

БУЛАТОВА

Юлия Сергеевна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ АКУШЕРСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПО УРОВНЯМ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ЖЕНЩИН С УГРОЖАЮЩИМ И ПРИВЫЧНЫМ
ВЫКИДЫШЕМ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

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
кандидат биологических наук

Тетруашвили Нана Картлосовна
Высоких Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Серова Ольга Федоровна – доктор медицинских наук, профессор, главный врач ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ГНЦ России ФГБУ «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России.

Каткова Надежда Юрьевна – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ФДПО ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Ведущее учреждение: ФГБУ "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Минздрава России

Защита диссертации состоится «15» февраля 2022 г. в 13.00. ч. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/BylatovaUS_diss_2.pdf?2146780853

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Проблемы самопроизвольных прерываний беременности и преждевременных родов остаются ключевыми в современном акушерстве. Беременные с угрожающим и привычным выкидышем составляют группу риска по реализации так называемых плацента-ассоциированных осложнений (Савельева Г.М. и соавт. 2017, Coomarasamy A. et al. 2021). Считается общепризнанным, что неполная инвазия трофобласта и последующая недостаточность функции плаценты, формирующаяся в первой половине беременности, приводят к таким осложнениям, как ранняя преэклампсия, задержка роста плода, неоднократные кровотечения, мертворождение, преждевременные роды. В течение многих недель первого и второго триместров беременности патология плацентации может протекать бессимптомно, что при отсутствии эффективных диагностических маркеров создает трудности в оценке происходящих процессов и эффективности проводимой терапии (Недосейкина М.С. и соавт. 2012, Савельева Г.М. и соавт. 2012, Шалина Р.И. и соавт. 2015).

Как избыточные, так и недостаточно выраженные воспалительные процессы могут приводить к невозможности имплантации, очень ранним доклиническим потерям беременности и привычному выкидышу в целом. В то время как воспаление инфекционного генеза и его последствия достаточно хорошо изучены, патогенез асептического воспаления остается неясным и представляет собой нерешенную проблему (Passini R. et al. 2014, Romero R. et al 2016). Эндогенные индукторы - алармины представляют собой как белковые, так и небелковые молекулы, из широкого спектра которых особое внимание исследователей привлекают так называемые провоспалительные факторы митохондриального происхождения (ПФМП). ПФМП, присутствующие в мембранах митохондрий, в случае экспозиции за пределы клетки, становятся сигнальными факторами воспаления. При

повреждении синцитиотрофобласта происходит высвобождение ПФМП, что может вызывать генерализованные изменения сосудов с помощью механизмов, к настоящему времени не до конца изученных, но косвенным образом связанных с активацией эндотелия (Saito S. et al. 2013). В ответ на разрушение синцитиотрофобласта и неполноценную плацентацию развивается быстрая реакция организма матери, направленная на завершение беременности и в дальнейшем вызывающая толерантность иммунной системы женщины к партнеру.

Таким образом, в крови существует набор маркеров, достаточный для того, чтобы провести их анализ у женщин с привычным выкидышем в сравнении с физиологической беременностью. Выявление различий в уровне ПФМП у данных групп женщин позволит уточнить механизм, лежащий в основе привычных потерь беременности, оценить эффективность проводимой терапии, направленной на ее пролонгирование и прогнозировать акушерские осложнения.

Степень разработанности темы исследования

В 2014 г коллективом под руководством R.Romero было показано, что помимо изученного ранее инфекционного генеза воспаления (вызванного бактериями и вирусами), существует иной тип воспаления, при котором некроз или клеточная гибель индуцирует высвобождение медиаторов, гиперактивирующих иммунную систему. Установлено, что ПФМП играют ведущую роль в развитии целого ряда заболеваний, тогда как снижение уровня этих факторов в крови приводит к купированию последствий патологического состояния (Ausman J. et al. 2018). Показано, что изменение соотношения белков слияния и деления митохондрий определяет развитие митохондриальной дисфункции у пациентов с преждевременными родами и преэклампсией (Bertheloot D. et al. 2017, Romero R. et al. 2014).

Исследования по определению целого ряда ПФМП у женщин с угрожающим и привычным выкидышем не проводились, в связи с чем заслуживает внимания возможность создания системы оценки

индивидуального риска потерь беременности и эффективности проводимого лечения на основании отбора наиболее информативных маркеров асептического воспаления.

Цель настоящего исследования:

Оптимизация программы ведения беременностей у женщин с угрожающим и привычным выкидышем на основании раннего прогнозирования гестационных осложнений и оценки эффективности проводимой терапии по уровням провоспалительных факторов митохондриального происхождения.

Задачи исследования:

- 1) Провести анализ нарушений репродуктивной функции у женщин с угрожающим и привычным выкидышем на основании комплексного клинико-лабораторного обследования.
- 2) Определить содержание ПФМП в периферической крови женщин в динамике беременности, осложненной угрозой прерывания, при привычном выкидыше и при физиологической беременности.
- 3) Провести оценку эффективности раннего прогнозирования осложнений и исходов беременностей у женщин с угрожающим и привычным выкидышем на основании определения содержания ПФМП.
- 4) Оценить клиническую значимость определения ПФМП у женщин с угрожающим и привычным выкидышем для оптимизации ведения беременности и оценки эффективности проводимой терапии.
- 5) Разработать алгоритм обследования и терапевтических мероприятий у женщин с угрожающим и привычным выкидышем с учетом динамики ПФМП в плазме периферической крови.

Научная новизна

Определены уровни ПФМП, характерные для неосложненной беременности и пациенток с привычным и угрожающим выкидышем, что позволило расширить понимание патогенетических механизмов, лежащих в основе нормального и нарушенного воспалительного ответа при беременности и патологии плацентации.

Впервые проведена комплексная оценка ПФМП в динамике всей беременности на когорте женщин с физиологической беременностью, с угрожающим и привычным выкидышем. Проведенное динамическое определение уровней ПФМП у женщин, начиная с 6-й недели беременности до родоразрешения с интервалом 4 недели позволило определить критерии оценки успешности процессов имплантации/плацентации и эффективности проводимого лечения.

