

На правах рукописи

ХАЧАТРЯН

Зарине Варужановна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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
кандидат биологических наук

Кан Наталья Енкиновна
Красный Алексей Михайлович

Официальные оппоненты:

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

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

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

Защита состоится «__» _____ 20__ года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «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 федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
<http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Hachatryn%20Z.V.-dissertation.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Задержка роста плода является одной из ведущих проблем современного акушерства, ее частота по данным различных авторов составляет 5-18% (Стрижаков А.Н. и соавт., 2017; Кан Н. Е. и соавт., 2019; Gardosi J. et al., 2013; Gordijn S.J. et al., 2016; Lee A.C. et al., 2017). Малые размеры для гестационного срока при рождении ассоциированы с увеличением заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, а также высоким риском развития сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний в зрелом возрасте (Сидорова И.С. и соавт., 2013; Игнатко И.В. и соавт., 2020; Barker D.J.P. et al., 2013; Meher S. et al., 2017; Menendez-Castro C. et al., 2018; Balasuriya C.N.D. et al., 2018).

Современные протоколы и рекомендации ведения беременных с задержкой роста плода основаны на использовании инструментальных и функциональных методов исследования. Однако их методологическая неоднородность и отсутствие единых референсных значений диктуют необходимость углубленного изучения этиопатогенетических механизмов, позволяющих выявить новые подходы к совершенствованию и разработке комплекса эффективных лечебно-диагностических мероприятий (Ходжаева З.С. и соавт., 2018; Ярыгина Т.А., Гус А.И., 2020; Figueras F. et al., 2018; McCowan L.M. et al., 2019).

В последние годы перспективным неинвазивным маркером для прогнозирования и своевременной диагностики различных осложнений беременности является изучение внеклеточной фетальной ДНК (вфДНК), выделение которой в материнский кровоток происходит преимущественно за счет процессов дифференцировки трофобласта (Красный А.М. и соавт., 2019; Litton C. et al., 2009; Taglauer E.S. et al., 2013; Carbone L. et al, 2020). Особое значение отводится определению данного маркера при задержке роста плода, так как последняя относится к плацента-ассоциированным осложнениям

беременности (Щеголев А.И., Серов В.Н. 2019; Cheng S.B. et al., 2018; Turco M.Y. et al., 2019).

В настоящее время большое значение приобретает исследование не только процессов формирования задержки роста плода, но и их эпигенетической регуляции (Дегтярева Е.И. и соавт., 2016; Januar V. et al., 2015; He Z. et al., 2016; Vaiman D., 2016). Изучение метилирования генов, участвующих в регуляции апоптоза, клеточной адгезии, ангиогенеза, иммунных и метаболических процессов представляет интерес не только в связи с их потенциальной ролью в формировании задержки роста плода, но и развитии отдаленных последствий в рамках реализации фетального программирования (Стрижаков А.Н. и соавт., 2019; Gondret F. et al., 2013; Kwon E.J. et al., 2017; Farag A.K. et al., 2018).

Таким образом, изучение внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов позволит составить представление о детерминантах развития и уточнить патогенетические аспекты формирования задержки роста плода, а также предложить новые подходы к ее диагностике.

Степень разработанности темы

В настоящее время отсутствие эффективных методов диагностики и прогнозирования задержки роста плода требует поиска новых прогностических и диагностических маркеров. Исследование внеклеточной фетальной ДНК является важной задачей современного акушерства, что во многом связано с изменением ее уровня до клинической манифестации некоторых осложнений беременности (Сухих Г.Т. и соавт., 2018; Hahn S. et al., 2012; Contro E. et al., 2017).

Существуют данные об ассоциации изменения уровня внеклеточной фетальной ДНК в I триместре с развитием задержки роста плода (Карапетян А.О., 2018; Alberry M.S. et al., 2009; Morano D. et al., 2018; Rolnik D.L. et al., 2018; Carrara J. et al., 2019). Однако, исследований, направленных на определение роли внеклеточной фетальной ДНК в диагностике и прогнозировании ранней и поздней форм задержки роста плода во II и III

триместрах недостаточно. Несмотря на значимость генетических факторов в развитии задержки роста плода пути их реализации остаются малоизученными. Данный факт обуславливает интерес исследования эпигенетических механизмов регуляции, в том числе метилирования генов, обеспечивающих фетальное программирование и отвечающих за развитие заболеваний в зрелом возрасте (Красный А.М., 2016; Schleithoff C. et al., 2012; Zhu Z. et al., 2019).

