДНК и последующие исследования показали, что ее выделение в материнский кровоток происходит предположительно за счет процессов дифференцировки трофобласта, апоптоза и некроза его клеток (Lo Y.M. et al., 1997; Huppertz B. et al., 2004; Litton C. et al., 2009), что вызвало большой интерес к ее изучению в качестве неинвазивного маркера плацента-ассоциированных осложнений беременности, в том числе задержки роста плода (Карапетян А.О. и соавт.,

2018; S. Hahn et al., 2011; AbdelHalim R.M. et al., 2016; Smid M. et al., 2006; Sekizawa A. et al., 2007; Rolnik D. L. et al., 2018).

В настоящее время большое значение приобретает изучение не только процессов формирования задержки роста плода, но и их эпигенетической регуляции (Banister C.E. et al., 2011; Feil R. et al., 2012; He Z. et al., 2016). Изучение метилирования генов, участвующих в регуляции апоптоза, клеточной адгезии, ангиогенеза, иммунных и метаболических процессов представляет интерес не только в связи с их потенциальной ролью в формировании задержки роста плода, но и развитии отдаленных последствий в рамках реализации фетального программирования (Lash G. et al., 2009; Andraweera P.H. et al., 2012; Gondret F. et al., 2013; Farag A.K. et al., 2018).

Таким образом, изучение внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов представляется актуальным для уточнения патогенетических аспектов и диагностики задержки роста плода.

Степень разработанности темы

В настоящее время отсутствие эффективных методов диагностики и прогнозирования задержки роста плода требует поиска новых неинвазивных прогностических и диагностических маркеров. Исследование внеклеточной фетальной ДНК, как одного из наиболее изученных неинвазивных биомаркеров, остается важной задачей современного акушерства, что во многом связано с изменением ее уровня до клинической манифестации некоторых осложнений беременности (Hahn S. et al., 2012; Contro E. et al., 2017). Существуют данные об ассоциации изменения уровня внеклеточной фетальной ДНК в I триместре с развитием задержки роста плода (Alberry M.S. et al., 2009; Morano D. et al., 2018; Rolnik D.L. et al., 2018). Однако, исследований, направленных на определение роли внеклеточной фетальной ДНК в диагностике и прогнозировании ранней и поздней форм задержки роста плода во II и III триместре недостаточно.

Значимость генетических факторов в развитии задержки роста плода является неоспоримой. Однако, механизмы их реализации, в том числе путем эпигенетической регуляции, остаются малоизученными. Большой интерес для изучения представляют данные о том, что эпигенетические механизмы лежат в основе фетального программирования и отвечают за развитие заболеваний в зрелом возрасте (Kim M. et al., 2010; Schleithoff C. et al., 2012; Zhu Z. et al., 2019).

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

5. Оптимизировать алгоритм диагностики задержки роста плода на основании выявленных неинвазивных предикторов для улучшения перинатальных исходов.

Научная новизна

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Личный вклад автора

Автором была произведена систематизация данных литературы по теме диссертации, на основании которой были сформированы цели и задачи

работы, был проведен подбор в определении необходимого дизайна исследования и анализ клинико-анамнестических данных. Автором осуществлялось ведение пациентов и их родоразрешение, забор биологического материала и участие в молекулярно-генетических исследованиях. Диссертантом был произведен анализ медицинской документации, статистическая обработка полученных данных и научное обобщение полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация работы

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

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

Внедрение результатов исследования

Практические рекомендации, основанные на результатах исследования, используются в работе акушерских отделений ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и

перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты, полученные в ходе работы, используются в учебном процессе в виде практических занятий и лекций для клинических ординаторов, аспирантов, а также врачей различных регионов России, работающих в системе специализированной акушерско-гинекологической помощи.

Публикации результатов исследования

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

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 151 странице компьютерного текста. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 28 рисунками. Библиографический указатель включает 303 работы цитируемых авторов, из них 11 на русском языке и 292 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для уточнения вклада факторов риска в развитие задержки роста плода на первом этапе исследования было проведено когортное ретроспективное исследование, в которое были включены 219 беременных, родоразрешенных в ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Группу I (основную) составили 105 беременных с задержкой роста плода, группу II (сравнения) 114 пациенток с физиологически протекающей беременностью. С учетом срока манифестации задержки роста плода, основная группа была разделена на две подгруппы: IA – 49 беременных с ранней формой и IB – 56 пациенток с поздней формой задержки роста плода.

Для проведения молекулярно-генетических исследований на следующем этапе в основную группу I были отобраны 48 беременных с задержкой роста плода, из них IA – 23 беременные с ранней формой и IB – 25

пациенток с поздней формой; а группу II – сравнения – 45 пациенток с неосложненным течением беременности.

Критериями включения в исследование для обеих групп являлись возраст пациенток от 18 до 45 лет, одноплодная беременность в сроке 22-40 недель. Для основной группы критерием включения также служила беременность, осложнившаяся задержкой роста плода.

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

Для выполнения поставленных задач всем пациенткам, включенным в исследование, был выполнен стандартный набор обследования согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 ноября 2012 года № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)». Все пациентки были проинформированы с целью и методами проводимого исследования, получены добровольные согласия на участие. Были изучены клиничко-анамнестические данные, особенности течения и исходы беременностей, а также состояние плодов и новорожденных. Специальные методы исследования включали полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с целью исследования внеклеточной фетальной ДНК в плазме крови матери, анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) и метод пиросеквенирования для изучения метилирования генов, гистохимическое исследование TUNEL-методом и иммунофлуоресцентный анализ для исследования плацент.

Результаты исследования вносились в тематические карты и электронные таблицы с последующей статистической обработкой.

Результаты исследования и их обсуждение

Все пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям. Принимая во внимание указания ряда авторов на высокую частоту соматических заболеваний в развитии задержки роста плода (Кан Н.Е. и соавт., 2014; Стрижаков А.Н. и соавт., 2017; Drenthen W. et al., 2007; Howarth S. et al., 2007; Cetin I. et al., 2013) был проведен анализ ее структуры в исследуемых группах.

