

На правах рукописи

БОРИС

Даяна Амоновна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ДИАГНОСТИКА
ПРЕЭКЛАМПСИИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ УРОВНЯ
МОНОЦИТАРНО–МАКРОФАГАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА И
МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА**

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 Тютюнник Виктор Леонидович
кандидат биологических наук Красный Алексей Михайлович

Официальные оппоненты:

Доброхотова Юлия Эдуардовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, заведующая

Цахилова Светлана Григорьевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии стоматологического факультета, профессор

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


Защита состоится «17» ноября 2020 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://www.science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Boris%20D.A.-dissertation_1.pdf

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Преэклампсия относится к числу наиболее тяжелых осложнений беременности, родов и послеродового периода, являясь ведущей причиной материнской и перинатальной заболеваемости (Сидорова И.С. и соавт., 2018; Filipiek A, Jurewicz E., 2018). По данным различных авторов преэклампсия осложняет от 3 до 8% беременностей во всем мире (Савельева Г.М. и соавт., 2013; Шувалова М.П. и соавт., 2014; Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2016; Steegers E.A. et al., 2010; Ramos J.G.L et al., 2017).

На сегодняшний день вопросы этиологии и патогенеза преэклампсии изучены недостаточно (Кан Н.Е. и соавт., 2016; Цахилова С.Г. и соавт., 2019; Weissgerber T.L. et al., 2014; Bartsch E. et al., 2016). Среди основных причин развития преэклампсии выделяют: патологическую инвазию трофобласта, эндотелиальную дисфункцию, нарушение в работе про- и антиоксидантной систем, дисбаланс ангиогенных и антиангиогенных факторов (Сухих Г.Т. и соавт., 2015; Макацария А.Д. и соавт., 2017; Щеголев А.И. и соавт., 2020; Sahay A.S. et al., 2015; Feldstein O. et al., 2019). В последние годы пристальное внимание ученых обращено к изучению роли иммунной дезадаптации и генетически обусловленным нарушениям в генезе данного состояния (Тютюнник В.Л. и соавт., 2013; Ходжаева З.С. и соавт., 2015; Игнатко И.В. и соавт., 2017; Udenze I. et al., 2015; Yan L. et al., 2018). Иммунологические нарушения при преэклампсии характеризуются развитием системной воспалительной реакции, которая связана с активностью периферических гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов (Чабанова Н.Б. и соавт., 2017; Cornelius D.C. 2018; Draijer C. et al., 2018). Среди иммунокомпетентных клеток особый интерес представляют моноциты, к основным функциям которых относится: поглощение и презентация антигенов Т-лимфоцитам, а также активация синтеза цитокинов, способствующая развитию воспаления (Красный А.М. и соавт., 2016; Redman C.W. et al., 2009). Учитывая, что моноциты являются ведущими клетками им-

мунного ответа, не исключена роль их фенотипических изменений в реализации воспалительных реакций, что определяет интерес в изучении данных клеток при преэклампсии (Панова И.А. и соавт., 2018; Gervasi M.T. et al., 2001; Tang M.X. et al., 2015).

Другим важным аспектом в патогенезе преэклампсии может являться роль эпигенетических нарушений, влияющих на уровень экспрессии различных генов, которые входят в сигнальные пути, регулирующие инвазию трофобласта, ангиогенез, клеточную адгезию, систему ренин-ангиотензин-альдостерон, а также иммунный ответ (Кан Н.Е. и соавт., 2018; Kim C.J. et al., 2015; Benton S.J. et al., 2018; Peixoto A.V. et al., 2018; Yan Y.H. et al., 2018). К наиболее изученным эпигенетическим механизмам относится метилирование генов в области CpG-динуклеотидов в промоторных регионах ДНК, которое связано с транскрипционным молчанием. Вышеуказанные механизмы могут лежать в основе реализации и регуляции силы системного воспалительного ответа, что в свою очередь также отражается на тяжести течения данной патологии (Серов В.Н. и соавт., 2016; Mayne V.T. et al., 2017; Rahat V. et al., 2017). Следует отметить, что генетическая компонента преэклампсии может составлять до 50%, а подавляющее количество исследований в данной области характеризуется противоречивостью полученных результатов.

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным и перспективным изучение моноцитарно-макрофагального компонента, а также определение уровня метилирования генов врожденного иммунитета, для уточнения новых звеньев патогенеза, оптимизации прогнозирования и диагностики преэклампсии.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время, особое внимание уделяется изучению гиперактивации иммунной системы и ее роли в процессах патологической плацентации, реализации эндотелиальной дисфункции и системного воспалительного ответа при преэклампсии. Моноциты, являясь клетками иммунной системы, при-

нимают участие в формировании как нормального, так и патологического иммунного ответа при беременности (Сухих Г.Т. и соавт., 2012; Apicella C. et al., 2019).

Также известно, что уровень системного воспалительного ответа регулируется различными генами, которые находятся в состоянии экспрессии или могут быть гиперметилированы – выключены. В работах ряда авторов продемонстрирована роль моноцитов, а также метилирования генов врожденного иммунитета при осложненном течении беременности, в том числе и при преэклампсии (Сереброва В.Н. и соавт, 2019; Ziegler-Heitbrock L., 2014; Guilliams M., 2018; Davis F.M., Gallagher K.A., 2019).

Вышеизложенное послужило основой углубленного изучения данного вопроса в представленном научном исследовании.

Цель исследования

Оптимизация прогнозирования и диагностики преэклампсии на основании изучения особенностей моноцитарно-макрофагального компонента и метилирования генов врожденного иммунитета.

Задачи исследования

1. Выявить клиничко-anamнестические факторы риска развития преэклампсии и разработать модель ее прогноза.
2. Провести анализ особенностей течения беременности, родов, послеродового периода, состояние плода и новорожденного при преэклампсии.
3. Определить фенотипические изменения в моноцитарно-макрофагальной системе в крови и плаценте при преэклампсии.
4. Изучить профиль метилирования генов врожденного иммунитета в плазме крови и плаценте при преэклампсии.
5. Разработать алгоритм прогнозирования и диагностики преэклампсии на основании выделенных предикторов для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Научная новизна

Проведен анализ клинико-anamнестических данных, который позволил определить факторы риска и разработать прогностическую модель развития преэклампсии.