Вышеизложенное определяет актуальность темы исследования, а также дальнейшую перспективу изучения и внедрения полученных результатов в клиническую практику.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

Выделены наиболее значимые факторы риска и разработана модель прогноза формирования задержки роста плода.

Показано снижение концентрации внеклеточной фетальной ДНК при ранней форме задержки роста плода, обусловленное гипоплазией и изменением архитектоники плаценты с преобладанием стромального компонента.

Определены диагностически значимые уровни внеклеточной фетальной ДНК, позволяющие верифицировать формы задержки роста плода.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость

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

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

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

Выявление сниженных уровней метилирования гена *TLR2* и импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* в плаценте, плазме материнской и пуповинной крови при задержке роста плода определяет

возможность их применения в качестве неинвазивных прогностических маркеров.

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Личный вклад автора

Автором была произведена систематизация данных литературы по теме диссертации, на основании которой были сформированы цели и задачи работы, определен дизайн исследования.

Диссертантом осуществлялось ведение пациентов и их родоразрешение, забор биологического материала и участие в молекулярно-генетических исследованиях. Автором был произведен анализ клинико-

анамнестических данных, статистическая обработка полученных и научное обобщение полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Апробация работы

Основные положения работы представлены на: X Юбилейном региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» (Геленджик, 2017), XIX, XX, XXI Всероссийских научно-образовательных форумах «Мать и Дитя» (Москва, 2018, 2019, 2020), XXVI Европейском конгрессе перинатальной медицины (Санкт-Петербург, 2018), XXIV Всероссийском конгрессе «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 2019), XII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2019).

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

Внедрение результатов исследования

Практические рекомендации, основанные на результатах исследования, используются в работе акушерских отделений ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Материалы и результаты, полученные в ходе работы, используются в учебном процессе в виде практических занятий и лекций для клинических ординаторов, аспирантов, а также врачей различных регионов России, работающих в системе специализированной акушерско-гинекологической помощи.

Публикации результатов исследования

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

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 149 страницах компьютерного текста. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 28 рисунками. Библиографический указатель включает 291 работа цитируемых авторов, из них 45 на русском языке и 246 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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

Критериями включения в исследование для обеих групп являлись возраст пациенток от 18 до 45 лет, одноплодная беременность в сроке 22-40 недель, наличие добровольного информированного согласия, одобренного этическим комитетом. Для основной группы – беременность, осложнившаяся задержкой роста плода. Критерии исключения: тяжелая экстрагенитальная патология, многоплодная беременность, наступившая после донации ооцита, внутриутробные пороки развития плода, генетические заболевания матери и плода, острая фаза или обострение хронических инфекционных заболеваний у матери, миома матки больших размеров.

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)». Были изучены клинико-анамнестические данные, особенности течения беременностей и родоразрешения, а также состояние плодов и новорожденных.

Специальные методы исследования включали полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с целью исследования внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови, анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) и метод пиросеквенирования для изучения метилирования генов, гистохимическое исследование с применением метода терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) и иммунофлуоресцентный анализ для исследования плацент.

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

Результаты исследования и их обсуждение

Все пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям. Принимая во внимание указания ряда авторов на высокую частоту соматических заболеваний при задержке роста плода (Кан Н.Е. и соавт., 2019; Cetin I. et al., 2013; Battarbee A.N. et al., 2020), был проведен анализ ее структуры в исследуемых группах.

При задержке роста плода частота наследственных тромбофилий, обусловленных дефектами в генах II и V факторов свертывания крови ($n=6$, 5,7%) (OR=2,5 (1,4-9,2), $p<0,01$) и антифосфолипидного синдрома ($n=5$, 4,8%) (OR=2,1 (1,2-18,4), $p<0,01$) статистически значимо выше, чем в группе сравнения, что согласуется с данными других авторов о вкладе указанных факторов в развитие данного осложнения беременности (Макацария, А.Д. и

соавт., 2016; Мурашко А.В. и соавт., 2018; Cetin I. et al., 2013; Schreiber K. et al., 2016).