Было выявлено, что у пациенток основной группы частота наследственных тромбофилий, обусловленных дефектами в генах II и V факторов свертывания крови ($n=6$, 5,7%) (OR=2,5 (1,4-9,2)), $p<0,01$) и антифосфолипидного синдрома ($n=5$, 4,8 %) (OR= 2,1 (1,2-18,4)), $p<0,01$) статистически значимо выше, чем в группе сравнения, что согласуется с данными литературы о вкладе данных факторов в развитие задержки роста плода (Макацария, А.Д. и соавт., 2016; Silver R.M. et al., 2010; Cetin I. et al., 2013; Schreiber K. et al., 2016). При задержке роста плода у беременных была отмечена статистически значимая более высокая частота заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно хронической артериальной гипертензии в отличие от группы сравнения ($n=12$, 11,4%) (OR= 2,3 (1,6-8,5)), $p<0,01$), а среди заболеваний мочевыводящей системы статистически значимыми были различия в частоте хронического пиелонефрита ($n=26$ (24,7%) (OR=4,6 (1,8-18,3)), $p<0,01$), что согласуется с литературными данными об ассоциации задержки роста плода с наличием у матери сердечно-сосудистых заболеваний (Allen V.M. et al., 2004; Morgan J.A. et al., 2020) и инфекционно-воспалительных процессов в органах мочевыделительной системы (Тютюнник В.Л., 2016; Nevis I. F. et al., 2011).

Большой интерес представляло изучение гинекологического и репродуктивного анамнеза. Среди гинекологических заболеваний было отмечено статически значимое увеличение хронического цервицита ($n=14$, 13,3%) (OR=1,6 (0,8-16,3)), $p<0,05$). Анализ акушерского анамнеза показал, что в группе пациенток с задержкой роста плода наблюдалось статистически

значимое увеличение частоты неразвивающейся беременности ($n=9$, 14,0%) ($OR=2,6$ (0,8-12,3)), $p<0,05$) и задержки роста плода в анамнезе ($n= 12$, 18,8 %) ($OR=2,5$ (1,2-13,4)) $p<0,05$). Полученные данные согласуются с данными отечественных и зарубежных авторов об ассоциации задержки роста плода с неразвивающейся беременностью (Стрижаков А.Н. и соавт., 2017; Gunnarsdottir J. et al., 2014) и задержкой роста плода в анамнезе (Макаров И.О. и соавт., 2012; Ananth C.V. et al., 2007).

Принимая во внимание высокую частоту осложнений при задержке роста плода, был проведен анализ течения беременности в исследуемых группах. Было отмечено, что частота угрожающего выкидыша с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности была статистически значимо выше при задержке роста плода ($n=18$, 17,1%), ($OR=2,1$ (0,6-4,2) ($p<0,05$), что соответствует данным литературы (Weiss J.L. et al., 2004; Bever A.M. et al., 2018). Статистически значимых различий в частоте других осложнений беременности получено не было.

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

$$P=1/(1+e^{-z}), \text{ где}$$

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

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

$X1$ – хронический пиелонефрит

$X2$ – Задержка роста плода в анамнезе

$X3$ – Угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы

$X4$ – Хронический цервицит

Согласно проведенному ROC-анализу площадь под кривой составила 0,79 (ДИ 0,73-0,85), а оптимальный порог – 0,50 с чувствительностью 73% и специфичностью 74%.

Анализ перинатальных исходов указывает на более неблагоприятное течение неонатального периода при задержке роста плода, особенно при ее ранней форме, что нередко связано с развитием осложнений, требующих досрочного родоразрешения (Макаров И.О. и соавт., 2012; Baschat A.A. et al., 2007). Так, сроки родоразрешения в группе ранней формы задержки роста плода составили 33,1 (29;35,6) недель, в группе поздней формы – 37,6 (36,1;40,3) недель (OR=3,2 (1,1-12,1), $p<0,001$)).

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

В структуре заболеваемости у детей в основной группе статистически значимо чаще встречались асфиксия легкой ($n=10$, 9,5%) (OR=2,3 (0,9-12,4), $p<0,05$) и тяжелой степени ($n=6$, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), $p<0,001$), респираторный дистресс-синдром ($n=8$, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), $p<0,001$), врожденная пневмония ($n=34$, 32,4%) (OR=3,6 (1,9-10,1), $p<0,01$), бронхолегочная дисплазия ($n=8$, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), $p<0,001$). Частота ДВС-синдрома ($n=12$, 11,4%) (OR=2,6 (1,8-11,3), $p<0,001$), ВЖ ($n=18$, 17,1%) (OR=1,6 (0,8-9,6), $p<0,01$), НЭК ($n=6$, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), $p<0,001$) и неонатальной желтухи ($n=29$, 27,6%) (OR=5,6 (0,3-17,4), $p<0,05$) также превалировала в основной группе.

Отсутствие до настоящего времени надежных методов диагностики задержки роста плода делает актуальным поиск новых молекулярно-генетических маркеров, которые способствовали бы не только ранней

верификации, но и оптимизации ведения задержки роста плода. С этой целью было изучено содержание внеклеточной фетальной ДНК (вфДНК), которое не показало статистически значимых различий в группе задержки роста плода по сравнению с группой физиологической беременности. Однако, при внутригрупповом анализе было получено снижение концентрации вфДНК в группе ранней формы задержки роста плода до 89,03 (44,52; 178,32) ГЕ/мл, которое было статистически значимо ниже показателей в группе поздней формы 244,14 (145,23; 422, 47) ГЕ/мл и в группе сравнения 211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл ($p < 0,001$) (рисунок 1).