Изучены фенотипические особенности моноцитарно-макрофагального компонента в крови и доказана связь между изменением фенотипа моноцитов и тяжестью преэклампсии.

Создана модель оценки степени тяжести преэклампсии включающая определение содержания классических CD16-негативных моноцитов в крови.

Выявлена корреляционная зависимость между увеличением содержания CD68⁺ клеток в ворсинах плаценты и тяжестью преэклампсии, что указывает на потенциальную роль плаценты в активации моноцитарно-макрофагального компонента крови и способствует уточнению новых звеньев патогенеза данного осложнения.

Установлено, что ген *TLR2* и импринтинг контролирующая область ICR *IGF2/H19* имеют aberrантное метилирование в плаценте и плазме крови при преэклампсии. Показана корреляционная связь между уровнем метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* в плаценте и плазме крови, что определяет целесообразность их использования в качестве прогностических предикторов.

Теоретическая и практическая значимость

Уточнены клинико-anamнестические предикторы преэклампсии. На их основании разработана модель прогноза, которая позволит сформировать группу риска развития данной патологии.

Обосновано изучение содержания CD16-негативных моноцитов в крови беременных для верификации степени тяжести преэклампсии.

Для прогнозирования преэклампсии целесообразным является определение уровня метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* в крови беременных

Внедрение в клиническую практику алгоритма прогнозирования и диагностики преэклампсии позволяет снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Положения, выносимые на защиту

1. Прогностическая модель, включающая такие факторы риска как: возраст старше 36 лет, отягощенный анамнез по преэклампсии и сердечно-сосудистым заболеваниям, нарушение жирового обмена, эктопия шейки матки, носительство стрептококка группы В, наследственные тромбофилии позволяет определить вероятность развития преэклампсии с чувствительностью 70,3% и специфичностью 95,6%.

2. Преэклампсия ассоциирована с изменением фенотипа субпопуляций моноцитов. Умеренная преэклампсия сопровождается снижением относительного содержания CD16-негативных моноцитов в периферической крови ниже пороговой отметки 49,8, а тяжелая – ниже 19,8, что может быть использовано для верификации степени ее тяжести. Повышение содержания CD68⁺ клеток в плаценте при преэклампсии может указывать на потенциальную роль плаценты в активации моноцитарно-макрофагального компонента крови в патогенезе данного осложнения.

3. Преэклампсия сопряжена с aberrантным метилированием гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области *ICR IGF2/H19* в плаценте и плазме крови. Установленная корреляция между уровнем метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области *ICR IGF2/H19* в плаценте и плазме крови обосновывает целесообразность их использования в качестве предикторов развития преэклампсии.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы научной работы, определении и постановке цели и задач исследования, разработке дизайна, систематизации данных литературы по теме диссертации и анализе клинико-анамнестических данных, лично осуществлял обследование и ведение

женщин с преэклампсией на всех этапах беременности, родов и в послеродовом периоде. Автором производился забор биологического материала, а также частичная интерпретация лабораторных результатов. Диссертантом проведен анализ медицинской документации, обобщение и статистическая обработка данных, а также 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 результатов

Основные положения работы представлены на: XXI^{ом} Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы» (Москва, 2015); XII^{ом} Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018); XIX^{ом} Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Москва, 2018); III^{ей} Всероссийской научно-практической конференции «Неотложные состояния в акушерстве» (Москва, 2019); XII^{ом} региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Сочи, 2019).

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

Внедрение результатов исследования

Алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии используется в работе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты диссертации, практические рекомендации, разработанные в результате проведенного научного исследования, используются в учебном процессе в виде практических занятий и лекций для клинических ординаторов, аспирантов, а также для повышения квалификации врачей акушеров-гинекологов из различных регионов России.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК.

Получен патент на изобретение № 2712228 от 27 января 2020 года «Способ определения степени тяжести преэклампсии по относительному содержанию CD16+ моноцитов в периферической крови беременных».

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа изложена на 165 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 41 рисунком и 18 таблицами. Библиографический указатель включает 317 работ цитируемых авторов, из них 63 – на русском и 254 – на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для уточнения факторов риска развития преэклампсии было проведено ретроспективное исследование, в которое были включены 222 беременные, родоразрешенные в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 01.10.2017 г по 01.10.2019 г. В основную группу вошли 108 пациенток, из которых у 72 был поставлен диагноз умеренная преэклампсия и у 36 – тяжелая. В группу сравнения вошли 114 женщин с физиологическим течением беременности.

На следующем этапе работы были изучены фенотипические особенности моноцитарно-макрофагального компонента и профиль метилирования генов с потенциальной ролью в генезе преэклампсии. Были отобраны 80 пациенток, из которых основную группу составили 40 беременных с диагнозом преэклампсия (25 – с умеренной и 15 – с тяжелой формой течения) и 40 пациенток с физиологическим течением беременности. На данном этапе исследование носило характер «случай-контроль».

Критериями включения в исследование для основной группы являлись: одноплодная спонтанная беременность, осложненная преэклампсией, подтвержденной данными клинико-лабораторных исследований. Для группы сравнения – отсутствие преэклампсии. Критерии невключения для всех участников исследования: многоплодная беременность, беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий, сахарный диабет, хроническая артериальная гипертензия, заболевания почек в стадии декомпенсации, трансплантированные органы, аутоиммунные и онкологические заболевания. Критерии исключения для всех участников исследования: хромосомные аномалии у плода, врожденные пороки развития плода, антенатальная гибель плода.

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)». Беременные были ознакомлены с целью и методами исследования и подписали информированное согласие на участие в нем. Было проведено изучение клинико-anamнестических данных, особенностей течения, исходов беременностей и способа родоразрешения, а также изучение состояния плодов и новорожденных. Наряду со стандартными методами в работе применялись методы проточной цитофлуориметрии, иммуногистохимии и вестерн-блот для изучения моноцитарно-макрофагального компонента, а также метод MS-NRM для изучения метилирования генов врожденного иммунитета.