Практическая значимость исследования

На основании проведенных исследований определены наиболее информативные диагностические маркеры для мониторинга течения беременности, начиная со срока 6 недель. Согласно полученным данным, низкие уровни ПФМП являются предикторами самопроизвольного прерывания беременности до 12 недель. Показано, у женщин с начавшимся выкидышем при проведении терапии происходит повышение уровней ПФМП к сроку 12 недель беременности, что является положительным прогностическим признаком и коррелирует с пролонгированием беременности. Избыточный провоспалительный ответ, выражающийся в бесконтрольном росте содержания ПФМП коррелирует с развитием плацентарной недостаточности, СЗРП, элективным досрочным родоразрешением.

В результате анализа осложнений и исходов беременностей разработана модель прогнозирования ранних потерь беременности и преждевременных родов, обусловленных плацентарной недостаточностью. Внедрение предложенного алгоритма позволит прогнозировать осложнения и исходы беременностей и оценить эффективность проводимой терапии.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. При угрожающем и привычном выкидыше определение низких уровней ПФМП в периферической крови женщин в сроке 6 недель позволяет прогнозировать ранние гестационные потери, как минимум, за 2 недели до их реализации.

2. Реакция материнского организма на инвазию плаценты проявляется высокими уровнями ПФМП в периферической крови женщин с привычным выкидышем в сроке 12 недель, с угрожающим выкидышем - в 18 недель, при физиологической беременности - в 25 недель. Избыточный провоспалительный ответ на ПФМП с 15 по 18 неделю беременности предрасполагает к формированию плацентарной недостаточности, задержке роста плода и элективному досрочному родоразрешению.
3. Нормализация уровней ПФМП в динамике беременности у женщин с угрожающим и привычным выкидышем свидетельствует об эффективности проводимой терапии и может служить благоприятным прогностическим признаком пролонгирования беременности.

Личный вклад автора

Автором проведена систематизация литературных данных по теме диссертации, разработана анкета для сбора анамнеза, проведен анализ клиничко-анамнестических данных и результатов обследования 132 женщин в проспективном исследовании, соответствующих критериям включения в исследование. Автор лично участвовал в ведении беременности и родоразрешении женщин, включенных в исследование. Автором осуществлялись: забор, подготовка, хранение биологического материала на преаналитическом этапе, участие в молекулярно-биологических исследованиях. Анализ, статистическая обработка полученных данных проведены автором самостоятельно в соответствии с правилами и обеспечивают достоверность результатов и сформулированных выводов. Написание и публикация результатов выполнены автором лично.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. – Акушерство и гинекология. Результаты

проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, а именно пунктам 1, 2, 3, 4.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ России в 26 декабря 2019 г.

Апробация диссертационного материала

Результаты данной диссертационной работы представлены на XVII, XVIII, XX, XI Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и дитя» (2016, 2017, 2019, 2020, 2021 гг.), региональном XII научно-образовательном форуме «Мать и дитя» 2019, I Национальном Конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» 2019 г. Результаты работы доложены на международных конференциях: «Preterm birth international collaborative (PREBIC) annual meeting» 19-22.04.2018 г; 29.09.2018

Внедрение результатов исследования в практику

Основные рекомендации, вытекающие из результатов исследования, используются во 2-м отделении акушерском патологии беременности при обследовании и лечении супружеских пар с привычными потерями плода.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, изложена на 125 страницах компьютерного текста. Работа содержит 21 таблицу и 27 рисунков. Библиографический указатель включает 174 литературных источника, из них 38 отечественных и 136 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Для достижения поставленной цели было проведено проспективное исследование трех групп женщин, наблюдавшихся с момента диагностики беременности при обращении в Научно-поликлиническое отделение Центра за период 2015-2019 гг.

Проводилось динамическое измерение уровней ПФМП в течение всей беременности у женщин с привычным выкидышем (группа ПВ), при беременности, осложненной кровотечением (группа угрожающего выкидыша – группа УВ) и беременных с неотягощенным акушерским анамнезом (группа физиологической беременности - ФБ). Исследование проводилось у всех пациенток, начиная со срока 6 недель беременности с интервалом 3 недели до 22 недель беременности, далее ежемесячно до родоразрешения.

После определения строгих критериев включения / не включения в группы, динамическое наблюдение было проведено 132 женщин.

Критериями включения в группу ПВ являлись: нормальный кариотип партнеров, привычный выкидыш (наличие в анамнезе 3 и более потерь беременности до 22 недель от одного и того же партнера или 2 и более потерь, если в каждом случае был подтвержден нормальный кариотип плода), маточная беременность малого срока, информированное согласие женщины на проведение исследования. В группу УВ включены женщины с наличием кровяных выделений из половых путей в сроке 6 недель беременности с неотягощенным акушерским анамнезом и наличием маточной беременности с документированным сердцебиением плода по данным УЗИ.

Контрольную группу составили женщины с неотягощенным акушерским и гинекологическим анамнезом, физиологическим течением беременности на момент обследования, подписавшие информированное согласие на проведение исследования.

Критерии не включения были едиными для всех трех групп: многоплодная беременность, наличие генетических родительских факторов ПВ, анатомические причины ПВ, наличие хронических инфекционных, системных аутоиммунных, онкологических заболеваний, резус-сенсibilизация. Критерии исключения пациентов из исследования: отсутствие возможности продолжить проведение всех запланированных мероприятий со стороны пациента, желание пациента добровольно прекратить участие в исследовании, нарушение пациентом требований, сформулированных согласно протоколу исследования.

Все пациентки прошли обследование по специально разработанной схеме, включавшей: подробный сбор анамнестических данных, объективный осмотр, гинекологический осмотр, ультразвуковое исследование, гемостазиологическое исследование, скрининг на наличие абсолютных патогенов и условно-патогенных микроорганизмов, оценка фето-плацентарного комплекса в динамике беременности.

В соответствии с поставленными задачами, у всех беременных проводилось обследование и амбулаторное наблюдение в Научно-поликлиническом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ. При необходимости в госпитализации стационарное лечение проводилось в акушерских отделениях Центра.