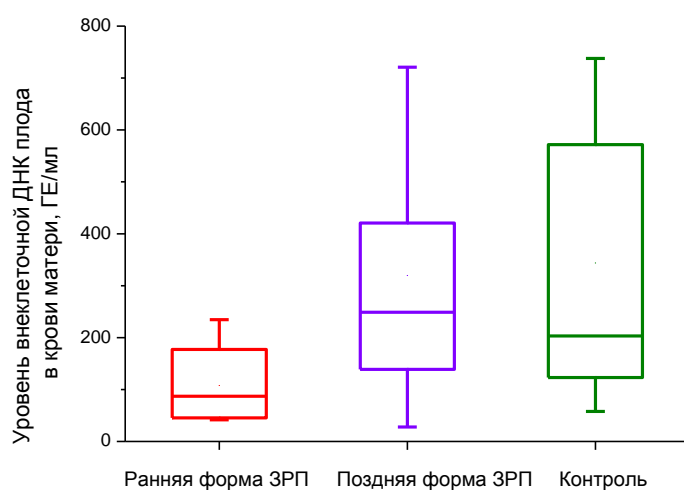


Рисунок 1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК при задержке роста плода

Результаты исследования согласуются с работами по оценке значимости вфДНК в диагностике задержки роста плода на ранних сроках беременности (Krishna I. et al., 2016; Morano D. et al., 2018; Rolnik D.L. et al., 2018). Следуя положению о плацентарной природе вфДНК (Карапетян А.О. и соавт., 2018; Ng E.K. et al., 2003; Bianchi D.W. et al., 2004; Rolnik D. L. et al., 2018) было проведено исследование связи между концентрацией вфДНК, морфометрическими показателями и гистологическими особенностями плаценты. Выявлена сильная степень корреляционной связи между концентрацией вфДНК и массой плаценты ($r=0,79$; $p < 0,001$). При иммунофлуоресцентном анализе плацент в группе ранней формы задержки

роста плода было обнаружено выраженное нарушение архитектоники с превалированием обширных аваскулярных зон за счет межворсинчатого фибриноида, с нарушением дифференцировки ворсин и доминированием стромального компонента (рисунок 2).

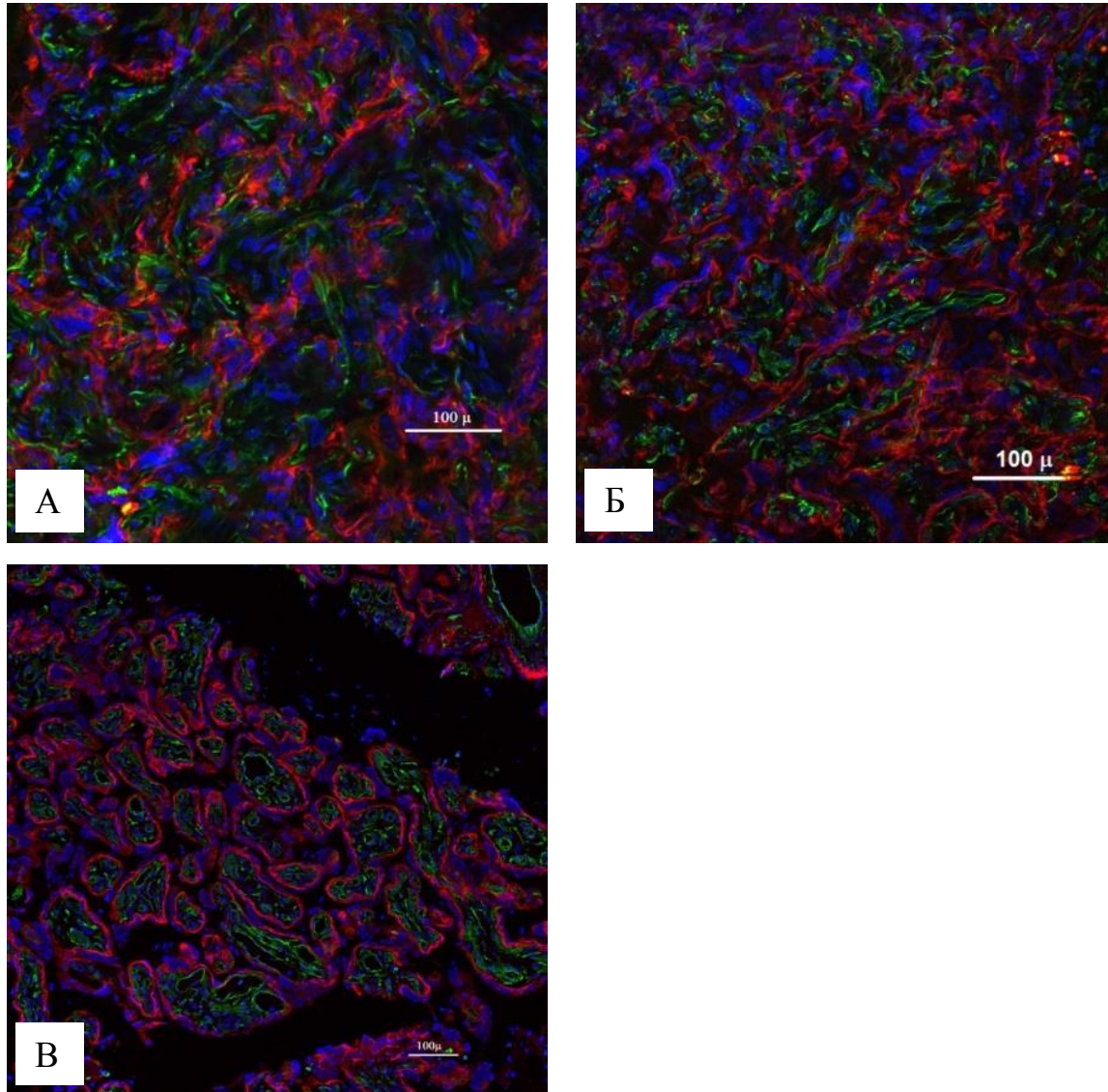


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентный анализ плацент при ранней форме ЗРП (А), поздней форме ЗРП (Б), физиологической беременности (В)
 Обозначения: красный – *E-cadherin*; синий – *DAPI*; зеленый – виментин

Описанные патологические изменения, характерные для мальперфузии, служат не только объяснением снижения обменных процессов между матерью и плодом, но и одним из предполагаемых механизмов снижения уровня вфДНК.

