

На правах рукописи

ТЮТЮННИК

Наталья Викторовна

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ПРЕЭКЛАМПСИИ НА ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ УРОВНЯ
АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ И УГЛЕВОДНОГО
ПРОФИЛЯ ПЛАЦЕНТЫ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Кан Наталья Енқыновна

кандидат биологических наук

Зиганшина Марина Михайловна

Официальные оппоненты:

Малышкина Анна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России, директор

Цахилова Светлана Григорьевна – доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России кафедра акушерства и гинекологии, профессор

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «16» апреля 2019 года в 13 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России 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/TjutjunnikNV_diss.pdf

Автореферат разослан «__» марта 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Основными задачами современного акушерства и перинатологии является снижение материнской и перинатальной заболеваемости. Одним из самых тяжелых осложнений беременности является преэклампсия, занимающая третье место в структуре причин материнской смертности и являющаяся основной причиной заболеваемости новорожденных [Серов В.Н. и соавт., 2018; Mudjari N.S., Samsu N., 2015].

Ключевым звеном в развитии преэклампсии является плацентарная ишемия, развивающаяся вследствие нарушения процессов инвазии трофобласта, неполноценной гестационной перестройки спиральных артерий, приводящих к развитию системного воспалительного ответа, эндотелиальной дисфункции и иммунной дезадаптации [Кан Н.Е., 2017; Ходжаева З.С. и соавт., 2018; Mizuno S. et al., 2016; Gupta S.K. et al., 2016].

К патогенетическим факторам относят также нарушение формирования иммунологической толерантности к плоду, поскольку преэклампсию рассматривают как проявление хронического отторжения [Сухих Г.Т. и соавт., 2017; Тетруашвили Н.К. и соавт., 2017; Leber A. et al., 2011].

Следует отметить, что одним из возможных механизмов, обуславливающих феномен иммунологической толерантности, могут явиться регуляторные углевод-белковые взаимодействия между клетками материнского и фетального происхождения в фетоплацентарной системе. Взаимодействия подобного типа возможны между функциональными углеводными остатками в составе О- и N-цепей трансмембранных гликоконъюгатов (гликопротеинов или гликолипидов) формирующих гликокаликс клеток и антигликановыми антителами и эндогенными лектинами, которые специфически связывают гликаны [Обухова П.С., 2012; Varki A. et al., 2017].

Было показано, что гипертензивные расстройства во время беременности, в том числе и преэклампсия, характеризуются измененным профилем экспрессии гликанов гликокаликса, обусловленным морфофункциональными

нарушениями в тканевых структурах плаценты [Сидорова И.С. и соавт., 2017; Lennon F., Singleton P., 2011; Hofmeyr R. et al., 2017]. Однако, несмотря на имеющиеся исследования в этой области, на сегодняшний день отсутствуют данные о характеристике углеводного профиля плаценты при преэклампсии в зависимости от степени ее тяжести.

Другим, малоизученным аспектом при беременности, является иммунный ответ на углеводные антигены. Развитие чрезмерного системного воспалительного ответа, сопровождающего преэклампсию, инициирует синтез гипогликозилированных углеводных структур клеткой и изменение молекулярной архитектуры гликокаликса и внеклеточного матрикса [Зиганшина М.М. и соавт., 2017; Scott D.W., Patel R.P., 2013]. Вследствие этих процессов изменяется состав и структура гликанов, продуцируемых клеткой, что ведет к формированию DAMP (Danger Associated Molecular Patterns, образ опасности), то есть неоантигенов, к которым могут появиться аутоантитела, что сдвигает гомеостатический баланс в пуле естественных антител, существующий в норме [Бовин Н.В., 2013; Gaudet A.D., Popovich P.G., 2014]. По мнению ряда исследователей при беременности, репертуар этих антител меняется [Garsen M., et al., 2014; Ziganshina M.M., et al., 2018]. Однако убедительных доказательств этому не представлено.

Таким образом, актуальным представляется идентификация патогенетически значимых антител и характеристика их специфичности, что в комплексе с исследованием углеводного фенотипа плаценты, позволит сформировать представление о детерминантах развития заболевания и оптимизировать диагностику и прогнозирование преэклампсии.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время признанной гипотезой развития преэклампсии является нарушение инвазии трофобласта, дальнейшей плацентации и развитием системного воспалительного ответа и иммунной дезадаптации. Гликаны опосредуют межклеточные контакты, миграцию клеток и иммунные реакции, предполагается их участие в формировании иммунологической толерантно-

сти при беременности. В работах ряда авторов продемонстрирована роль антигликановых антител, а также гликома (совокупности гликанов) плаценты при осложненном течении беременности.

Учитывая, что исследование гликома плаценты проводится после родоразрешения, особый интерес представляет поиск предикторов преэклампсии во время беременности. В роли таких предикторов могут рассматриваться антигликановые антитела, значительное количество которых присутствует в периферической крови.

Вышеизложенное послужило основой углубленного изучения данного вопроса в представленном исследовании.

Цель исследования

Оптимизация диагностики преэклампсии и оценка степени ее тяжести на основании изучения уровня антигликановых антител и углеводного профиля плаценты.