Специальные методы исследования

Для определения уровня ПФМП у пациенток исследуемых групп проводили фракционирование венозной крови с последующим выделением микровезикул из полученной плазмы. Содержание митохондриальных белков VDAC1, TFAM, OPA1 и DRP1 (норма/контроль) в микровезикулах плазмы крови определяли при помощи методов белкового электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли в системе Biorad MiniProtean (США) и Вестерн-блот анализа с высокоспецифичными моноклональными антителами. Определение идентифицированных компонентов ПФМП в полосе соответствующего

молекулярного веса полипептидов на нитроцеллюлозной мембране проводили при помощи системы Geldoc (США) с нормировкой на VDAC.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы GraphPad Prism 8.0. Для всех количественных показателей были определены: среднее значение (M), стандартное отклонение (δ), ошибка среднего (m), 95% доверительный интервал, медиана (Me), интерквартильный размах, а для номинальных значений рассчитаны частоты (%). Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка.

При сравнении средних значений двух выборок применяли параметрический t-критерий Стьюдента (для нормального распределения) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Анализ показателей, изменяющихся в течение беременности, производили с помощью непараметрического критерия для связанных выборок – критерия Вилкоксона.

Межгрупповые различия динамических показателей (относительное содержание исследуемых белков) оценивали с помощью непараметрического рангового критерия Краскела-Уоллиса. Данные на рисунках представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$. С целью оценки прогностической значимости митохондриальных белков микровезикул проведен ROC-анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

Были проанализированы факторы риска прерывания беременности у женщин исследуемых групп. Из соматических заболеваний достоверные различия отмечены в частоте встречаемости субклинического гипотиреоза и хронического цистита. У пациенток с УВ и ПВ частота вышеуказанных заболеваний достоверно превышала показатели в группе ФБ.

При анализе структуры гинекологической заболеваемости отмечено, что патология шейки матки встречалась статистически значимо чаще в группе ПВ (у 27,3%), чем в группе УВ – (12,2%) и в группе ФБ у 14,3% ($p < 0,05$). Воспалительные заболевания органов малого таза в анамнезе, в частности, хронический эндометрит значимо чаще отмечен в группах ПВ и УВ - 61,8% и 42,8% соответственно, чем в группе ФБ ($p < 0,05$). Пациенткам с ПВ вне беременности в программе прегравидарной подготовки проводилась противовоспалительная терапия, после которой контрольные анализы свидетельствовали об отсутствии инфекционно-воспалительных процессов. В программе прегравидарной подготовки и во время беременности проводилось обследование на инфекции, передающиеся половым путем. Абсолютных патогенов выявлено не было ни в одном случае. Титр условно-патогенных микроорганизмов по результатам количественного ПЦР метода (фемофлор-16) в первом триместре не превышал установленных нормативных значений (10^3 и менее). Согласно данным литературы, причинами воспалительных процессов могут быть не только восходящее инфицирование, но и неоднократные оперативные вмешательства, проводимые с диагностической и лечебной целью, а также генетическая предрасположенность к избыточному воспалительному ответу (Савельева Г.М. и соавт. 2017, Pignotti M.S et al. 2008). Проанализированы другие этиологические факторы женщин из группы ПВ, в частности, эндокринные нарушения: в 5,5% случаев диагностированы поликистозные яичники и субклинический гипотиреоз в 25,5% наблюдениях. Всем женщинам проводилось лечение до наступления планируемой беременности, гормональные нарушения были компенсированы.

Проанализированы данные репродуктивного анамнеза у женщин исследуемых групп: так, потери первого триместра составили 84,5% от числа всех самопроизвольных выкидышей у женщин с ПВ, поздние

выкидыши регистрировались относительно редко – 4,1% в сроках с 13 до 22 недель беременности. Женщины с УВ чаще были первобеременными, чем пациентки с ФБ.

Согласно современным литературным данным, женщин с ПВ можно отнести в группу высокого риска по реализации ранних и поздних гестационных осложнений, таких как угрожающий выкидыш, угроза преждевременных родов, преэклампсия, плацентарная недостаточность, задержка роста плода (Атласов В.О. и соавт. 2012, Савельева Г.М. и соавт. 2017, Lockwood C.J. et. al. 2012). У беременных всех трех групп (ПВ, УВ, ФБ) было произведено определение уровней ПФМП, дальнейшее динамическое наблюдение за беременностью, анализ осложнений и исходов беременностей.

Самым частым осложнением I триместра беременности у женщин исследуемых групп был угрожающий выкидыш 70,9% в группе ПВ и 100% в группе УВ (критерий включения в группу). Полученные результаты согласуются с данными литературы о высоком проценте кровотечений в первом триместре у женщин с ПВ (ACOG «Management of recurrent pregnancy loss», 2017). При УВ в 2 раза чаще, чем при ПВ встречались заоболочечные гематомы (18,4% по сравнению с 7,3% - $p < 0,05$), а также кровотечения без образования гематом (55,1% по сравнению с 38,2% при ПВ).

При анализе ранних потерь беременности в группах установлено, что из 16 неразвивающихся беременностей 11 (86%) приходилось на группу ПВ, среди них 6 (6/11 - 54,6%) – с нормальным кариотипом. В 5 наблюдениях (5/11 - 45,4%) отмечены анеуплоидии. Среди группы УВ процент анеуплоидий был выше и составил 60% (3/5), в 2 (2/5 – 40,0%) случаях кариотип был нормальным.

При неразвивающихся беременностях уровень ПФМП в крови женщин в 6 недель беременности был достоверно ниже, особенно при

патологическом кариотипе абортуса, чем у женщин с развивающимися беременностями (рисунок 1).