С целью оценки диагностической значимости был проведен ROC анализ, который показал, что определение уровня вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении 119,11 ГЕ/мл позволяет верифицировать раннюю форму ЗРП с высокой чувствительностью (73%) и специфичностью (79%) (AUC=0.81) (рисунок 3).

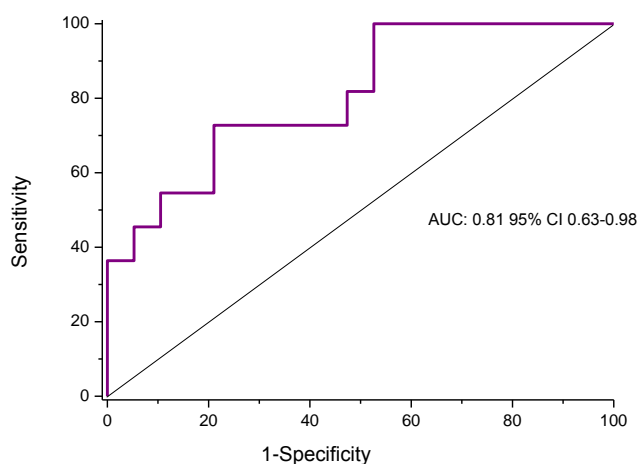


Рисунок 3. Оценка диагностической эффективности определения уровня вфДНК в плазме крови для выделения беременных женщин с ранней формой задержки роста плода

Принимая во внимание данные о взаимосвязи между вфДНК и массой новорожденного (Clapp M.A. et al., 2015) был проведен дальнейший анализ, который установил прямую сильную корреляционную связь между уровнем вфДНК, массой ($r=0,72$; $p<0,001$) и ростом ($r=0,71$; $p<0,001$) новорожденных с ранней формой задержки роста плода.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях вфДНК при ранней задержке роста плода, что может быть следствием нарушения плацентации, гипоплазии и изменения архитектоники плаценты с преобладанием стромального компонента. Определение диагностически значимых уровней вфДНК позволяет верифицировать формы задержки роста плода и согласуется с современными представлениями о различных механизмах формирования ее форм. Кроме того, определение вфДНК позволяет прогнозировать риск рождения детей с низкими массо-ростовыми показателями.

Как известно, сочетание задержки роста плода и преэклампсии характеризуется самыми неблагоприятными исходами (Villar J. et al., 2006; Lees C. et al., 2013; Carter E.V. et al., 2017), что вызывает большой интерес для изучения вфДНК при данном сочетании. Было обнаружено в группе задержки роста плода и преэклампсии статистически значимо более высокое значение вфДНК, которое составило 2440,15 (1456,24; 3696,56) ГЕ/мл. В группе сравнения концентрация вфДНК составила 200,72 (112,63; 352,59, $p < 0,01$) ГЕ/мл (рисунок 4).

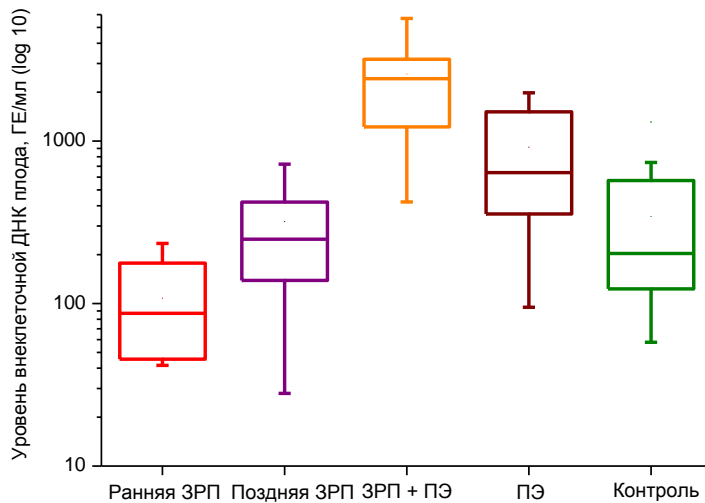


Рисунок 4. Исследование вфДНК при задержке роста плода и преэклампсии

Для оценки диагностической эффективности количественного определения вфДНК при задержке роста плода и преэклампсии без нарушений фето-плацентарного кровотока был проведен ROC-анализ. Оценка площади под ROC-кривой составила 0,89 (95%, ДИ (70-100)). При пороговом значении ДНК 1608,23 ГЕ/мл, чувствительность составила 80%, специфичность 89% (рисунок 5).

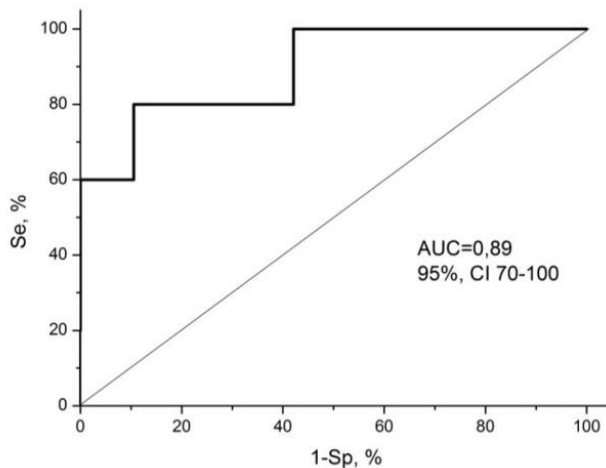


Рисунок 5. Оценка диагностической значимости определения концентрации вфДНК у беременных с задержкой роста плода и преэклампсией с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока

Учитывая непосредственное влияние плацентарных нарушений на уровень вфДНК, было проведено гистохимическое исследование плацент при сочетании задержки роста плода и преэклампсии с применением метода терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL), и показано усиление апоптоза как клеток трофобласта ворсин всех генераций, так и стромы стволых ворсин (рисунок 6).