Все результаты вносились в специально разработанную тематическую карту и в электронные таблицы с последующим анализом при помощи современных методов статистической обработки.

Результаты исследования и их обсуждение

Все пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по исходной клинико-anamнестической характеристике, однако в основной группе

превалировали женщины старшей возрастной группы с более высоким индексом массы тела. Возраст беременных в основной группе составил 32 (28;37) года, в группе сравнения – 30 (27;32) лет ($p=0,001$), индекс массы тела – 28,2 (24,9;31,2) и 25,1 (24,5;27,3) по группам соответственно ($p<0,001$).

Принимая во внимание высокий риск развития преэклампсии на фоне генетической предрасположенности был изучен наследственный анамнез беременных. Среди заболеваний у родственников первой линии в основной группе относительно группы сравнения статистически значимо чаще выявлялись: артериальная гипертензия (28 случаев – 25,9%) и (1 – 0,9%), инсульты (13 – 12,0%) и (1 – 0,9%) и инфаркты (10 – 9,3%) и (1 – 0,9%) в молодом возрасте ($p<0,05$). Венозные тромбоэмболические осложнения у родственников были выявлены только в основной группе и составили (8 случаев – 7,4%), ($p<0,05$).

Учитывая указание ряда авторов (Кан Н.Е. и соавт., 2016; Липатов И.С. и соавт., 2017; Conde-Agudelo, A. et al., 2008) на высокую частоту развития преэклампсии на фоне соматической патологии, была изучена ее структура в исследуемых группах. В основной группе по сравнению с физиологической беременностью превалировали: хронический гастрит (13 случаев – 12,0%) и (4 – 3,5%), нарушение жирового обмена (21 – 19,4%) и (1 – 0,9%), ($p<0,05$). Наследственные тромбофилии (27 – 25,0%) и гипофункция щитовидной железы (9 – 8,3%) встречались только в основной группе ($p<0,05$). При изучении гинекологической заболеваемости в основной группе статистически значимо чаще относительно группы сравнения выявлялись: эктопия шейки матки (8 случаев – 7,4%) и (1 – 0,9%), миома матки (17 – 15,7%) и (5 – 4,4%) и бесплодие I в анамнезе (10 – 9,3%) и (1 – 0,9%), ($p<0,05$).

Учитывая роль инфекционного фактора в развитие преэклампсии были проанализированы возбудители заболеваний мочеполовой системы, среди которых статистически значимо чаще выявлялся стрептококк группы В в основной группе (9 случаев – 8,3%) и (2 – 1,7%) по сравнению с физиологической беременностью ($p<0,05$).

Особый интерес представляло изучение репродуктивного анамнеза. Количество первобеременных первородящих в основной группе составило (56 случаев – 51,8%) и (39 – 34,2%) в группе сравнения ($p=0,009$). При анализе исходов предыдущих беременностей преэклампсия в анамнезе в основной группе была отмечена у 9 (8,3%) пациенток ($p<0,001$).

Вышеизложенные результаты согласуются с данными литературы о факторах риска развития преэклампсии, таких как: возраст (Ходжаева З.С. и соавт., 2015), первобеременные (Рябова Е.С. и соавт., 2017; Redman E.K. et al., 2019), отягощенный семейный анамнез по сердечно-сосудистым заболеваниям (Фетисова И.Н. и соавт., 2015; Bartsch E. et al., 2016), болезни мочеполовой системы (Низяева Н.В. и соавт., 2016), нарушение жирового обмена (Кан Н.Е. и соавт., 2016), наследственные тромбофилии (Бицадзе В.О. и соавт., 2012;).

Учитывая выявленные клиничко-анамнестические факторы риска, был применен метод множественной логистической регрессии и разработана прогностическая модель развития преэклампсии:

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

где e – основание натурального логарифма и имеющее значение 2,71828182845904;

$$z = -3,711 - 0,101 * X1 + 3,776 * X2 + 21,489 * X3 - 1,594 * X4 + 22,282 * X5 + 2,893 * X6 + 21,701 * X7 + 20,304 * X8$$

где $X1$ – возраст беременных старше 36 лет, $X2$ – артериальная гипертензия у родственников первой линии $X3$ – инфаркт миокарда и/или острое нарушение мозгового кровообращения у родственников первой линии в возрасте до 50 лет, $X4$ – эктопия шейки матки, $X5$ – носительство стрептококка группы В, $X6$ – нарушение жирового обмена, $X7$ – наследственные тромбофилии, $X8$ – преэклампсия в анамнезе.

Чувствительность данной модели составила 70,3% и специфичность 95,6%. Оптимальный порог (cut off) – 0,47.

Изучение течения беременности, родов, послеродового периода, а также состояния здоровья новорожденных было проведено с учетом тяжести преэклампсии. В I триместре настоящей беременности статистически значимо чаще выявлялись: ранний токсикоз – при умеренной (38 случаев– 52,8%) и тяжелой (19 – 52,8%) преэклампсии, относительно группы сравнения (14 – 12,3%) ($p < 0,001$), угроза прерывания беременности (15 – 20,8%), (14 – 38,9%) и (4 – 3,5%) ($p < 0,001$), острая респираторно-вирусная инфекция – (9 – 12,5%), (6 – 16,7%) и (2 – 1,7%) ($p \leq 0,002$) по группам соответственно. Во II триместре статистически значимо чаще преобладали угроза прерывания беременности в группах умеренной (12 – 16,7%) и тяжелой (8 – 22,2%) преэклампсии относительно группы сравнения (2 – 1,7%) ($p < 0,001$). Такие осложнения, как анемия (8 – 11,1%), (1 – 2,8%) и (2 – 1,7%), гестационный сахарный диабет (5 – 6,9%), (1 – 2,8%) и (0 – 0%), острая респираторно-вирусная инфекция (12 – 16,7%), (3 – 8,3%) и (3 – 2,6%) имели достоверные различия только при сравнении умеренной преэклампсии с физиологической беременностью ($p \leq 0,001$). Следует отметить, что в группе с тяжелой преэклампсией была диагностирована задержка роста плода в 13,9% (5 случаев), а у беременных с умеренной преэклампсией – в 1,4% (1 случай) ($p \leq 0,05$). В III триместре достоверно чаще была отмечена угроза преждевременных родов в группах с умеренной (6 случаев – 8,3%) и с тяжелой (5 – 13,9%) преэклампсией, относительно группы сравнения (1 – 0,9%) ($p \leq 0,01$), анемия (15 – 20,8%), (7 – 19,4%) и (4 – 3,5%) ($p < 0,001$), задержка роста плода (6 – 8,3%), (8 – 22,2%) и (1 – 0,9%) ($p \leq 0,01$).