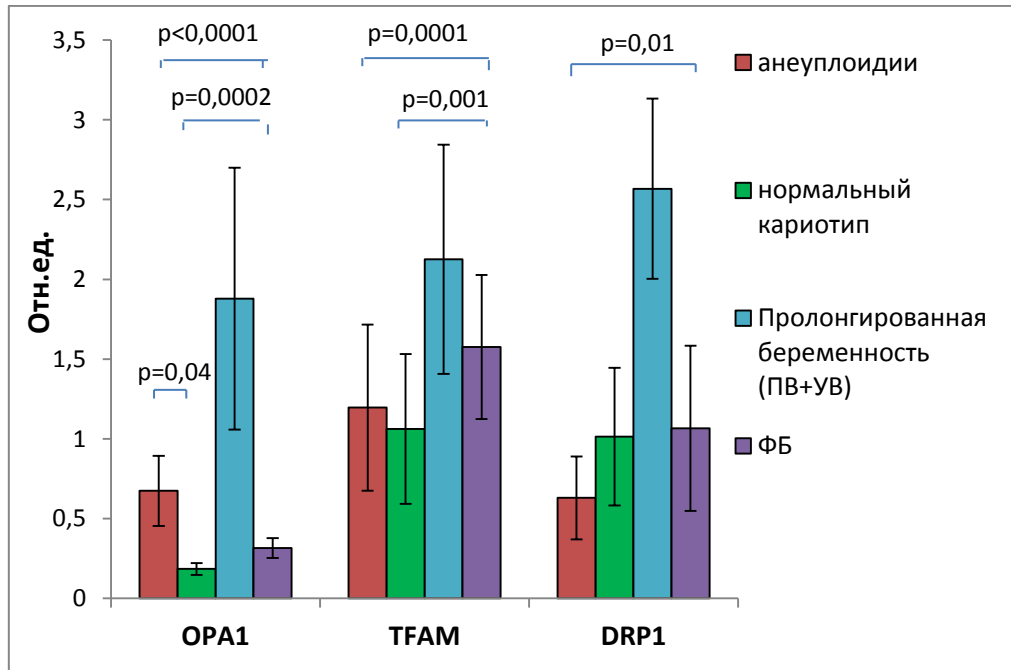


Рис. 1. Митохондриальные белки в плазме крови женщин с ранними потерями на сроке 6 недель беременности (группы анеуплоидии, нормальный кариотип), пролонгированной беременностью (ПВ+УВ) и физиологической беременностью (нормировано на VDAC).

Руководствуясь полученными данными, можно утверждать, что нормальное течение беременности сопровождается достаточно высокими значениями содержания ПФМП в периферической крови, в то время как при потерях беременности мы регистрировали существенно меньшее и, видимо, недостаточное для активации инфламмасом трофобласта количество митохондриальных белков. Вероятно, жизнеспособное плодное яйцо способно индуцировать в эндометрии сбалансированный провоспалительный ответ, тогда как при УВ и ПВ имеет место нарушение данного взаимодействия, результирующее в гибель плодного яйца. Полученные нами результаты согласуются с доминирующей в последнее время концепцией о необходимости провоспалительного состояния иммунной системы для успешности процессов имплантации и плацентации в начале беременности и формирования

противовоспалительного фона на более поздних ее сроках (Доброхотова Ю.Э. и соавт. 2016, Farina A. et al. 2015).

Полученные нами результаты наглядно демонстрируют, что на ранних сроках беременности маркеры асептического воспаления у женщин групп УВ и ПВ достоверно отличаются при наличии кровотечения. Если у женщин с ПВ пик уровня белков ОРА1 и TFAM приходится на срок 12 недель и достоверно отличается от показателей в группах УВ и ФБ, то впоследствии - под действием проводимой терапии гестагенами, происходит снижение показателей, к 20-й неделе достигающих уровня, соответствующего ФБ. Интересно, что в группе УВ без отягощенного акушерского анамнеза терапия гестагенами носит кратковременный характер и пик воспалительных маркеров приходится на срок беременности 18 недель. Отметим, что в группе ПВ подобная тенденция также видна, однако, различия статистически незначимы, хотя и ниже, чем в группе угрожающего выкидыша.

В рамках данной концепции, обнаружение низких уровней ПФМП в первом триместре может применяться в качестве раннего маркера неблагоприятного течения беременности и последующих гестационных осложнений. Нами были проанализированы течение и исходы беременностей женщин всех исследуемых групп. Угроза прерывания беременности у женщин групп ПВ и УВ была отмечена во втором триместре беременности с высокой частотой и практически не отличалась в группе ПВ и УВ - 29,1% и 26,5% соответственно. Истмико-цервикальная недостаточность была достоверно чаще отмечена у женщин с ПВ в 36,4% случаев, по сравнению с 14,3% пациенток группы УВ и 10,7% группы ФБ ($p < 0,05$).

Осложнения течения III триместра беременности у женщин с ПВ были представлены угрозой ПР, плацентарной недостаточностью, то есть состояниями, в основе которых лежит нарушение плацентации (Шаргаева Н.В. и соавт. 2011, Demir R. et al 2013). Многие исследователи

обоснованно полагают, что истоки данных состояний лежат в первом триместре беременности, когда происходит инвазия трофобласта (Башмакова Н.В. и соавт. 2014, Ходжаева, З.С. и соавт. 2011, Goldenberg R.L. et al. 2010).

Нами были проанализированы изменения уровней ПФМП в динамике беременности и полученные результаты сопоставлены с осложнениями и исходами гестационного процесса у женщин исследуемых групп. Было установлено, что мембранный белок митохондрий VDAC, являющимся маркером содержания митохондрий, претерпевает количественные изменения в везикулярной фракции плазмы крови в зависимости от срока беременности (рисунок 2).