Полученные данные о повышении внеклеточной фетальной ДНК при сочетании задержки роста плода с преэклампсией согласуются с другими работами, которые указывают на апоптоз как один из источников вфДНК в материнском кровотоке (Choi J.J. et al., 2002; Farideh Z. et al., 2002; Sifakis S. et al., 2015; Nandi, K. et al., 2020), и свидетельствуют о различном генезе формирования данных осложнений беременности.

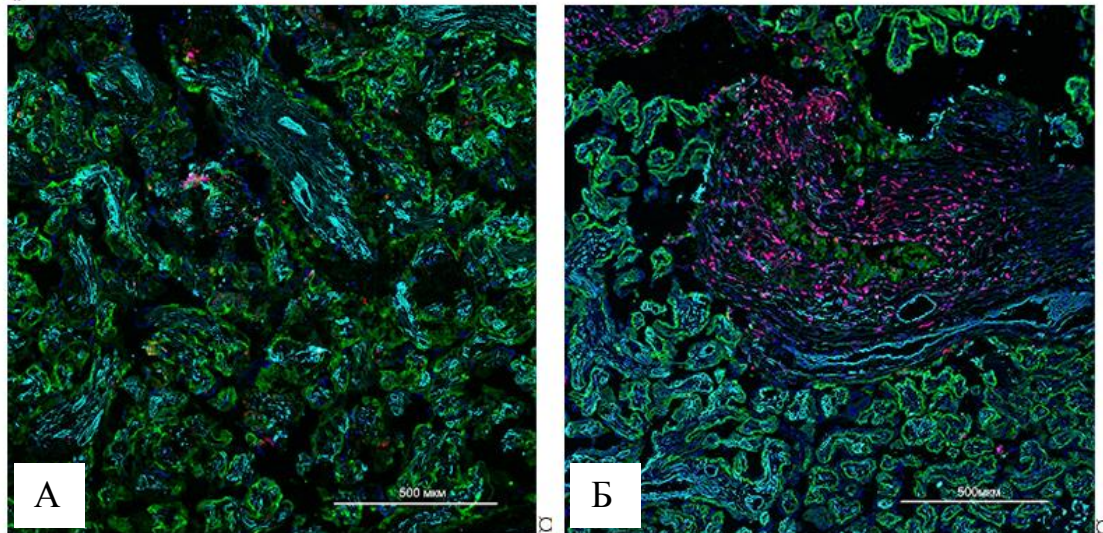


Рисунок 6. Гистохимическое исследование степени апоптоза TUNEL-методом при физиологической беременности (А) и сочетании задержки роста плода и преэклампсии (Б).

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

Эпигенетические процессы могут вносить существенный вклад в регуляцию патогенетических механизмов задержки роста плода (Feil R. et al., 2012; He Z. et al., 2016), а также играть роль в реализации фетального программирования. С целью исследования уровня метилирования был произведен отбор генов с потенциальной ролью в патогенезе задержки роста плода – CDO1, MMP2, СЕВРА, LEP, HLAG, VEGF, MEST, CDH1, TLR2, BMP6, GNA12, DAPK3, DFNA5, ICR (импринтинг контролирующая область) IGF2/H19. Изучение метилирования данного профиля генов в плаценте с помощью анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) выявило статически значимые изменения в генах TLR2 и ICR IGF2/H19 (рисунок 7).

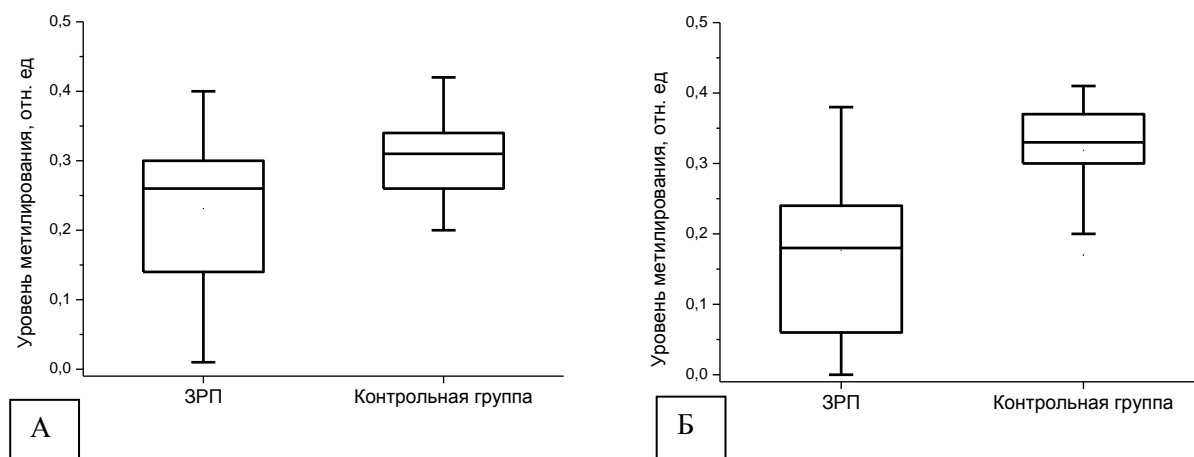


Рисунок 7. Относительный уровень метилирования TLR 2 (А) и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 (Б) в плацентах при задержке роста плода и физиологической беременности.

В результате исследования было получено снижение относительного уровня метилирования гена TLR2 в группе задержки роста плода до 0,26 (0,14; 0,30), тогда как в группе сравнение оно составило 0,31 (0,26; 0,34), $p=0,01$) и снижение метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 до 0,17 (0,06; 0,24) при задержке роста плода по сравнению с физиологической беременностью 0,33 (0,30; 0,37), $p<0,001$).