Задачи исследования

1. Представить клинико-anamnestическую характеристику, особенности течения и исходы беременности, состояние плодов и новорожденных у пациенток с преэклампсией различной степени тяжести.
2. Разработать модель прогноза развития преэклампсии различной степени тяжести с учетом факторов риска.
3. Изучить особенности локализации и экспрессии гликанов в структурах плаценты (синцитиотрофобласте и эндотелии терминальных ворсин) при преэклампсии.
4. Определить содержание и спектр антигликановых антител в крови при физиологической беременности и при преэклампсии.
5. Оценить диагностическую ценность определения антигликановых антител для уточнения степени тяжести преэклампсии и разработать модель ее прогноза с учетом комплексного определения антигликановых антител.
6. Оптимизировать алгоритм ранней диагностики преэклампсии для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Научная новизна

На основании проведенного комплексного клинико-лабораторного исследования определен вклад факторов риска и создана прогностическая модель развития преэклампсии.

Изучен и представлен углеводный профиль плаценты при преэклампсии различной степени тяжести.

Определен уровень антигликановых антител при физиологически протекающей беременности, с выделением спектра, ассоциированного с преэклампсией.

Проведение иммунологических и гистохимических параллелей позволяет уточнить новые звенья патогенеза с позиций нарушения иммунологической толерантности и выделить наиболее значимые прогностические и диагностические критерии преэклампсии.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе уточнены клинико-anamnestические предикторы развития преэклампсии. В результате проведенного исследования разработан и внедрен в клиническую практику современный алгоритм диагностики преэклампсии, основанный на проведении многофакторного анализа, включающего клинические, биохимические, иммунологические предикторы, для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Применение современных методов диагностики и прогнозирования преэклампсии позволяет осуществлять тщательный клинико-лабораторный контроль и своевременно выявить данное осложнение беременности.

Внедрение алгоритма диагностики преэклампсии в практику акушерских стационаров и перинатальных центров позволит снизить частоту осложнений беременности, родов и послеродового периода, перинатальной заболеваемости и смертности.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлена прямая ассоциация развития преэклампсии с неразвивающейся беременностью в анамнезе, нарушением жирового обмена, хро-

ническим пиелонефритом и угрозой прерывания с отслойкой хориона в I триместре беременности. Разработанная модель позволяет определить вероятность развития тяжелой преэклампсии с чувствительностью 78% и специфичностью 69%.

2. Преэклампсия характеризуется изменением углеводного профиля плаценты. При умеренной степени преэклампсии выявляются минимальные отличия от физиологической беременности. При тяжелом течении – отмечаются выраженные изменения, что может являться свидетельством нарушения плацентации.

3. При преэклампсии установлено снижение уровня естественных антигликановых антител. Выявленные изменения гуморального иммунитета свидетельствуют о нарушенных механизмах регуляции физиологического гомеостаза при преэклампсии и указывают на различные патогенетические механизмы развития ее форм. Сочетания антигликановых антител (IgM + IgG) могут рассматриваться в качестве перспективных маркеров для диагностики, прогнозирования и верификации степени тяжести преэклампсии.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении и постановке целей и задач работы, разработке дизайна, систематизации данных литературы по теме диссертации и анализе клинико-anamнестических данных. Автор осуществлял ведение части пациентов в дородовом и послеродовом периоде, проводя родоразрешение и забор биологического материала. Диссертантом проведен анализ медицинской документации, статистическая обработка 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, и 4 паспорта «акушерство и гинекология».

Апробация работы

Основные положения работы представлены на: XXI Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы» (Москва, 2015), Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика» (Москва, 2016), VIII^{ом} и IX^{ом} региональных научных форумах «Мать и дитя» (Сочи, 2015, 2016), 24th European Congress of Obstetrics and Gynaecology (Torino, Italy, 2016), X^{ом} Юбилейном региональном научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Геленджик, 2017), XVI^{ом}, XVII^{ом} и XVIII^{ом} Российских форумах «Мать и дитя» (Москва, 2015, 2016, 2017), XII^{ом} международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), Всероссийской конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению» (Москва, 2018), III^{ем} Всероссийском конгрессе «Аутоиммунные и иммунодефицитные состояния» (Москва, 2018). В рамках конкурса молодых ученых XIX^{ого} Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и дитя» (Москва, 2018) доклад занял 3 место.

Обсуждение диссертации состоялось на межклинической конференции сотрудников акушерских отделений (15 ноября 2018 года) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (19 ноября 2018 года, протокол № 12).

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 опубликовано 24 научные работы, в том числе 13 статей в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах компьютерного текста. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 27 рисунками. Библиографический указатель включает 310 работ цитируемых авторов, из них 81 на русском и 229 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

На первом этапе проведено одномоментное поперечное исследование, в которое было включено 235 женщин, родоразрешенных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2015 по 2018 год. В дальнейшем согласно критериям включения и исключения в исследование были отобраны 178 беременных. Группу I (основную) составили 83 пациентки, беременность которых осложнилась преэклампсией, группу II (сравнения) – 95 условно здоровых беременных. Кроме того основная группа с учетом степени тяжести преэклампсии была разделена на 2 подгруппы. Подгруппу IA составили 32 пациентки с тяжелой, подгруппу IB – 51 беременная с умеренной преэклампсией.

Критериями включения в исследование для основной группы являлись: одноплодная беременность при сроке от 22 до 40 недель, наступившая в естественном цикле, осложненная преэклампсией, подтвержденной данными клинико-лабораторных исследований. Для группы сравнения – отсутствие преэклампсии. Критериями исключения для обеих групп исследования являлись: резус-конфликт; острые воспалительные заболевания при настоящей беременности; тяжелая экстрагенитальная патология; многоплодная бере-

менность; пороки развития плода; онкологические и аутоиммунные заболевания; иммуноглобулинотерапия, лечение низкомолекулярными гепаринами.