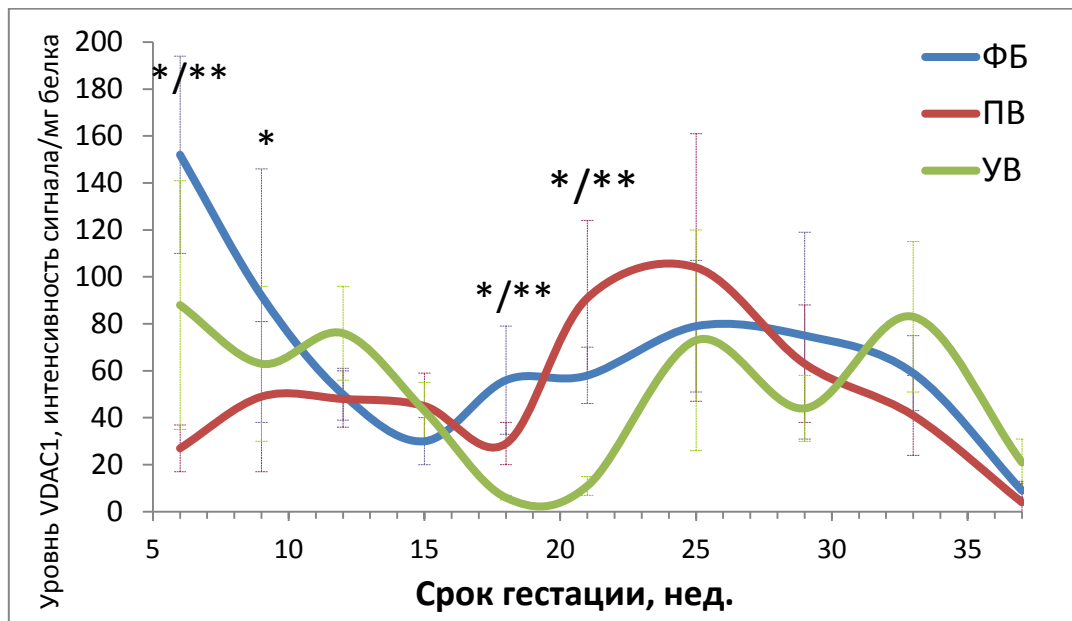


Рис.2. Уровень VDAC1 в микровезикулах плазмы крови беременных исследуемых групп. * - достоверность различий между группами ($p < 0,05$). ** - достоверность различий между группа ($p < 0,0001$).

Выявлено, что при ФБ на сроке 6 недель отмечается достоверно более высокое содержание фрагментов митохондрий в плазме крови по сравнению с группой УВ и ПВ, в дальнейшем наблюдается снижение содержания этого белка в микровезикулах плазмы крови и его последующий плавный подъем к 25 неделям гестации. К концу беременности во всех трех группах значения содержания VDAC в

микровезикулах плазмы снижаются и достоверно не различаются для трех исследованных групп.

Известно, что в плаценте при таких гестационных осложнениях как преэклампсия и задержка роста плода митохондриальный динамический баланс сдвинут в сторону фрагментации митохондриального ретикулула, о чем свидетельствует увеличение экспрессии/активации белка DRP1 и уменьшение содержания OPA1 (Vishnyakova P.A. et al. 2016).

В рамках данного исследования, нами установлено, что изменение содержания белка OPA1 на разных сроках гестации отражает различное состояние плаценты в норме и при плацентарной недостаточности. При ФБ мы наблюдаем низкий уровень этого белка в микровезикулярной фракции плазмы крови в 12 недель, в то время как при ПВ отмечается резкое его повышение, свидетельствующее о снижении эффективности системы элиминации поврежденных митохондрий и увеличению продукции АФК (рисунок 3).

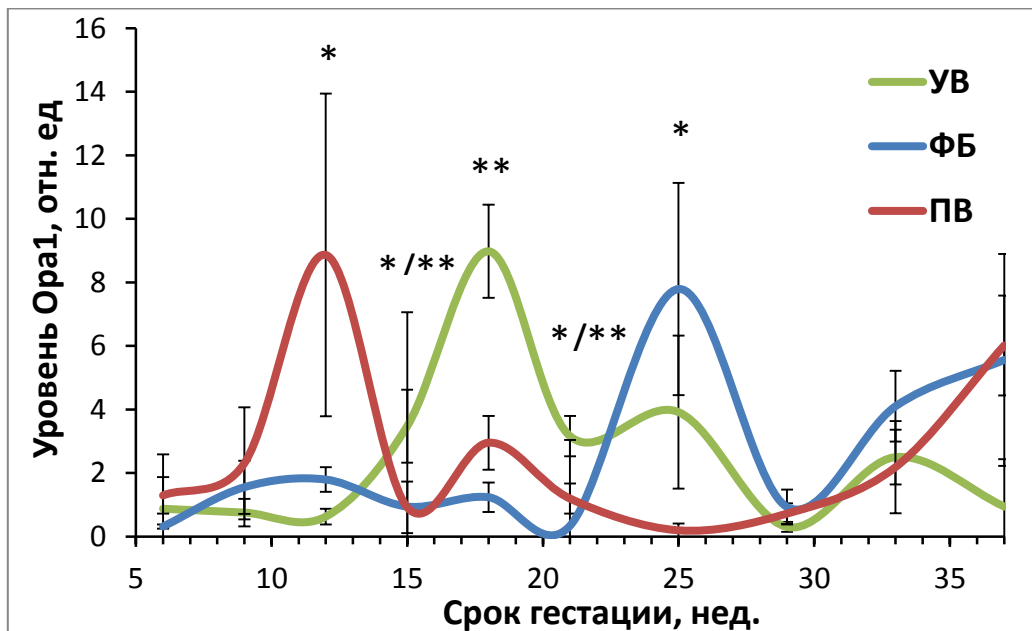


Рис.3. Уровень белка OPA1 в микровезикулах плазмы крови беременных.

* - достоверность различий между группами ($p < 0,05$).

** - достоверность различий между группа ($p < 0,0001$).

К 25 неделям складывается новое равновесие между процессами биогенеза и контроля качества митохондрий, обусловленное растущими энергозатратами развивающегося плода. В связи с этим, в 25 недель мы наблюдаем подъем уровня ОРА1 при ФБ, а достоверно более низкое значение при ПВ позволяет прогнозировать осложнения на базе измерения этого параметра. При УВ пик, соответствующий максимальному содержанию ОРА1 в микровезикулах плазмы крови приходится на срок 18 недель гестации, что свидетельствует о временном смещении вероятности осложнений по сравнению с ФБ, где такие изменения наблюдаются в сроке 25 недель. По-видимому, имеет место более ранняя манифестация изменений митохондриального биогенеза, в норме соответствующего более поздним срокам гестации и адекватного нормам потребления растущего плода. Очевидно, что резервные возможности плаценты при ПВ и УВ определяются более узким диапазоном адаптивных возможностей, по сравнению с неосложненной беременностью. Хотя не вполне ясно, какая эволюционная задача продиктовала необходимость индукции воспалительных реакций именно в данном гестационном сроке – 25 недель, мы предполагаем, что в это время происходят обусловленные началом интенсивного роста плода структурные изменения плаценты, сопровождающиеся повышением порога качества и функционального состояния митохондрий. Данный процесс сопровождается селективным отбором и разрушением значительной части митохондрий с последующим выбросом в системный кровоток митохондриальных белков TFAM и ОРА1 (рисунок 4).