На следующем этапе было проведено исследование метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови. Было обнаружено, что в группе ранней формы задержки роста плода уровень метилирования гена TLR 2 составил 0,01 (0,0; 0,45) и был статистически значимо ниже, чем в группе сравнения 0,43 (0,05;0,53), $p=0,02$). При пороговом значении относительного уровня метилирования гена TLR2 0,012 чувствительность метода составила 88%, а специфичность 60 % (AUC=0,72 (95% ДИ 0,56-0,88) (рисунок 8).

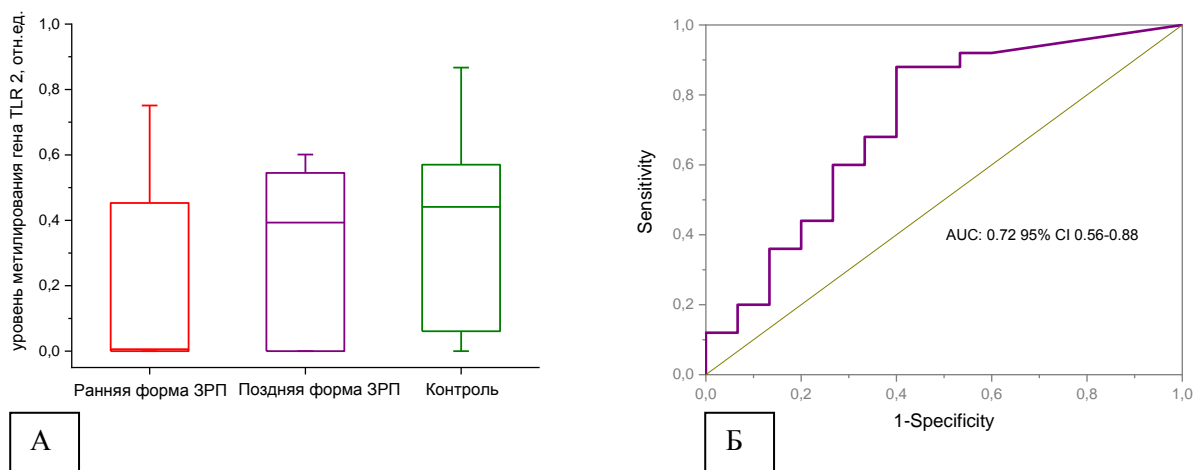


Рисунок 8. Относительный уровень метилирования гена TLR2 в плазме материнской крови в исследуемых группах (А) и анализ ROC-кривой уровня метилирования гена TLR2 для дифференциации групп беременных с ранней формой задержки роста плода (Б).

Активация TLR2 приводит к индукции апоптоза посредством Fas-ассоциированного белка (Abrahams V.M. et al., 2008). Учитывая специфичность проапоптотического эффекта для TLR2, снижение уровня его метилирования может приводить к усилению экспрессии и, как следствие, повышенному апоптозу в плаценте, что играет важную роль в патогенезе задержки роста плода.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 показало снижение относительного уровня метилирования в группе ранней форме задержки роста плода до 0,22 (0,18;0,32), в то время как в группе сравнения он составил 0,49 (0,44;0,65), ($p=0,03$). ROC-анализ показал, что при пороговом значении относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 0,2, чувствительность метода составила 80%, специфичность 80 % (рисунок 9).

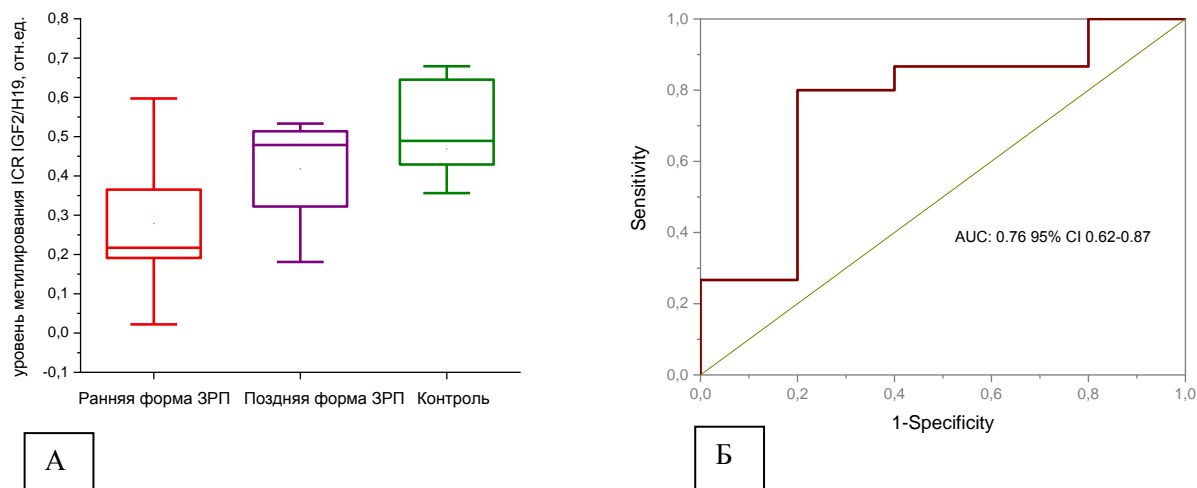


Рисунок 9. Относительный уровень метилирования ICR IGF2/H19 в плазме материнской крови в исследуемых группах (А) и анализ ROC-кривой уровня метилирования ICR IGF2/H19 для дифференциации групп беременных с ранней формой задержки роста плода (Б).

Снижение уровня метилирования ICR IGF2/H19 при ранней форме задержки роста плода могут быть причиной соответствующего снижения экспрессии IGF2. Учитывая важное значение IGF2 в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и транспорта питательных веществ в плаценте, метилирование ICR IGF2/H19 в патогенезе задержки роста плода не вызывает сомнений.

С целью оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования ICR IGF2/H19 в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования. Были получены статистически значимые изменения уровня метилирования 2-ого CpG-сайта, который составил 42 (38,5;45) %, что было ниже значений, полученных в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5), $p = 0,02$) (рисунок 10).