Всем пациенткам, включенным в исследование, для реализации задач, поставленных в работе, 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)». Беременные были ознакомлены с целью и методами исследования, дали письменное информированное согласие. Проведено изучение клинико-анамнестических данных, особенностей течения беременности и родоразрешения. Наряду со стандартными методиками в работе применены методы лектиновой гистохимии для изучения паттернов экспрессии углеводных остатков в составе гликанов, а также микрочиповый метод для изучения спектра антигликановых антител. Все результаты вносились в специально разработанную для данного исследования тематическую карту и в электронные таблицы с последующим анализом при помощи современных методов статистической обработки.

Результаты исследования и их обсуждение

Все беременные женщины, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и соматическому здоровью. Однако, принимая во внимание указание ряда авторов [Шмаков Р.Г. и соавт., 2017; Bartsch E. et al., 2016; Villa P.M. et al., 2017] на высокую частоту развития преэклампсии на фоне соматической патологии, была изучена ее структура в исследуемых группах. Проведение сравнительного анализа исходной клинической характеристики женщин исследуемых групп показало превалирование заболеваний сердечно-сосудистой и мочевыводящей систем, а также статистически значимые различия в частоте варикозной болезни ($n=15$, 18,1%) ($OR=4,5$ (1,5-39,2)), $p<0,05$), миопии ($n=13$, 15,7%) ($OR=1,7$ (1,1-19,4)), $p<0,05$) и нарушении жирового обмена 1 степени ($n=14$, 16,9%) ($OR=3,5$ (1,4-32,4)), $p<0,05$). Среди гинекологических заболеваний в группе 1 было отмечено увеличение частоты

ты миомы матки (n=15, 18,0%) (OR=15,4 (2,0-120,3)), p<0,05), хронического эндометрита (n=5, 6,0%) (OR=4,5 (0,5-39,2)), p<0,05), сальпингоофорита (n=4, 4,8%) (OR=3,5 (0,4-32,4)), p<0,05), эндометриоза (n=2, 2,4%) (OR=1,7 (0,1-19,4)), p<0,05).

При анализе репродуктивной функции обследованных женщин выявлена достоверно более высокая частота самопроизвольных выкидышей (по группам соответственно 15 – 18,1% и 9 – 9,5%) (OR=2,1 (1,1-1,9)), p<0,05), неразвивающихся беременностей (9 – 10,8% и 2 – 2,1%) (OR=3,4 (3,2-4,6)), p<0,05), преждевременных родов (6 – 7,2% и 1 – 1,0%) (OR=1,6 (1,3-3,7)), p<0,05) и преэклампсии в анамнезе (9 – 10,8% и 2 – 2,1%) (OR=4,2 (2,7-4,9)), p<0,05).

Течение настоящей беременности при преэклампсии чаще осложнялось ранним токсикозом умеренной и тяжелой степени (n=15, 18,1%), (OR=0,8 (0,4-1,6), p>0,05) и угрозой прерывания (n=29, 34,9%), (OR=1,1 (0,6-2,2), p>0,05) с формированием ретрохориальной гематомы (по данным УЗИ) (n=5, 6,0%) (OR=1,2 (0,2-12,1), p<0,05). Во II триместре в основной группе достоверно чаще течение беременности осложнялось угрозой прерывания (n=21, 25,3%), (OR=3,4 (1,3-9,1), p<0,05). Следует отметить у 12 (14,5%) (OR=0,7 (0,4-1,4), p<0,05) пациенток раннюю манифестацию преэклампсии в сроке 24 нед с последующим нарастанием клинической симптоматики. Обращает на себя внимание также более высокая частота анемии (n=14, 16,9%) (OR=2,1 (0,5-8,4), p>0,05) и задержки роста плода (n=3, 3,6%) (OR=1,3 (0,4-1,9), p>0,05). В III триместре беременности выявлялась достоверно более высокая частота задержки роста плода (n=9, 10,8%) (OR=4,5 (1,4-9,6), p<0,05) и маловодия (n=8, 9,6%) (OR=1,3 (1,4-2,9), p<0,05). Средний гестационный срок родов в основной группе составил 35,6 недель, в группе сравнения – 38,1 недель, что согласуется с данными литературы о более раннем родоразрешении беременных с ранней и/или тяжелой преэклампсии [Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2016; Kenny L.C., Mccarthy F.P., 2015; Li X. et al., 2016].

При анализе течения родового акта была установлена достоверно более высокая частота абдоминального родоразрешения ($n=54$, 65,1%) ($OR=4,5$ (1,4-9,6), $p<0,05$) у беременных основной группы. Особый интерес представляло изучение течения раннего неонатального периода. Все дети родились живыми. В структуре неонатальной заболеваемости у детей в основной группе достоверно чаще встречалась врожденная пневмония – ($n=32$, 38,5%) ($OR=2,5$ (3,4-9,5), $p<0,05$). При этом данный показатель чаще был отмечен в подгруппе IA в отличие от подгруппы IB – 64,1% против 11,0% ($OR=7,3$ (4,4-11,6), $p<0,05$). Асфиксия новорожденных как тяжелой, так и умеренной степени также чаще отмечалась в основной группе ($n=24$, 28,9%) ($OR=5,7$ (2,4-5,6), $p<0,05$) [Дегтярев Д.Н. и соавт., 2018; Pretorius T. et al., 2018]. Экстремально-низкая масса тела новорожденных при рождении также отмечалась в 3 раза чаще у детей от матерей с преэклампсией, при этом преимущественно с тяжелой ее формой ($n=17$, 20,5%) ($OR=2,7$ (2,4-4,6), $p<0,05$). Неонатальная желтуха встречалась у новорожденных обеих групп, с превалированием в основной группе – 10,8% ($OR=3,1$ (2,1-4,6), $p<0,05$).