Как при умеренной, так и при тяжелой преэклампсии статистически значимо чаще были отмечены более ранние сроки родоразрешения 37,0 (35,7;39,0) и 35,0 (29,7;37,0) недель, относительно группы сравнения 39,0 (38,1;39,4) недель ($p < 0,001$), что по-видимому обусловлено тяжестью преэклампсии. Частота абдоминального родоразрешения по экстренным показаниям при тяжелой преэклампсии составила 61,1% (22 случая), при умеренной

– 40,3% (29 наблюдений) ($p < 0,001$). В структуре показаний к операции кесарева сечения в обеих группах преобладали: нарастание тяжести преэклампсии и ухудшение состояния плода. В то время как у пациенток группы сравнения в 92,9% (106 случаев) роды произошли через естественные родовые пути ($p < 0,001$).

Особый интерес представляло изучение здоровья новорожденных. Все дети родились живыми. В группах с умеренной и тяжелой преэклампсией отмечалась более низкие массо-ростовые показатели и оценка состояния по шкале Апгар, что по-видимому связано с более ранними сроками родоразрешения у этих пациенток. В структуре неонатальной заболеваемости статистически значимо чаще в группах с умеренной и тяжелой преэклампсией относительно физиологической беременности выявлялись: врожденная пневмония – (9 – 12,5%), (12 – 33,3%) и (1 – 0,9%), респираторный дистресс-синдром – (5 – 6,9%), (5 – 13,9%) и (1 – 0,9%), анемия – (6 – 8,3%), (7 – 19,4%) и (1 – 0,9%) по группам соответственно ($p < 0,01$). Асфиксия легкой (3 – 4,2%), (3 – 8,3%) и средней (2 – 2,8%), (5 – 13,9%) степени тяжести, внутрижелудочковые кровоизлияния I степени (2 – 2,8%), (3 – 8,3%), дискинезия желудочно-кишечного тракта – (3 – 4,2%), (3 – 8,3%), были выявлены только в группах с умеренной и тяжелой преэклампсией ($p < 0,01$). ДВС-синдром был диагностирован в группах с умеренной (в 1 случае – 0,9%) и тяжелой (3 – 8,3%) преэклампсией ($p = 0,013$).

Данные литературы свидетельствуют о том, что дисфункциональный иммунный ответ в организме матери при преэклампсии проявляется измененной функциональной активностью моноцитарно-макрофагального компонента, который является наиболее важной единицей врожденного иммунитета (Mildner A. et al., 2016; Kapellos T.S. et al., 2019). При изучении моноцитарно-макрофагального компонента крови с помощью проточной цитофлуориметрии были идентифицированы три субпопуляции моноцитов: классические CD14⁺⁺CD16⁻HLA-DR⁺, промежуточные CD14⁺⁺CD16⁺HLA-DR⁺ и неklas-

сические CD14+CD16++HLA-DR+. В группах пациенток с умеренной и тяжелой преэклампсией наблюдалось снижение классических CD16-негативных моноцитов относительно группы сравнения ($p < 0,05$). Причем в группе с тяжелой преэклампсией уровень классических моноцитов был значительно ниже, чем в группе с умеренной. Содержание классических CD16-негативных моноцитов в контрольной группе составило 56,6% у женщин при умеренной преэклампсии – 40,7% ($p = 0,01$), при тяжелой – 17,4% ($p = 0,001$) (рис. 1).

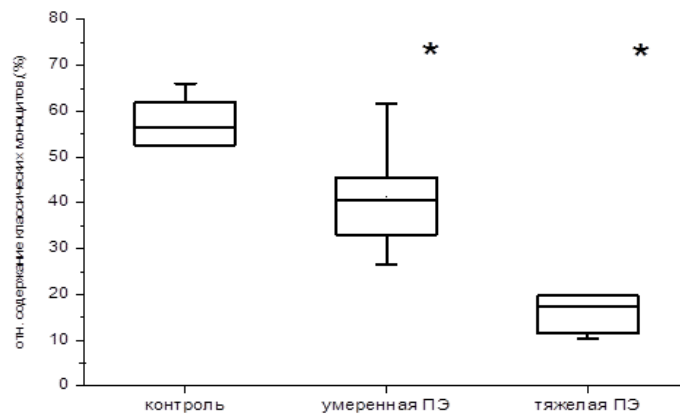


Рисунок 1. Относительное содержание классических CD16-негативных моноцитов в периферической крови беременных

С целью определения диагностической эффективности содержания классических CD16-негативных моноцитов в периферической крови был проведен ROC-анализ (рис. 2).

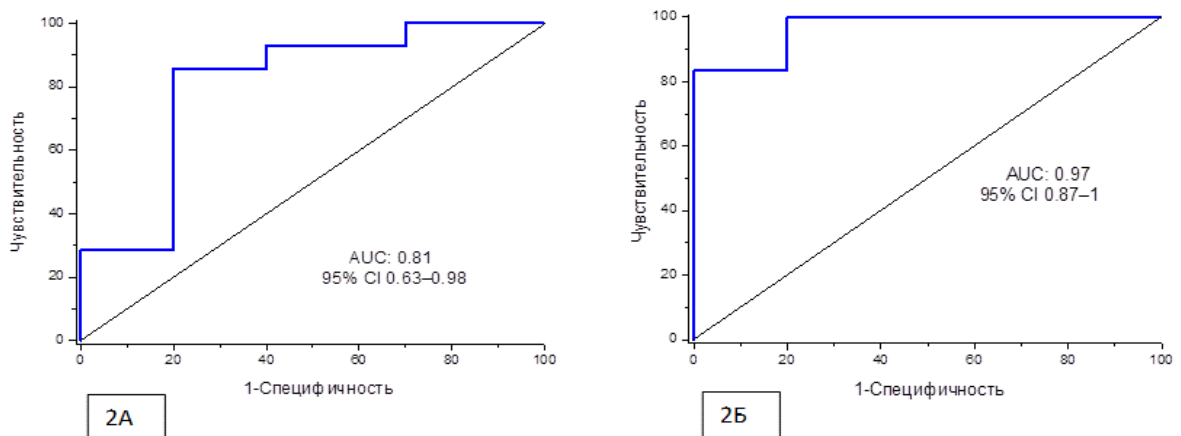


Рисунок 2. Оценка диагностической эффективности с помощью ROC-анализа для умеренной (2А) и тяжелой (2Б) преэклампсии по относительному содержанию классических CD16-негативных моноцитов