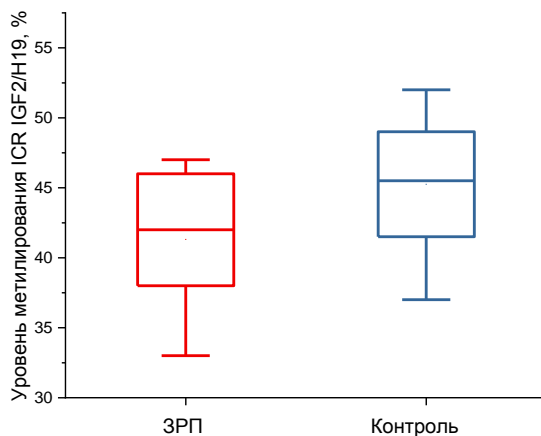


Рисунок 10. Определение уровня метилирования 2-ого сайта в шестом участке связывания ICR IGF2/H19 методом пиросеквенирования.

Снижение уровня метилирования ICR IGF2/H19 приводит к уменьшению концентрации циркулирующего IGF2 и, соответственно, торможению регулируемых им метаболических путей. Полученные результаты подтверждают диагностически важное значение IGF2 на антенатальном этапе, что связано с его ролью в регуляции процессов роста плода, и позволяют предположить, что развитие эпигенетических механизмов регуляции начинается на этапе внутриутробного развития и продолжает реализации уже в организме новорожденного.

Таким образом, проведенные исследования уточнили новые звенья патогенеза задержки роста плода, а именно роль нарушений эпигенетической регуляции апоптоза и пролиферации в формировании задержки роста плода и позволили выделить новые неинвазивные маркеры для прогнозирования и диагностики задержки роста плода.

Выводы

1. К факторам риска задержки роста плода относятся: наследственные тромбофилии высокого риска (OR=2,5 (1,4-9,2)), антифосфолипидный синдром (OR=2,1 (1,2-18,4)), хроническая артериальная гипертензия (OR=2,3 (1,6-8,5)), пиелонефрит (OR=4,6 (1,8-18,3)) и цервицит (OR=1,6 (0,8-16,3)), неразвивающаяся беременность (OR=2,6 (0,8-12,3)) и

задержка роста плода в анамнезе (OR=2,5 (1,2-13,4)), а также угроза прерывания с образованием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности (OR=2,1 (0,6-4,2)) ($p<0,05$).

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

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

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

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

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

7. Аберрантное метилирование импринтинг контролирующей области генов IGF2/H19, принимающих участие в регуляции метаболических

процессов, со снижением уровня до 42% (38,5;45), $p=0,02$) в пуповинной крови свидетельствует о его роли в развитии задержки роста плода.

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

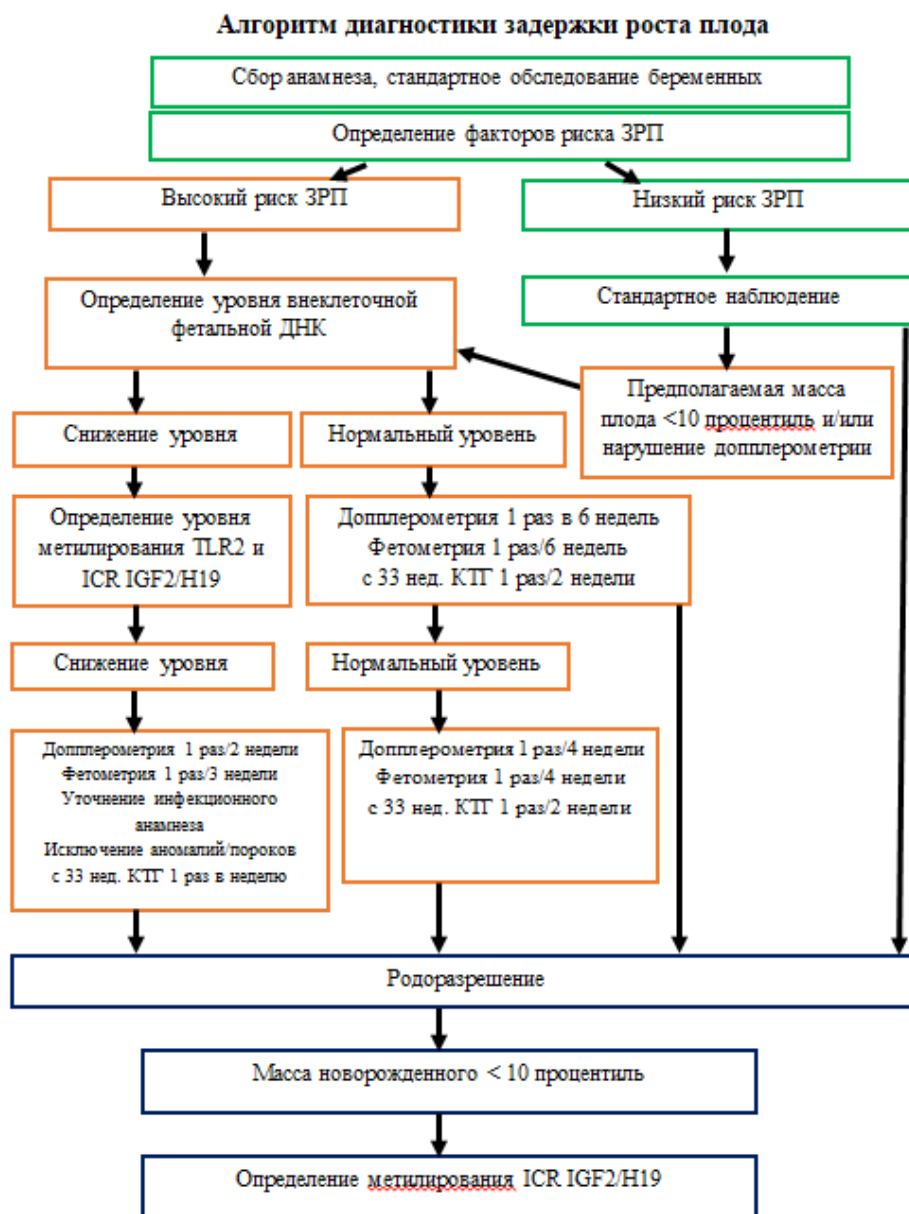
9. Разработанный алгоритм, включающий определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК и уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг контролирующей области IGF2/H19 позволяет оптимизировать диагностику задержки роста плода, снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Практические рекомендации