Применив метод бинарной логистической регрессии, на основании анализа клинических и анамнестических данных, определена вероятность развития тяжелой преэклампсии по формуле:

$$P=1/(1+e^{-z})$$

$$Z=0,59 + 0,311*X1 + 0,21*X2 + 1,17*X3 + 0,278*X4;$$

где e – основание натурального логарифма и имеет значение 2,71828182845904; $X1$ – неразвивающаяся беременность в анамнезе, $X2$ – нарушение жирового обмена, $X3$ – хронический пиелонефрит, $X4$ – угроза прерывания в I триместре с формированием гематомы.

Используя 90 и 10% перцентили, определены границы степеней вероятности развития тяжелой преэклампсии.

Так нами были сформированы 3 группы пациенток:

- с низкой вероятностью ($p \leq 10\%$) $z = 0-0,39$;
- с умеренной вероятностью ($p = 10-90\%$) $z = 0,4-0,79$;

- с высокой вероятностью ($p \geq 90\%$) $z=0,8-1,0$.

Данная модель имеет чувствительность 78% и специфичность 69%.

Изучение углеводного профиля плаценты было выполнено лектиновой гистохимией с использованием панели биотинилированных лектинов (MAL II, SNA, ECL, UEA I, VVL, ConA) с известной углеводной специфичностью. Дополнительно была проведена обработка ткани плаценты ферментом нейроминидазой (для удаления терминальных остатков сиаловой кислоты), что позволяет исследовать изменение субтерминальных структур гликанов. Изучение состава гликокаликса в терминальных ворсинах плаценты выявило более низкое содержание гликоконъюгатов, детектируемых лектинами в гликокаликсе синцитиотрофобласта, по сравнению с гликокаликсом эндотелия при физиологической беременности (рис. 1А). Развитие преэклампсии характеризуется потерей данной закономерности: при умеренной преэклампсии содержание остатков $\alpha 2,6$ -связанной сиаловой кислоты (окраска лектином SNA) не отличается в исследуемых структурах (рис. 1Б); при тяжелой преэклампсии различия в содержании GalNAc-терминированных гликанов (окраска лектином VVL) также нивелируются (рис. 1В).

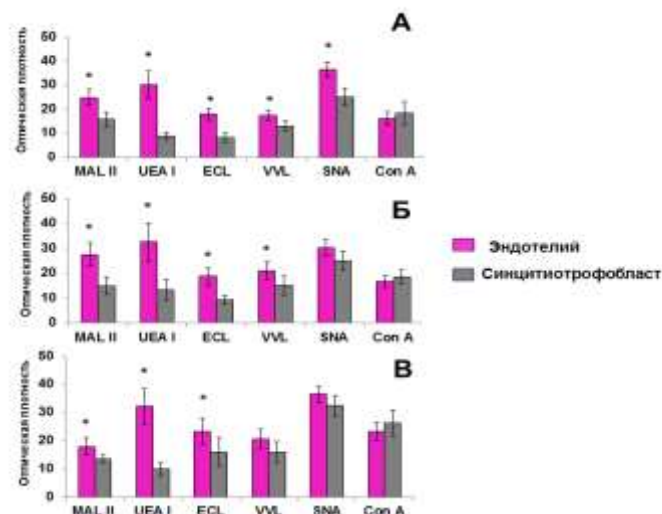


Рис. 1. Интенсивность окрашивания гликоконъюгатов в структурах плаценты у пациенток группы сравнения (А), умеренной (Б) и тяжелой преэклампсией (В)

Межгрупповое сравнение выявило особенности в содержании гликанов, окрашенных лектинами в эндотелии и синцитии терминальных ворсин

плаценты при преэклампсии умеренной и тяжелой степени. Установлено, что гликокаликс синцитиотрофобласта в ткани плаценты при физиологической беременности и умеренной преэклампсии не отличается по составу изученных гликанов (рис. 2А). В гликокаликсе эндотелия при умеренной преэклампсии выявлено снижение $\alpha 2,6$ -связанной сиаловой кислоты.

При тяжелой преэклампсии установлено повышенное, по сравнению с нормой, содержание терминальных остатков маннозы (окрашивание лектином ConA), β -Gal-терминированных структур гликанов (окрашивание лектином ECL) в обеих исследованных структурах; а также повышено содержание $\alpha 2,6$ -связанной сиаловой кислоты (окрашивание SNA) и снижено содержание $\alpha 2,3$ -связанной сиаловой кислоты (окрашивание MAL II) в гликокаликсе синцитиотрофобласта и эндотелия, соответственно (рис. 2А, рис. 2Б).