Согласно проведенному ROC-анализу, для умеренной преэклампсии (рис. 2А) $AUC=0,81$ (95% CI 0,63-0,98), что указывает на «хорошее» качество модели. Cut off – 49,8 при уровне чувствительности 86% и специфичности 80% ($p<0,001$). Согласно проведенному ROC-анализу, для тяжелой преэклампсии (рис. 2Б) $AUC=0,96$ (95% CI 0,87-1), что указывает на «отличное» качество данной модели. Cut off – 19,8 при уровне чувствительности 83% и специфичности 100% ($p<0,001$).

Содержание неклассических и промежуточных CD16-положительных моноцитов в периферической крови было повышено в группах как с умеренной, так и с тяжелой преэклампсией. В случае неклассических моноцитов их содержание в периферической крови в контрольной группе составило 12,7%, при умеренной преэклампсии – 16,1%, при тяжелой – 26,1%. Однако, достоверные различия наблюдались только при сравнении тяжелой преэклампсии с контрольной группой ($p<0,05$) (рис. 3).

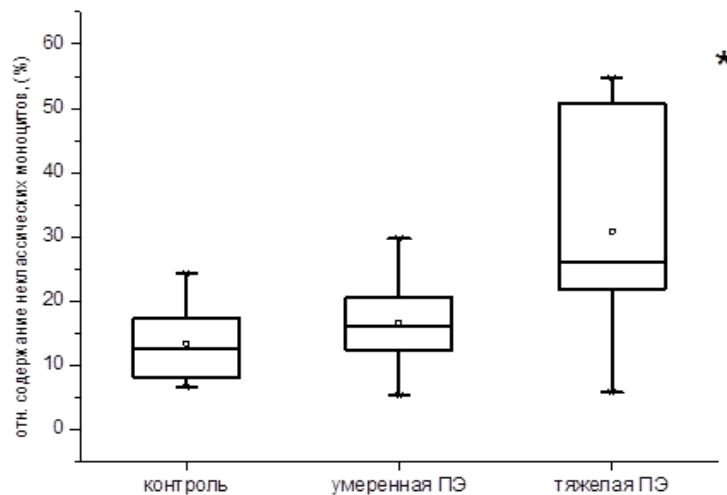


Рисунок 3. Относительное содержание неклассических CD16-положительных моноцитов в периферической крови беременных

Согласно проведенному ROC-анализу, для тяжелой преэклампсии $AUC=0,65$ (95% CI 0,42-0,89), что указывает на «удовлетворительное» качество данной модели. Cut off – 12,3 при уровне чувствительности 85% и специфичности 55% ($p<0,001$).

При изучении промежуточных моноцитов их содержание в периферической крови в группе сравнения составило 31,5%, при умеренной преэклампсии – 40,3%, при тяжелой – 49,2%. Достоверные различия наблюдались только при сравнении тяжелой преэклампсии с контрольной группой ($p < 0,05$) (рис. 4).

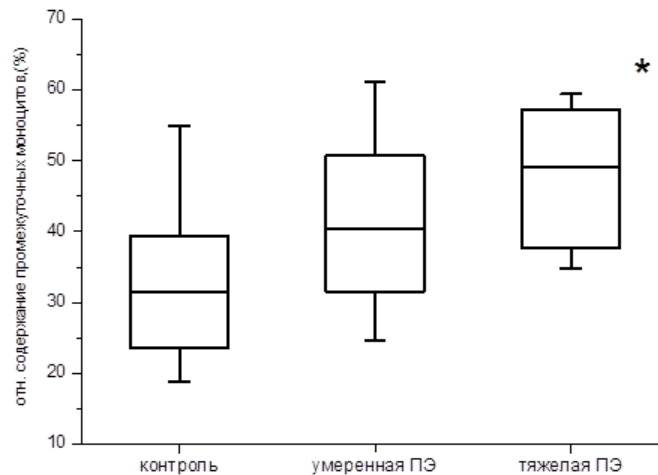


Рисунок 4. Относительное содержание промежуточных CD16-положительных моноцитов в периферической крови беременных

Согласно проведенному ROC-анализу, для тяжелой преэклампсии $AUC=0,7$ (95% CI 0,5-0,91), что указывает на «хорошее» качество данной модели. Cut off – 48,9 при уровне чувствительности 43% и специфичности 90% ($p < 0,001$).

Полученные данные показали, что наибольшей прогностической значимостью в отношении верификации степени тяжести преэклампсии обладают классические CD16-негативные моноциты. Таким образом, относительное содержание CD16-негативных моноцитов в периферической крови беременных с преэклампсией ниже пороговой отметки 49,8, но выше 19,8 свидетельствует о течении данной патологии в умеренной форме. Относительное содержание CD16-негативных моноцитов в периферической крови ниже пороговой отметки 19,8 может быть использовано для верификации тяжелой степени преэклампсии.

Наряду с фенотипическими особенностями моноцитов важным является определение их активации. Несмотря на то, что механизмы активации моноцитов при беременности остаются неизвестными, предполагается, что ключевую роль в этом играет плацента (Садекова О.Н. и соавт., 2012; Young B.C et al., 2010; Faas M.M., 2017). Было изучено содержание CD68 (кластер дифференцировки 68, макросиалин) гликопротеина из семейства LAMP, экспрессирующегося на моноцитах крови и тканевых макрофагах, и являющегося их маркером. Содержание CD68+ клеток в ворсинах плаценты представлено на рис. 5.