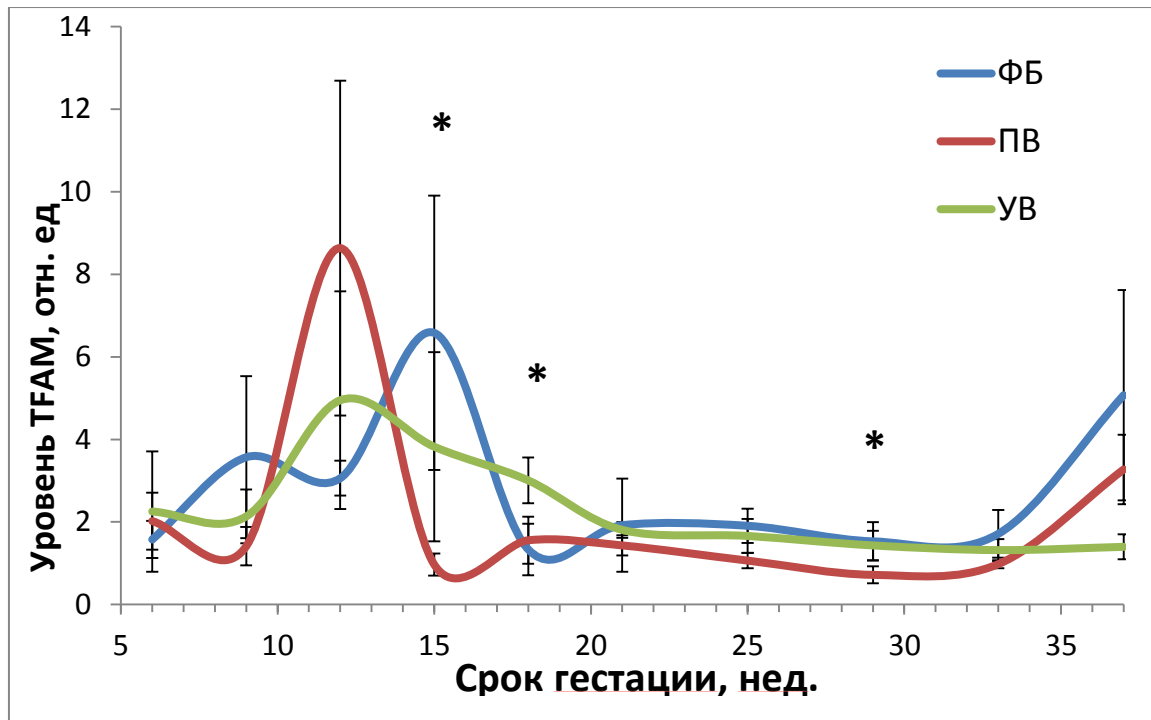


Рис.4. Уровень белка TFAM в микровезикулах плазмы крови беременных.

* - достоверность различий между группами ($p < 0,05$).

** - достоверность различий между группа ($p < 0,0001$).

Дисрегуляция описанных процессов и понижения отбора отсечки приводит к критично высокому уровню селекции и элиминации митохондрий при низком уровне OPA1. Патологическое состояние, соответствующее ПВ, в таком случае, является следствием уменьшения количества митохондрий и резкого падения энергообеспеченности плаценты, приводящих к формированию плацентарной недостаточности. Именно поэтому, как мы полагаем, зарегистрированы достоверные различия в уровнях TFAM и OPA1 при ФБ, УВ, ПВ, а также при ПР.

Исследование динамики содержания митохондриальных белков в везикулярной фракции крови беременных выявило связь этого параметра со сроком гестации как для группы женщин с ФБ, так и для ПР. Оказалось, что для данной патологии, тесно ассоциированной с воспалением, выполняющим роль триггера родовой деятельности, в сроке 18 недель, соответствующем позднему выкидышу, в микровезикулах плазмы наблюдается пик содержания маркера количества митохондрий VDAC1

($p < 0.0001$). Интересно, что для образцов, полученных в этом сроке, также наблюдается достоверно более высокое содержание белка DRP1, ответственного за фрагментацию митохондрий при реализации программы контроля качества органелл ($p < 0,005$). В то же время, для белка слияния митохондрий OPA1 в интервале от 15 до 21 недели ($p < 0,0001-0,005$) также наблюдается повышенное содержание, что говорит об активации митохондриального биогенеза, выполняющей роль триггера воспалительных реакций при индукции ПР, чего не наблюдается при ФБ в эти сроки. Что касается такого известного ПМФП, как белок TFAM, его содержание в микровезикулах плазмы крови женщин с ПР значительно ниже, по сравнению с ФБ. В то время как для нормы ярко выраженный пик, соответствующий воспалительным реакциям I триместра и ассоциированной с ней плацентацией и успешным последующим течением беременности, наблюдается на сроке 12 недель ($p < 0.0001$), для ПР это явление отсутствует, в том числе и на поздних сроках беременности на фоне транзитной активации биогенеза митохондрий в 31-33 недели ($p < 0,0001$). Повышение уровня TFAM может являться маркером воспалительного ответа и неблагополучия в фето-плацентарной системе при компроментированной функции плаценты. При этом, у пациенток с УВ под действием проводимой терапии отмечается нормализация уровней ПМФП, что коррелирует с последующим нормальным течением беременности (рисунок 5).