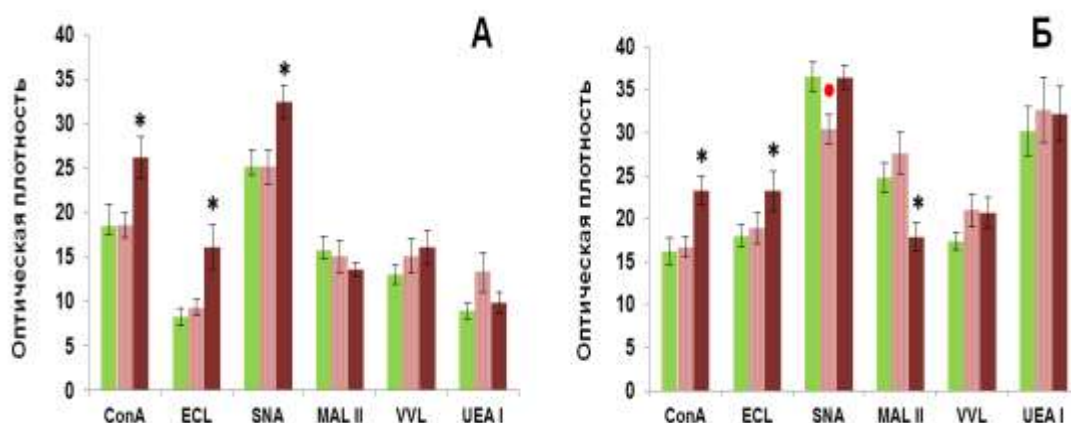


Рис. 2. Интенсивность окрашивания гликоконъюгатов в гликокаликсе синцитиотрофобласта (А) и эндотелия (Б) терминальных ворсин плаценты у пациенток исследуемых групп (■ группа сравнения; ■ умеренная преэклампсия; ■ тяжелая преэклампсия)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что изменения углеводного профиля в исследованных структурах плаценты наиболее выражено при тяжелой преэклампсии, что может быть следствием: нарушения плацентации; развития системного воспалительного ответа; нарушения формирования толерантности к фетальным аллоантигенам. Поскольку данные структуры плаценты входят в состав плацентарного барьера – синцитиотрофобласт контактирует с материнской, а эндотелий – с плодовой кровью,

то выявленные изменения, очевидно, значимы для патогенеза преэклампсии и согласуются с современным представлением о разных механизмах развития тяжелой и умеренной преэклампсии [Куликова Г.В. и соавт., 2017; Zarate A. et al., 2014; Gleicher N. et al., 2017].

Изменения, выявленные в плаценте, имеют важное значение для уточнения патогенеза, но основной клинической задачей является поиск маркеров для малоинвазивной диагностики и прогноза развития преэклампсии. С этой точки зрения метод жидкостной биопсии, к которому можно отнести анализ крови на комплексное определение антигликановых антител, выполненный микрочиповым методом, является информативным и перспективным [Varki A. et al., 2015-2017; Ziganshina M.M. et al., 2018].

Исследование антигликановых антител показало, что из 689 антител, детектируемых микрочиповым методом (на чипе были локализованы фрагменты О- и N-цепей гликопротеинов; олигосахариды гликолипидов; бактериальные полисахариды; антигены групп крови углеводной природы и их модифицированные производные), большинство имели стабильный, средний уровень, практически не различающийся между группами исследования. Межгрупповые различия были выявлены у пациенток на поздних сроках беременности (после 34 недель). Анализ представительного спектра антигликановых антител свидетельствуют, что при умеренной преэклампсии выявляются различия с группой сравнения по широкому спектру антител IgG класса (в том числе по антителам к бактериальным полисахаридам и антителам к гликанам – «образам опасности») (рис. 3А), при тяжелой – по антителам IgM класса (рис. 3Б). Опираясь на известные данные о принадлежности естественных антигликановых антител к бактериальным антигенам преимущественно к IgM классу [Бовин Н.В. и соавт., 2017; Akolekar R. et al., 2013], можно предположить, что при тяжелой преэклампсии изменения затрагивают гуморальное звено врожденного иммунитета, а при умеренной – скорее адаптивного.

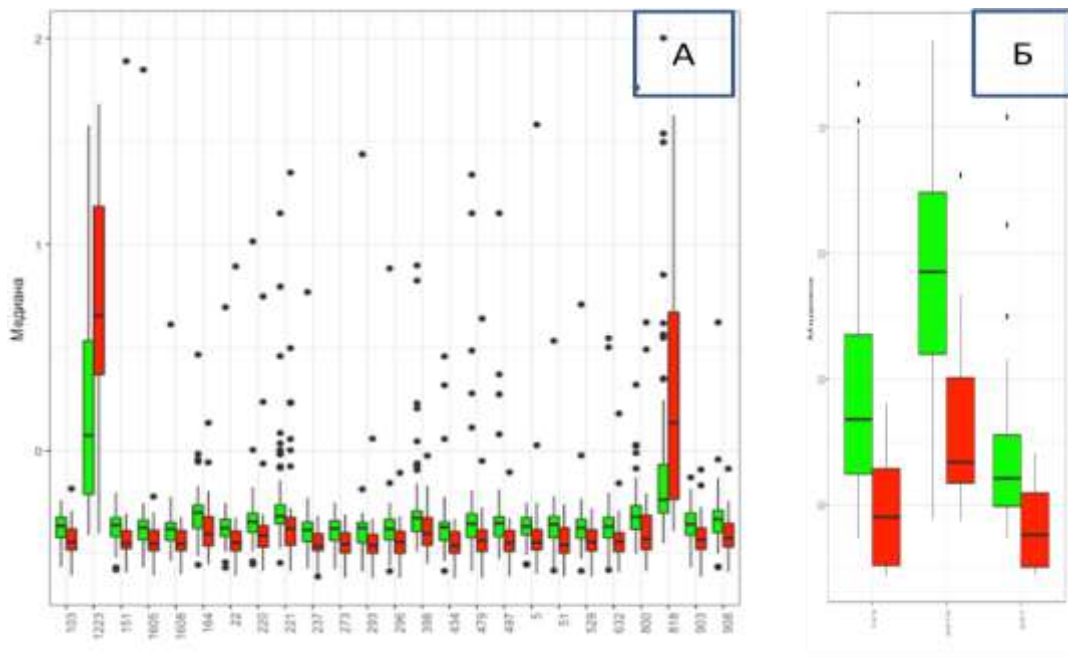


Рис. 3. Сравнение антигликановых антител на сроках после 34 недель беременности (А) антигликановые антитела IgG класса; группа сравнения (зеленые бокс-плоты); умеренная преэклампсия (красные бокс-плоты) (Б) антигликановые антитела IgM класса; группа сравнения (зеленые бокс-плоты); тяжелая преэклампсия (красные бокс-плоты) приведены данные только для значимых отличий ($p < 0,00017$); по оси X указаны идентификационные номера (ID) лигандов.