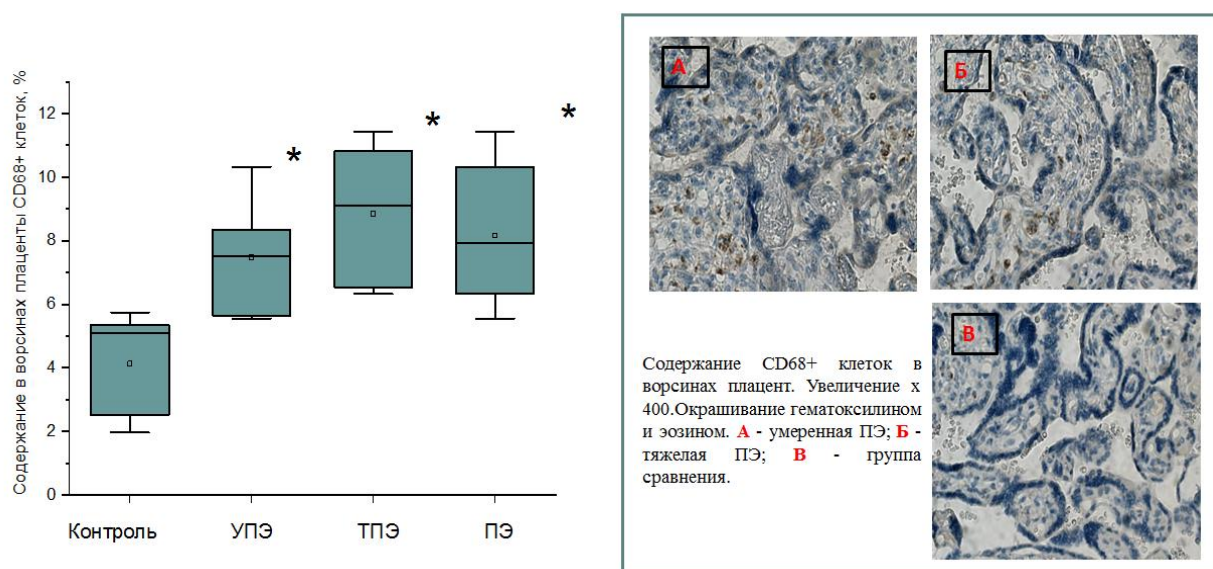


Рисунок 5. Содержание CD68+ клеток в ворсинах плацент в % от общего количества клеток ворсин

В основной группе было выявлено статистически значимое увеличение содержания CD68+ клеток внутри ворсин плаценты по сравнению с физиологической беременностью. Содержание CD68+ клеток в группе с преэклампсией составило 7,9% (10,3;6,3), в группе сравнения – 5,1% (2,5;5,3) ($p < 0,001$).

При сравнительном анализе содержания CD68+ клеток внутри ворсин в группах умеренной и тяжелой преэклампсии относительно физиологической беременности также были получены статистические различия между группами. Содержание CD68+ клеток при умеренной преэклампсии составило

7,5% (5,6;8,3), при тяжелой – 9,1% (6,5;10,8), в группе сравнения – 5,1% (2,5;5,3) ($p < 0,001$).

Результаты, полученные при иммуногистохимическом методе, были подтверждены методом вестерн-блота и представлены на рисунке 6. При сравнительном анализе основной группы с физиологической беременностью удалось установить статистически значимые различия в уровне экспрессии белка CD68. Относительный уровень экспрессии белка CD68 в группе с ПЭ составил $57,2 \pm 11,9$ отн. ед., в группе сравнения – $42,5 \pm 7,4$ отн. ед., ($p < 0,01$).

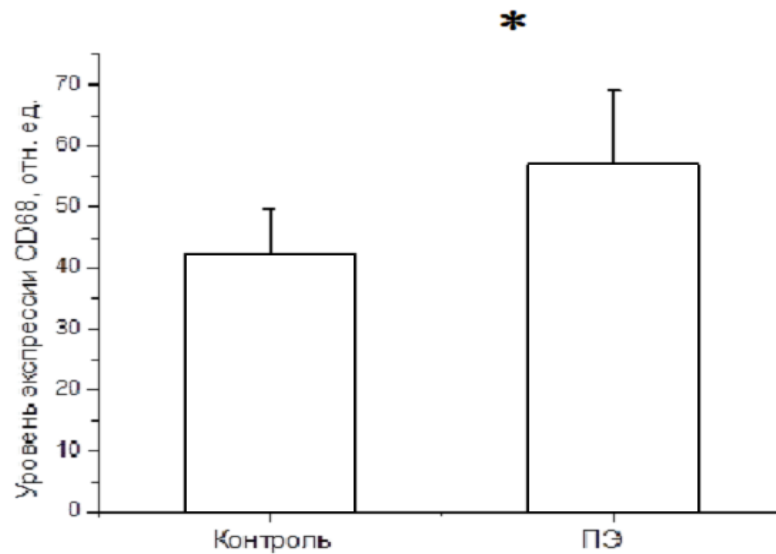


Рисунок 6. Результаты вестерн-блота. Оценка уровня экспрессии белка CD68 в плаценте при преэклампсии и физиологической беременности

Предполагается, что в патогенетические механизмы развития преэклампсии вовлечены эпигенетические нарушения (Павлова К.К. и соавт, 2010; Mayne В.Т. et al., 2017; Rahat В. et al., 2017). В связи с чем был изучен профиль метилирования генов врожденного иммунитета с потенциальной ролью в генезе преэклампсии (*HLA-G*, *GNA12*, *VEGF*, *TIMP2*, *MMP2*, *DAPK3*, *LEP*, *SOCS2*, *MEST*, *DKK3*, *TLR2*, *BMP6*, *RASSF1*, *CEBPA*, *CDO1*, *DFNA5*, *CTCF*, *PITX2*, *PTEN*, *SEPT9*, *CDH1*, ICR (импринтинг контролирующая область) *IGF2/H19*). На первом этапе изучение метилирования генов проводилось в плаценте. Анализ кривых плавления (MS-HRM) установил статически значимые различия в уровне метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* (рис. 7).