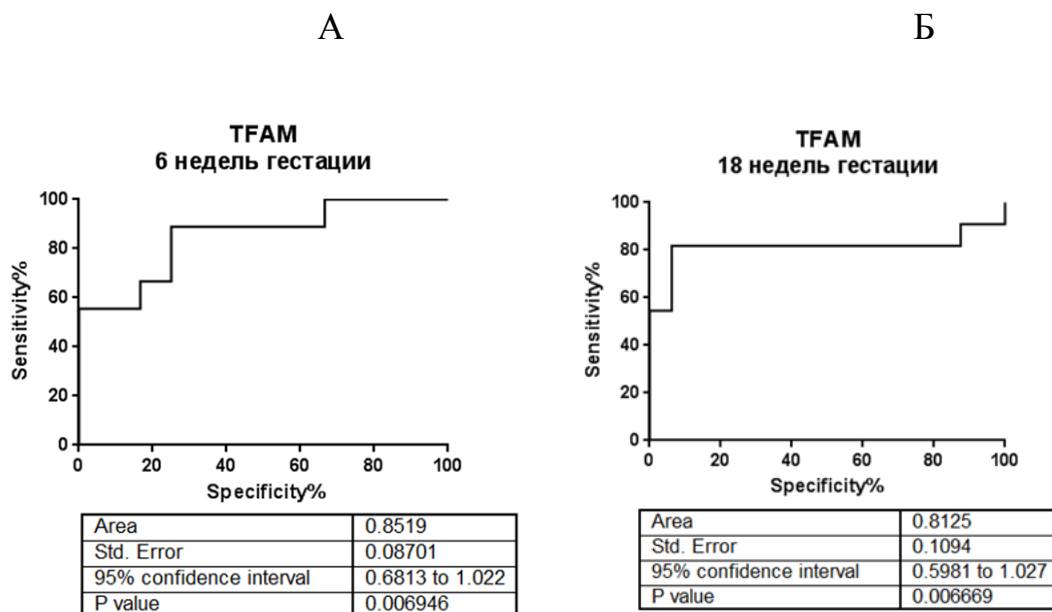


Рис.5. Прогностическая значимость модели вероятности ПР на основе определения уровня TFAM в микровезикулах плазмы крови беременных

По результатам исследования изменения содержания ПФМП в микровезикулярной фракции плазмы крови беременных были построены регрессионные модели, позволяющие предсказывать вероятность наступления ПР. Для 15-18 недель беременности, на основе баланса максимальной чувствительности и специфичности, была определена прогностическая значимость оценки вероятности наступления ПР по уровню VDAS1 (площадь под кривой составила 0,74, 95%-ный доверительный интервал - 0,5899 -0,898, $p < 0,005$). Кроме того, был определен порог специфичности и чувствительности, позволяющий делать прогноз при наличии отрицательного результата прогнозирования ПР (рисунок 6).

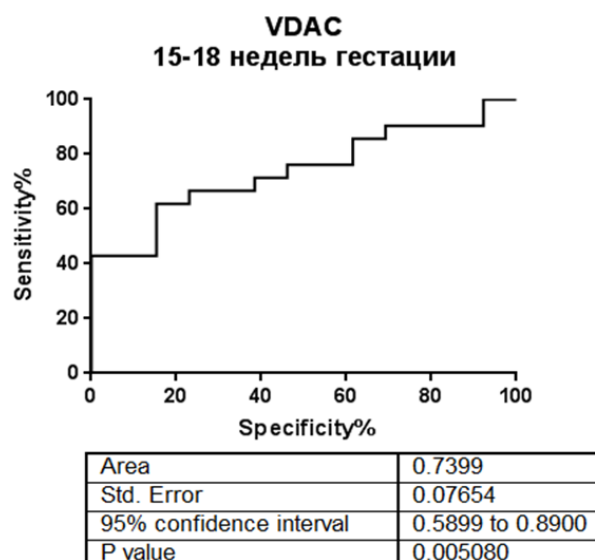


Рис.6. Прогностическая значимость модели вероятности ПР на основе определения уровня VDAC1 в микровезикулах плазмы крови беременных

Таким образом, нарушения в процессах имплантации, инвазии трофобласта и плацентации, отражающиеся в изменении содержания ПФМП в микровезикулярной фракции плазмы крови беременных, создают предпосылки для формирования плацентарной недостаточности, лежащей в основе поздних гестационных осложнений.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение содержания ПФМП в микровезикулярной фракции плазмы крови беременных позволяет прогнозировать как самопроизвольные потери беременности, так и ПР вследствие плацента-ассоциированных осложнений.

ВЫВОДЫ

1. При анализе клинико-анамнестических данных установлено, что пациентки групп УВ и ПВ сопоставимы по возрасту, характеру менструальной функции, частоте экстрагенитальных заболеваний. Женщины с ПВ в анамнезе имели большую частоту гинекологических заболеваний и операций на органах репродуктивной системы. Несмотря на плановую терапию гестагенами у женщин с ПВ в 71% случаев I триместр осложнился кровотечениями с образованием гематом у каждой 3-й

беременной (32,8%) с преобладанием ретрохориальных гематом (25,5%). При УВ без отягощенного акушерского анамнеза в 2 раза чаще, чем при ПВ встречались заоболочечные гематомы (14,3% по сравнению с 7,3%), а также кровотечения без образования гематом (55,1% по сравнению с 38,2% при ПВ).

2. Потери беременности I триместра у женщин с УВ и ПВ преимущественно происходили в сроках 6-7 недель беременности (80,0% и 54,6% от числа всех выкидышей соответственно). После 8 недель беременность прервалась с равной частотой в обеих группах (20,0%-27,3%). Прерывание беременностей на ранних сроках в 2 раза чаще отмечено у женщин с ПВ - 20,0% по сравнению с 10,0% в группе УВ.

3. Из числа прервавшихся беременностей, нормальный кариотип абортусов отмечен в 54,6% группы ПВ и в 40% случаев при УВ. Хромосомные нарушения были представлены анеуплоидиями в обеих группах (45,4% в группе ПВ, 60% в группе УВ). При неразвивающихся беременностях уровень провоспалительных факторов митохондриального происхождения (ПФМП) в крови женщин в 6 недель беременности был достоверно ниже, особенно при патологическом кариотипе абортуса, чем у женщин с развивающимися беременностями.