При анализе связей между уровнем антигликановых антител и клинико-лабораторными параметрами было установлено, что у здоровых беременных уровень антител к ряду гликанов (№ 241, 1605, 1608, 2010) реципроктно связан с количеством лимфоцитов, тромбоцитов и аланинаминотрансферазы, что может свидетельствовать о регуляторной роли этих антител, поскольку лимфоцитоз, тромбоцитоз и повышение трансаминаз в крови относятся к патологическим состояниям (табл. 1). Выявленные связи могут быть отражением участия данных антител в регуляции контролируемой воспалительной реакции, которая развивается при нормальной беременности. Подобные, предположительно регуляторные связи, не выявляются при различных осложнениях беременности. При умеренной преэклампсии установлены слабые корреляционные связи между уровнем антигликановых антител и весом пациенток, что может указывать на патогенетическое значение этих антител, поскольку нарушение жирового обмена является фактором риска развития преэклампсии.

Оценка корреляционной связи между уровнем антигликановых антител и клинико-anamнестическими параметрами в исследуемых группах

Группа сравнения			
Класс антител/Номер гликана	p-value	Коэффициент r_s	Количественный признак
IgG_241	0,00182	-0,96496	Уровень лимфоцитов
IgG_497	0,021536	0,877659	Уровень лимфоцитов
IgG_2010	0,027397	-0,76376	АЛТ
IgM_1605	0,0294	-0,2814	Уровень тромбоцитов
IgM_1608	0,035091	0,741903	АЛТ
IgG_103	0,035707	0,740289	АСТ
IgG_1605	0,038978	-0,83415	Уровень лимфоцитов
IgG_1608	0,04305	-0,82543	Уровень лимфоцитов
Умеренная преэклампсия			
IgG_1608	0,011464	0,373639	Вес
IgM_398	0,03325	-0,31804	Вес

Анализ диагностической ценности антигликановых антител показал, что определение сочетаний антител более эффективно, по сравнению с определением единичных маркеров. Установлено, что определение сочетания антигликановых антител (№139_IgM и 2204_IgG) на сроках до 34 недель беременности позволяет ставить диагноз тяжелой преэклампсии с чувствительностью 83% и специфичностью 88% (AUC=0,93), что по существующим критериям для интервала AUC=0,9-1,0 характеризуется отличным качеством модели.

Рассчитана модель предсказательной способности риска развития умеренной преэклампсии на репрезентативной выборке беременных. Применив метод бинарной логистической регрессии определена вероятность развития умеренной преэклампсии по формуле:

$$P = 1 / (1 + e^{-z})$$

$$Z = 0,89 * X1 - 0,92 * X2 + 0,685 * X3 - 0,423 * X4 + 0,573 * X5 - 0,58 * X6 - 0,16 * X7;$$

где z – основание натурального логарифма и имеет значение 2,71828182845904;

X1 – IgG_3302; X2 – IgG_17; X3 – IgG_1209; X4 – IgG_2206; X5 – IgG_120; X6 – IgG_146; X7 – IgM_2502.

где X1-X6 – уровень IgG для антител к указанным гликанам; X7 – уровень IgM для антитела к гликану 2502.

Границы степеней вероятности развития умеренной преэклампсии:

- низкая вероятность $z = <0,1$;
- умеренная вероятность $z = 0,1-0,9$;
- высокая вероятность $z=>0,9$

Модель имеет чувствительность 92% и специфичность 78%.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить различные патогенетические особенности ранней и поздней преэклампсии, выявить диагностически значимые сочетания антител и рассчитать формулу прогноза развития умеренной и тяжелой преэклампсии, что чрезвычайно важно для практического применения в клинической практике.

Выводы

1. Развитие преэклампсии ассоциировано с высокой частотой хронических заболеваний мочевыделительной системы (OR=5,4), варикозной болезни (OR=4,5) нарушений жирового обмена 1 степени (OR=3,5), а также неразвивающейся беременностью (OR=3,4), антенатальной гибелью плода (OR=1,8) и наличием преэклампсии в анамнезе (OR=4,2).

2. Установлена прямая зависимость развития преэклампсии с угрозой прерывания беременности ($R=0,201$ $p<0,05$) с отслойкой хориона ($R=0,189$ $p<0,05$) в I и формированием истмико-цервикальной недостаточности ($R=0,193$ $p<0,05$) во II триместрах беременности, маловодием ($R=0,214$ $p<0,05$) и задержкой роста плода ($R=0,281$ $p<0,05$).

3. На основании анализа клинических и анамнестических данных разработана модель прогноза, позволяющая определить вероятность развития тяжелой преэклампсии с чувствительностью 78% и специфичностью 69%.

4. Преэклампсия характеризуется изменением углеводного профиля плаценты: выявлены изменения сиалосодержащих гликанов, манногликанов, гликанов с терминальными остатками N-ацетиллактозамина в синцитиотрофобласте и эндотелии капилляров терминальных ворсин плаценты. Наиболее выраженные изменения выявлены при преэклампсии тяжелой степени.