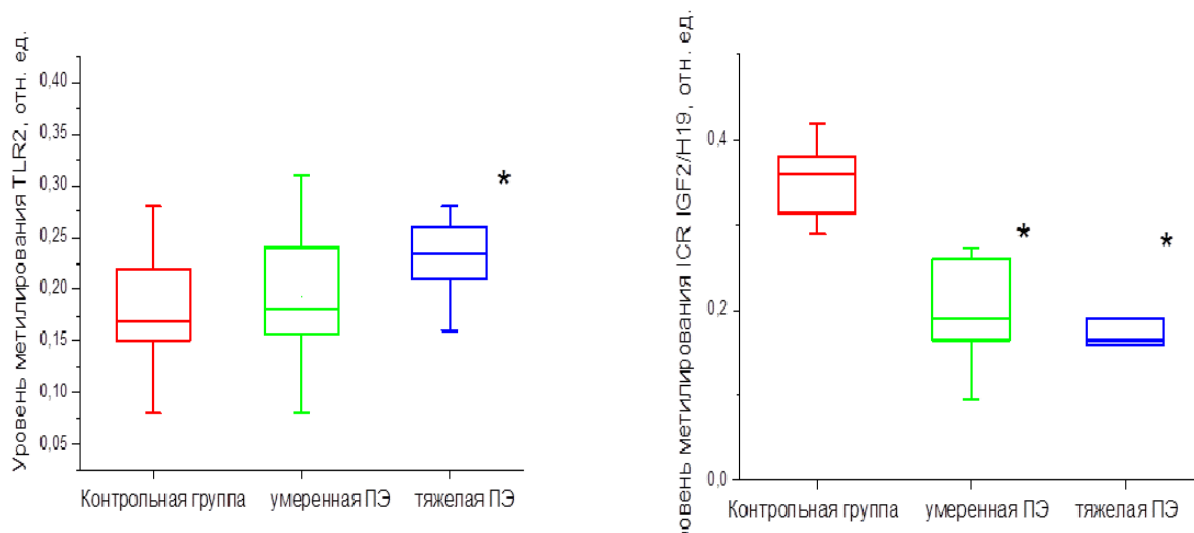


Рисунок 7. Относительный уровень метилирования *TLR2* и *ICR IGF2/H19* в плацентах при преэклампсии и физиологически протекающей беременности * – $p < 0,01$

Для гена *TLR2* был выявлен повышенный уровень метилирования в группах с умеренной и тяжелой преэклампсией, однако статистически значимые различия наблюдались только при сравнении тяжелой преэклампсии с физиологической беременностью ($p=0,003$). Уровень метилирования при умеренной преэклампсии составил 0,18 (0,16;0,19); при тяжелой – 0,23 (0,21;0,27); в группе сравнения – 0,17 (0,15;0,22).

Для импринтинг контролирующей области *ICR IGF2/H19* уровень метилирования был статистически значимо снижен как при умеренной – 0,18 (0,16;0,25), так и при тяжелой ее форме – 0,15 (0,14;0,18) ($p < 0,001$) в отличие от группы сравнения – 0,36 (0,31;0,38).

Принимая во внимание полученные результаты, было проведено изучение метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области *ICR IGF2/H19* в плазме крови, для определения их прогностической значимости (рис. 8). Уровень метилирования гена *TLR2* был статистически значимо снижен только в группе с тяжелой преэклампсией по сравнению с физиологической беременностью и составил: при умеренной преэклампсии 0,23 (0,15;0,28); при тяжелой – 0,25 (0,17;0,29); в группе сравнения 0,19 (0,14;0,19) ($p=0,02$).

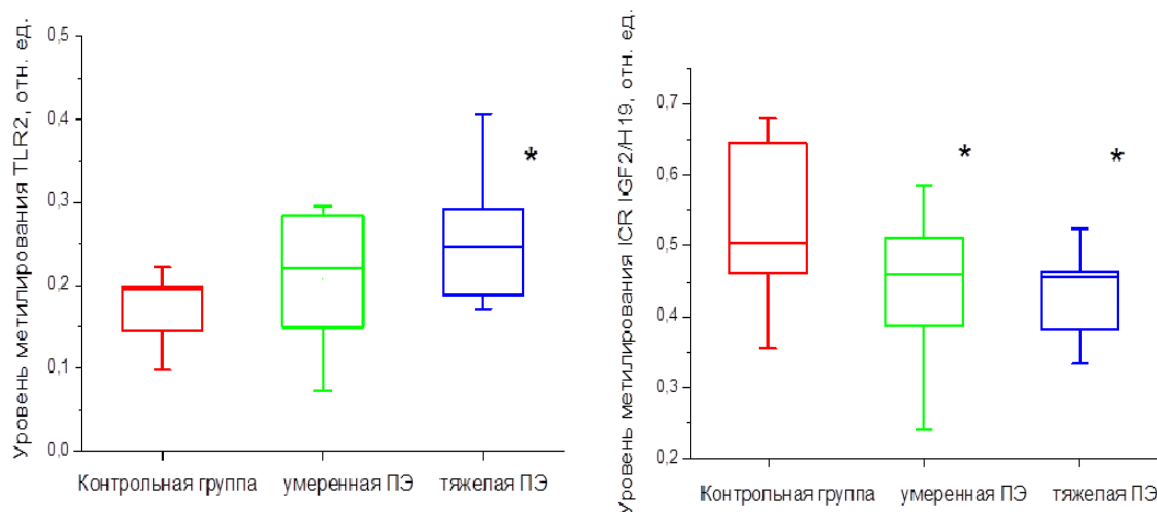


Рисунок 8. Относительный уровень метилирования *TLR2* и ICR *IGF2/H19* в плазме при преэклампсии и физиологически протекающей беременности * – $p < 0,05$

Уровень метилирования импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* имел статистически значимые различия, как при умеренной – 0,46 (0,38;0,51), так и при тяжелой ее форме 0,45 (0,37;0,47) ($p=0,04$), в отличие от группы сравнения 0,5 (0,47;0,64).