4. Зарегистрированы достоверные различия в содержании белков ОРА1 и TFAM при физиологической беременности, угрожающем и привычном выкидыше. Максимальные значения были зарегистрированы в группе привычного выкидыша в 12 недель, в группе угрожающего выкидыша в 18 недель беременности, а в группе физиологической беременности - на сроке 25 недель. Подобные изменения в уровнях ПФМП отражают волны инвазии трофобласта и плаценты с последующим провоспалительным ответом материнского организма.

5. Установлено резкое повышение уровня ПФМП при привычном выкидыше в конце I триместра беременности на фоне снижения эффективности системы элиминации поврежденных митохондрий при

экзогенном окислительном стрессе, ассоциированном с воспалением. Разнонаправленность уровней ПФМП уже на ранних сроках гестации отражает различное состояние формирующейся плаценты при физиологической и осложненной беременности, что создает предпосылки для развития плацентарной недостаточности у женщин с угрожающим и привычным выкидышем.

6. Показано, что у женщин с последующим развитием преждевременных родов по сравнению с женщинами, родившими своевременно имеют место достоверные различия в уровнях ПФМП: на сроке 12 недель в микровезикулах плазмы крови отсутствует соответствующее физиологической беременности количество провоспалительного фактора митохондриального происхождения белка TFAM, а в сроке 18 недель содержание митохондриального белка VDAC1 на порядок выше, чем в норме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У женщин с угрожающим и привычным выкидышем рекомендуется определять интенсивность воспалительного ответа путем измерения уровней ПФМП в плазме крови в первом триместре беременности. Низкие уровни ПФМП в сроке 6 недель беременности являются неблагоприятным прогностическим фактором ранних гестационных осложнений (самопроизвольного выкидыша, неразвивающейся беременности, анеуплоидии) и должны служить основанием для расширенного клинико-лабораторного обследования, углубленного мониторинга и подбора терапии.
2. Повышение уровня ПФМП в сроке 12 недель беременности у женщин с ПВ указывает на положительный прогноз развития беременности при сохранении возможности реализации плацента-ассоциированных осложнений.
3. Рекомендуется исследование уровня ПФМП в диапазоне от 15 до 18 недель беременности для прогнозирования плацентарной

недостаточности, задержки роста плода и селективного досрочного родоразрешения у групп беременных высокого риска.

4. При повышении содержания ПФМП в плазме крови, начиная со второго триместра беременности, необходимо провести детальное обследование фето-плацентарного комплекса для оптимизации акушерской тактики в случае ухудшении состояния плода.
5. Определение содержания ПФМП в плазме крови у женщин с угрожающим и привычным выкидышем в анамнезе, начиная с 25 недель, позволяет оценить эффективность проводимого лечения и при нормализации показателей прогнозировать успешный исход беременности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФС – антифосфолипидный синдром

АФК – активные формы кислорода

ВА – волчаночный антикоагулянт

ВПР – врожденные пороки развития

ДВС – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

СЗРП – синдром задержки роста плода

ИЦН – истмико-цервикальная недостаточность

ПВ – привычный выкидыш

ПР – преждевременные роды

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПФМП – провоспалительные факторы митохондриального происхождения

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

УВ – угрожающий выкидыш

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФБ – физиологическая беременность

β -ХГЧ – бета-субъединица хорионического гонадотропина человека

ХА – хромосомные анеуплоидии

ER – эндоплазматический ретикулум

HLA – лейкоцитарные антигены человека

NK – натуральные киллеры

DAMP - Damage Associated Molecular Patterns

DRP1 – dynamin related protein 1

HMGB1 – high-mobility group protein B1

OPA1 - optic atrophy 1

TFAM – transcription factor activation mitochondrial

VDAC - voltage dependent anionic channel

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Булатова Ю.С. Провоспалительные факторы митохондриального происхождения в патогенезе привычных выкидышей и ранних преждевременных родов / Н.К. Тетруашвили, М.Ю. Высоких // **Акушерство и гинекология.** 2017; 8: 5-9.
2. Булатова Ю.С. Митохондриальные белки микровезикул плазмы периферической крови как биомаркеры ранних потерь беременности / Н.К. Тетруашвили, П.А. Вишнякова, М.Ю. Высоких, М.В. Марей, С.В. Пятаева, Г.Т. Сухих // **Акушерство и гинекология.** 2017; 7: 46-51.
3. Булатова Ю.С. Митохондриальные белки микровезикул плазмы периферической крови как триггеры асептических воспалительных реакций у женщин с угрожающим и привычным выкидышем и физиологическим течением беременности / Н.К. Тетруашвили, П.А. Вишнякова, М.Ю. Высоких, М.В. Марей, М.Ю. Бобров, С.В. Пятаева // **Акушерство и гинекология.** 2018; 4: 42-48.
4. Вишнякова П.А. Синдром задержки роста плода и маркеры митохондриальной дисфункции / Ю.А. Суханова, А.Г. Микаелян, Ю.С. Булатова, С.В. Пятаева, И.С.Балашов, П.И. Боровиков, Н.К. Тетруашвили, М.Ю. Высоких // **Акушерство и гинекология.** 2018; 6: 31-36.
5. Микаелян А.Г. Характеристика состава микровезикул крови при физиологической беременности и беременности, отягощенной синдромом

- задержки роста плода / М.В. Марей, Ю.А. Суханова, П.А. Вишнякова, **Ю.С. Булатова**, С.В. Пятаева, Д.В. Цвиркун, Н.К. Тетруашвили, М.Ю. Высоких // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение** Том 7, № 4, 2019.
6. **Булатова Ю.С.** Диагностическая значимость определения провоспалительных факторов митохондриального происхождения у женщин с физиологической беременностью, угрожающим и привычным выкидышем / Н.К. Тетруашвили, А.Г. Микаелян, М.В. Марей, Ю.А. Суханова, М.Ю. Высоких // **Акушерство и гинекология**. 2020; 8: 47-56.

Приложение 1

АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОК С УГРОЖАЮЩИМ И ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