5. В плаценте при физиологической беременности установлено снижение содержания гликанов в составе гликокаликса синцитиотрофобласта по сравнению с эндотелием капилляров терминальных ворсин. При умеренной, и особенно тяжелой преэклампсии отсутствуют различия в содержании α 2,6-сиалозидов и гликанов с терминальными остатками ацетилгалактозамина между обеими исследованными структурами плаценты.

6. При преэклампсии выявлено значимое снижение антигликановых антител в периферической крови по сравнению с физиологически протекающей беременностью. Умеренная преэклампсия в отличие от тяжелой характеризуется более широким спектром антигликановых антител, что подтверждает их различный патогенез.

7. Установлена зависимость между уровнем антигликановых антител, клиничко-анамнестическими и лабораторными данными. При преэклампсии установлены связи уровня антител с хроническим пиелонефритом, ретрохориальной гематомой, артериальной гипертензией во II триместре, нарушением жирового обмена I степени. При физиологически протекающей беременности имеется принципиально иной характер корреляционных связей: отмечаются тесные связи (как прямые, так и обратные) с количеством лимфоцитов, уровнем АЛТ и АСТ, а также заболеваниями, передающимися половым путем в анамнезе.

8. Выявленные при преэклампсии сочетания антигликановых антител (IgM+IgG) в крови обладают высокой диагностической ценностью до 34 недель беременности (AUC=0,93) и позволяют верифицировать степень ее тяжести после 34 недель (AUC=0,91), что обосновывает перспективность их

дальнейшего использования в качестве диагностических и прогностических маркеров.

9. С использованием тренировочной и тестовой выборок разработана модель прогноза умеренной преэклампсии на поздних сроках (после 34 недель беременности) на основании определения антигликановых антител классов IgM и IgG, имеющая высокую диагностическую ценность (чувствительность 92% и специфичность 78%).

10. Алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии, включающий определение углеводного профиля плаценты и антигликановых антител позволяет снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Практические рекомендации

1. Пациенток с наличием хронических заболеваний мочевыделительной системы, нарушений жирового обмена 1 степени, а также неразвивающейся беременностью, антенатальной гибелью плода и наличием преэклампсии в анамнезе следует относить в группу риска по развитию преэклампсии.

2. У беременных с угрозой прерывания и отслойкой хориона в I триместре, формированием истмико-цервикальной недостаточности во II триместре беременности, маловодием и задержкой роста плода целесообразно использовать разработанную модель прогноза, позволяющую определить вероятность развития тяжелой преэклампсии.

3. В качестве диагностических и прогностических маркеров преэклампсии у беременных группы риска обосновано определение сочетания антигликановых антител (IgM + IgG) в периферической крови, позволяющих своевременно верифицировать степень ее тяжести и своевременно проводить лечебно-профилактические мероприятия.

4. Ведение беременных группы риска по развитию преэклампсии целесообразно согласно разработанному алгоритму диагностики и прогнозирования преэклампсии.

Алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии



Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Красный А.М., Ломова Н.А., Прозоровская К.Н., Ховхаева П.А., Сергунина О.А., Грачева М.И., **Тютюнник Н.В.**, Борис Д.А., Беднягин Л.А. Особенности антиоксидантной защиты в плаценте родильниц с преэклампсией. // XXI Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы»- Москва, 3-6 марта, 2015.- С.78-79.
2. Низяева Н.В., Куликова Г.В., Наговицина М.Н., Ляпин В.М., Логинова Н.С., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., **Тютюнник Н.В.**, Щеголев А.И. Роль толл-подобных рецепторов в развитии преэклампсии. // XXI Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы»- Москва, 3-6 марта, 2015.- С.108-109.

3. Сухих Г.Т., Красный А.М., Кан Н.Е., Майорова Т.Д., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Сергунина О.А., **Тютюнник Н.В.**, Грачева М.И., Вавина О.В., Озернюк Н.Д., Борис Д.А. Апоптоз и экспрессия генов ферментов антиоксидантной защиты в плаценте при преэклампсии. // **Акушерство и гинекология.**-2015.-№ 3.- С.11-15.

4. Куликова Г.В., Низяева Н.В., Наговицына В.М., Ляпин В.М., Логинова Н.С., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., **Тютюнник Н.В.**, Щеголев А.И. Особенности экспрессии TLR4 в структурных элементах плаценты при преэклампсии. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.**-2015.- Т.160, № 11.- С.676-679.

5. Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Navakouski M.E., Nikolaeva M.A., Kan N.E., Vavina O.V., Nikolaeva A.V., Tyutyunnik V.L., **Tyutyunnik N.V.**, Bot I., Sukhikh G.T., Bovin N.V. Antibodies to Hyaluronic Acidin Preeclampsia (Chapter 17). // *Glycobiology and Human Diseases*, February 17, 2016.- Gherman Wiederschain (Ed).- 324 p.- P.313-323.

6. Ховхаева П.А., Красный А.М., **Тютюнник Н.В.**, Сергунина О.А., Ганичкина М.Б., Амирасланов Э.Ю., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л. Апоптоз в плаценте при преэклампсии. // **Медицинский совет.**-2016- № 2.- С.102-103.

7. Прозоровская К.Н., Файзуллин Л.З., Ганичкина М.Б., Карнаухов В.Н., Трофимов Д.Ю., **Тютюнник Н.В.**, Чаусов А.А., Кан Н.Е. Взаимосвязь преэклампсии с изменениями мкРНК в плазме крови. // Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика».- Москва, 4-7 апреля.-2016.- С.185-186.