Таким образом, в результате проведенного исследования наблюдаемые фенотипические изменения моноцитов крови в виде снижения классических и преобладания неклассических и промежуточных субпопуляций отображают развитие системного воспалительного процесса при ПЭ. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для верификации степени тяжести преэклампсии, что позволяет улучшить диагностику данного осложнения беременности. Выявленная корреляция между увеличением содержания CD68+ клеток в ворсинах плаценты и тяжестью преэклампсии может указывать на роль плаценты в активации моноцитарно-макрофагального компонента крови в ее патогенезе. Установленное повышение метилирования гена *TLR2* при тяжелой преэклампсии может свидетельствовать о его более низкой экспрессии в плаценте и как следствие, приводить к неправильному распознаванию патогенов, и являться пусковым фактором в реализации патологического иммунного ответа при преэклампсии. Импринтированные гены также играют важную роль в формировании плаценты и связанных с ней патологий. Выявленное

снижение уровня метилирования *ICR IGF2/H19* по-видимому является ответной реакцией на повышенную активность иммунной системы при преэклампсии. Полученные результаты, свидетельствуют о целесообразности и перспективности исследования гена *TLR2* и *ICR IGF2/H19* в качестве возможных предикторов преэклампсии.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить патогенетические особенности умеренной и тяжелой преэклампсии на основании определения уровня моноцитарно-макрофагального компонента и метилирования генов врожденного иммунитета, что чрезвычайно важно для применения в клинической практике.

Выводы

1. Факторами риска развития преэклампсии являются: возраст старше 36 лет, отягощенный анамнез, по преэклампсии и сердечно-сосудистым заболеваниям, нарушение жирового обмена, эктопия шейки матки, носительство стрептококка группы В, наследственные тромбофилии.

2. В I триместре беременности преэклампсия ассоциируется с ранним токсикозом – 52,8%, угрозой прерывания – 26,8%, ОРВИ – 13,9%; во II – с угрозой прерывания с формированием истмико-цервикальной недостаточности – 18,5%, задержкой роста плода – 4,6%, гестационным диабетом – 5,5%, анемией – 8,3% и ОРВИ – 13,9%; в III – с угрожающими преждевременными родами – 10,2%, задержкой роста плода – 12,9% и анемией – 20,4%, ($p < 0,05$).

3. Преэклампсия характеризуется высокой частотой осложнений в раннем неонатальном периоде в виде: асфиксии – 12,0%, респираторного дистресс-синдрома – 9,2%, врожденной пневмонии – 19,4%, внутрижелудочковых кровоизлияний I степени – 4,6%, ДВС-синдрома – 3,7%, анемии новорожденных – 12,0% и дискинезии желудочно-кишечного тракта новорожденных – 5,6% ($p < 0,05$).

4. Выявлено значительное снижение содержания классических CD16-негативных моноцитов при умеренной преэклампсии – на 15,9%, а при тяжелой – на 39,2% ($p < 0,05$), при этом содержание неклассических и промежуточных моноцитов было повышено только при тяжелой преэклампсии на 13,4% и 17,7% ($p < 0,05$).

5. Разработанная модель, включающая определение относительного содержания CD16-негативных моноцитов в периферической крови обладает высокой диагностической ценностью для верификации степени тяжести преэклампсии с чувствительностью 83% и специфичностью 100%.

6. Установлено, что содержание CD68+ клеток в ворсинах плаценты статистически значимо увеличивалось по мере прогрессирования тяжести преэклампсии и составило при умеренной преэклампсии – 7,5% (5,6;8,3), при тяжелой – 9,1% (6,5;10,8) и 5,1% (2,5;5,3) в группе сравнения ($p < 0,001$).

7. При преэклампсии выявлено aberrантное метилирование гена *TLR2* и области контролирующей импринтинг ICR *IGF2/H19* в плаценте и плазме крови. Установленная корреляционная связь между уровнем метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* в плаценте и плазме крови указывает на их прогностический потенциал.

8. Алгоритм прогнозирования и диагностики преэклампсии, включающий выявление группы риска, определение относительного содержания CD16-негативных моноцитов, уровня метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* в плазме крови, позволит снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Практические рекомендации

1. Для выявления группы риска по развитию преэклампсии предложено использовать разработанную модель прогноза, позволяющую определить вероятность развития преэклампсии с высокой чувствительностью 70,3% и специфичностью 95,6%.

2. Беременным с преэклампсией рекомендуется определение относительного содержания CD16-негативных моноцитов в периферической крови для верификации степени ее тяжести, что способствует улучшению диагностики и определяет выбор тактики ведения пациенток с данной патологией.

3. Целесообразно определение уровня метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области ICR *IGF2/H19* в плазме крови у женщин группы риска для предикции развития преэклампсии.

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

Алгоритм прогнозирования и диагностики 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. 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.
3. **Борис Д.А.**, Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А. Патогенетические аспекты преэклампсии. // **Акушерство и гинекология.** – 2015. – №12: – С.11-15.
4. 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 международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 16-19 января 2018. – С.130-132.
5. 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.
6. Балущкина А.А., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е., Харченко Д.К., **Борис Д.А.** Прогнозирование и лабораторная диагностика гипертензивных расстройств при беременности // **Русский медицинский журнал «Мать и дитя»** – 2019. – № 2. – С.89-94.
7. **Борис Д.А.**, Волгина Н.Е., Красный А.М., Тютюнник В. Л., Кан Н.Е. Прогнозирование преэклампсии по содержанию CD16-негативных моноцитов. // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – № 7. – С.49-55.

8. Красный А.М., Ломова Н.А., Кан Н.Е., **Борис Д.А.**, Садекова А.А., Амирасланов Э.Ю. Патент на изобретение № 2712228 от 27 января 2020 года. «Способ определения степени тяжести преэклампсии по относительному содержанию CD16+ моноцитов в периферической крови беременных».

9. **Борис Д.А.**, Красный А.М., Куревлев С.В., Садекова А.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л. Метилирование генов *TLR2* и *ICR IGF2/H19* в плаценте и плазме крови при преэклампсии // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – № 7. – С.93-98.