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

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

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



Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Хачатурян А.А., Мантрова Д.А., Ганичкина М.Б., Хачатрян З.В. Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при задержке роста плода // Материалы X Юбилейного регионального научно-образовательного форума «Мать и Дитя». – Геленджик, 28–30 июня 2017. – С.121-122.
2. Ганичкина М.Б., Хачатрян З.В., Хачатурян А.А., Мантрова Д.А. Современные подходы к ведению беременных с задержкой роста плода //

Материалы конгресса «XII Международный конгресс по репродуктивной медицине». – Москва, 16-19 января 2019. – С.302-303.

3. Хачатурян А.А., **Хачатрян З.В.**, Мантрова Д.А., Ганичкина М.Б., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е. Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при задержке роста плода // Материалы конгресса «XII Международный конгресс по репродуктивной медицине». – Москва, 16-19 января 2019. – С.335-336.

4. Красный А.М., Хачатурян А.А., Кан Н.Е., **Хачатрян З.В.**, Тютюнник В.Л., Волгина Н.Е., Ганичкина М.Б., Мантрова Д.А., Садекова А.А. Роль Е-кадгерина в формировании задержки роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2018. – №. 6. – С. 38-43.

5. **Хачатрян З. В.**, Ломова Н. А., Хачатурян А. А., Тютюнник В. Л., Кан Н. Е. Профилактика задержки роста плода при плацентарной недостаточности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.27-32.

6. Кан Н. Е., **Хачатрян З. В.**, Тютюнник В. Л., Ломова Н. А., Донников А. Е. Применение фолатов в профилактике задержки роста плода при беременности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.65-67.

7. Ломова Н. А., **Хачатрян З. В.**, Мантрова Д. А., Хачатурян А. А., Кан Н. Е., Тютюнник В. Л. Профилактика задержки роста плода при беременности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.86-89.

8. **Хачатрян З.В.**, Ломова Н.А., Кан Н.Е. Профилактика задержки роста плода, ассоциированной с плацентарной недостаточностью // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы». – Москва, 2-4 апреля 2019. – С.167-168.

9. **Хачатрян З.В.**, Ломова Н.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Донников А.Е. Роль фолатов в профилактике задержки роста плода // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-

поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы». – Москва, 2-4 апреля 2019. – С.168-169.

10. **Хачатрян З.В.**, Садекова А.А., Красный А.М., Кан Н.Е., Хачатурян А.А., Тютюнник В.Л. Роль внеклеточной фетальной ДНК в диагностике преэклампсии и задержки роста плода // Материалы XXV Юбилейного Всероссийского конгресса с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы». – Москва, 2-4 апреля 2019. – С.170-171.

11. Карапетян Т.Э., Ломова Н.А., **Хачатрян З.В.** Инфекция гениталий. Перинатальные и акушерские исходы // Материалы конгресса «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний». – Москва, 4-7 июня 2019. – С.20-21.

12. **Хачатрян З.В.** Молекулярные механизмы развития задержки роста плода // Материалы конгресса «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний». – Москва, 4-7 июня 2019. – С.30-31.

13. Садекова А.А., **Хачатрян З.В.**, Красный А.М., Кан Н.Е., Хачатурян А.А., Тютюнник В.Л. Диагностическая значимость определения уровня внеклеточной фетальной ДНК у беременных с преэклампсией и задержкой роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 8. – С. 144-149.

14. **Хачатрян З.В.**, Кан Н. Е., Макарова Н.П. Современные представления о молекулярных механизмах формирования задержки роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 10. – С. 22-26.

15. **Хачатрян З. В.**, Кан Н.Е., Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Харченко Д.К., Мантрова Д.А., Тютюнник В.Л. Роль трансформирующего фактора роста β в формировании задержки роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 11. – С. 107-112.

16. **Хачатрян З. В.**, Кан Н.Е., Красный А.М., Садекова А.А., Куревлев С.В., Тютюнник В.Л. Метилирование генов в плаценте при задержке роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 12. – С. 54-58.

17. Кан Н.Е., **Хачатрян З.В.**, Амирасланов Э.Ю., Чаговец В.В., Тютюнник В.Л., Ломова Н.А., Стародубцева Н.Л., Кициловская Н.А., Баранов И.И., Франкевич В.Е. Метаболомный профиль беременных при задержке роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 12. – С. 59-65.
18. **Хачатрян З.В.**, Кан Н.Е. Роль внеклеточной фетальной ДНК в диагностике задержки роста плода // **Материалы форума «XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя - 2019»** Москва, 25-27 сентября 2019. – С. 81.
19. **Хачатрян З.В.**, Харченко Д.К., Кан Н.Е. Роль трансформирующего фактора роста β в формировании преэклампсии и задержки роста плода // **Материалы форума «XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя - 2019»** Москва, 25-27 сентября 2019. – С. 81-82.
20. Кан Н.Е., **Хачатрян З.В.**, Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Амирасланов Э.Ю., Тютюнник В.Л., Ломова Н.А., Франкевич В.Е. Анализ метаболических путей при задержке роста плода // **Биомедицинская химия.** – 2020. – Т. 66. – №. 2. – С. 174-180.
21. Kan N.E., **Khachatryan Z.V.**, Chagovets V.V., Starodubtseva N.L., Amiraslanov E.Yu., Tyutyunnik V.L., Lomova N.A., Frankevich V.E. Analysis of metabolic pathways in intrauterine growth restriction // **Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.** – 2020. – Т. 14. – №. 4. – С. 356-362.