8. Сергунина О.А., Ховхаева П.А., **Тютюнник Н.В.**, Прозоровская К.Н., Караваева А.Л., Красный А.М. Антиоксидантная защита при преэклампсии и при нормальной беременности. // Всероссийский конгресс с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика».- Москва, 4-7 апреля.-2016.- С.186-187.

9. Ховхаева П.А., **Тютюнник Н.В.**, Красный А.М., Сергунина О.А., Тимофеева Л.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л. Оксидативный стресс и экспрес-

сия генов ферментов антиоксидантной защиты в плаценте при преэклампсии.

// **Фарматека.**-2016.- № 3, (316).- С.74-76.

10. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Новаковский М.Е., Николаева М.А., Кан Н.Е., Вавина О.В., Николаева А.В., **Тютюнник Н.В.**, Сергунина О.А., Бот И., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Аутоантитела к антигенам эндотелия при преэклампсии. // **Акушерство и гинекология.**-2016.-№ 3.- С.24-31.

11. Красный А.М., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Волгина Н.Е., Сергунина О.А., **Тютюнник Н.В.**, Беднягин Л.А. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности. // **Акушерство и гинекология.**-2016.-№ 5.- С.90-95.

12. Кан Н.Е., Беднягин Л.А., Долгушина Н.В., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Сергунина О.А., **Тютюнник Н.В.**, Амирасланов Э.Ю. Прогнозирование развития преэклампсии у беременных на основании клинико-анамнестических факторов риска. // **Акушерство и гинекология.**-2016.-№ 6.- С.39-44.

13. Прозоровская К.Н., Файзуллин Л.З., Ганичкина М.Б., Карнаухов В.Н., Трофимов Д.Ю., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Сергунина О.А., Чаусов А.А., **Тютюнник Н.В.**, Мантрова Д.А. Количественная оценка экспрессии микроРНК в плазме крови беременных с преэклампсией. // **Акушерство и гинекология.**-2016.-№ 12.- С.47-52.

14. Низяева Н.В., Калакуцкая А.Н., Ляпин В.М., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Прозоровская К.Н., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Кириллов М.Ю., **Тютюнник Н.В.**, Щеголев А.И. Роль инфекционно-воспалительного фактора в нарушении иммунологической толерантности при преэклампсии. // **Успехи современной биологии.**-2016.- Т.136, № .6- С.580-585.

15. Мирошина Е.Д., **Тютюнник Н.В.**, Храменко Н.В., Харченко Д.К., Кан Н.Е. Диагностика преэклампсии на современном этапе. // **Проблемы репродукции.**-2017.- Т. 23, № 1.- С.96-102.

16. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитько А.С., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., **Тютюнник Н.В.**, Мантрова Д.А., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Репертуары антигликановых антител при физиологической и осложненной беременности. // **Российский аллергологический журнал.**-2017.- № 1.- С.49-51.

17. **Тютюнник Н.В.**, Харченко Д.К., Красный А.М., Ховхаева П.А., Кан Н.Е. Уровень активных форм кислорода при преэклампсии. // X Юбилейный региональный научно-образовательный форум «Мать и дитя».- Геленджик, 28-30 июня, 2017.- С.118-119.

18. Харченко Д.К., **Тютюнник Н.В.**, Асташкин Е.И., Орехова Н.С., Новикова А.Н. Спонтанное образование радикалов кислорода в пробах цельной крови при преэклампсии. // X Юбилейный региональный научно-образовательный форум «Мать и дитя».- Геленджик, 28-30 июня, 2017.- С.119-120.

19. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитько А.С., **Тютюнник Н.В.**, Мантрова Д.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Поиск биомаркеров больших акушерских синдромов на основе использования высокопроизводительного микрочипа // Мать и дитя: материалы XVIII Всерос. научно-образовательного форума. – М., 27-29 сентября 2017.- С.24-25.

20. Харченко Д.К., **Тютюнник Н.В.**, Борис Д.А., Сергунина О.А., Асташкин Е.И., Орехова Н.С. Функциональное состояние фагоцитов крови при преэклампсии. // Материалы XII международ. конгресса по репродуктивной медицине.- М., 16-19 января 2018.- С.130-132.

21. Зиганшина М.М., Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитько А.С., **Тютюнник Н.В.**, Мантрова Д.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Спектр и диагностическое значение антигликановых антител, выявляемых при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации. // Российский аллергологический журнал. - 2018.- Т.15, № 1 (часть 2).- Материалы Всероссийской конференции «Клиническая иммуноло-

гия и аллергология – практическому здравоохранению».- Москва, 27-28 февраля, 2018.- С.37-39.

22. Кан Н.Е., **Тютюнник Н.В.**, Беднягин Л.А., Харченко Д.К., Долгушина Н.В., Донников А.Е., Тютюнник В.Л. Комплексный подход к прогнозированию преэклампсии с учетом молекулярно-генетических и клинических факторов // **Акушерство и гинекология.**-2018.-№ 4.- С.35-41.

23. Зиганшина М.М., **Тютюнник Н.В.**, Шилова Н.В., Хасбиуллина Н.Р., Ракитько А.С., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Спектр аутоантител к гликанам при ранней и поздней преэклампсии // Аутоиммунные и иммунодефицитные состояния: материалы III Всерос. конгресса – М., 16-17 ноября 2018.- С.18.

24. Харченко Д.К., Асташкин Е.И., Кан Н.Е., **Тютюнник Н.В.**, Орехова Н.С., Борис Д.А., Тютюнник В.Л. Диагностическая значимость преактивированных нейтрофилов при преэклампсии // **Акушерство и гинекология.**-2018.-№ 11.- С.24-30.