Была отмечена статистически значимо высокая частота заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно хронической артериальной гипертензии ($n=12$, 11,4%) ($OR=2,3$ (1,6-8,5), $p<0,01$), а среди заболеваний мочевыводящей системы – хронического пиелонефрита ($n=26$ (24,7%) ($OR=4,6$ (1,8-18,3), $p<0,01$), что соответствует данным об ассоциации задержки роста плода с наличием у матери сердечно-сосудистых заболеваний (Игнатко И.В. и соавт., 2017; Allen V.M. et al., 2004; Morgan J.A. et al., 2020) и инфекционно-воспалительных процессов в органах мочевыделительной системы (Тютюнник В.Л. и соавт., 2016; Nevis I.F. et al., 2011; Smaill F.M. et al., 2019).

Среди гинекологических заболеваний было отмечено статически значимое увеличение хронического цервицита в группе пациенток с задержкой роста плода ($n=14$, 13,3%) ($OR=1,6$ (0,8-16,3), $p<0,05$). Анализ акушерского анамнеза показал, что в основной группе наблюдалось статистически значимое увеличение частоты неразвивающейся беременности ($n=9$, 14,0%) ($OR=2,6$ (0,8-12,3), $p<0,05$) и задержки роста плода в анамнезе ($n=12$, 18,8%) ($OR=2,5$ (1,2-13,4), $p<0,05$). Полученные данные согласуются с данными отечественных и зарубежных авторов об ассоциации задержки роста плода с неразвивающейся беременностью (Тетруашвили Н.К. и соавт., 2014; Стрижаков А.Н. и соавт., 2017) и рождением маловесных детей (Казанцева Е.В., Долгушина Н.В., 2014; Gunnarsdottir J. et al., 2014) в исходе предыдущих беременностей.

При изучении течения беременности было отмечено, что частота угрожающего выкидыша с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности была статистически значимо выше при задержке роста плода ($n=18$, 17,1%) ($OR=2,1$ (0,6-4,2), $p<0,05$). Статистически значимых различий в частоте других осложнений беременности получено не было.

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

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

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

где e – основание натурального логарифма и имеет значение 2,71828182845904; $X1$ – хронический пиелонефрит; $X2$ – задержка роста плода в анамнезе; $X3$ – угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы; $X4$ – хронический цервицит.

Согласно проведенному ROC-анализу площадь под кривой составила 0,79 (95%, ДИ 0,73-0,85) с чувствительностью 73,2% и специфичностью 74,0%.

Анализ перинатальных исходов показал более неблагоприятное течение неонатального периода при задержке роста плода, особенно при ее ранней форме, что нередко было связано с досрочным родоразрешением, сроки которого в группе ранней формы задержки роста плода составили 33,1 (29;35,6) недели, в группе поздней формы – 37,6 (36,1;40,3) недель ($p<0,001$). Анализ массо-ростовых показателей установил, что в основной группе масса новорожденных составила 2210,4 (1790,5;2505,8) г, длина 46,0 (42,0;49,0) см, а в группе сравнения 3286,4 (3010,5;3670,4) г и 51,0 (50,0;54,0) см соответственно ($p<0,001$). При этом в группе задержки роста плода 10,5% составили дети с экстремально низкой массой, 14,3% – с очень низкой массой тела при рождении ($p<0,001$). Оценка новорожденных по шкале Апгар на 1-ой минуте в основной группе составила 6 (5;7), в группе сравнения – 8 (7;8), на 5-ой минуте жизни – 7 (6;8) и 9 (8;9) баллов соответственно ($p<0,001$). В структуре заболеваемости у детей основной группы статистически значимо чаще встречались асфиксия легкой ($n=10$, 9,5%) ($OR=2,3$ (0,9-12,4)) и тяжелой ($n=6$, 5,7%) ($OR=6,1$ (1,9-16,3)) степени, респираторный дистресс-синдром ($n=8$, 7,6%) ($OR=5,3$ (0,5-18,2)),

врожденная пневмония (n=34, 32,4%) (OR=3,6 (1,9-10,1)), бронхолегочная дисплазия (n=8, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2)), (p<0,05). Частота синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (n=12, 11,4%) (OR=2,6 (1,8-11,3)), внутрижелудочковых кровоизлияний (n=18, 17,1%) (OR=1,6 (0,8-9,6)), некротизирующего энтероколита (n=6, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3)) и неонатальной желтухи (n=29, 27,6%) (OR=5,6 (0,3-17,4), (p<0,05) также превалировала в основной группе.

Отсутствие до настоящего времени достоверных методов диагностики задержки роста плода определяет актуальность поиска новых молекулярно-генетических маркеров, способствующих не только раннему выявлению, но и оптимизации ведения беременных с задержкой роста плода. Было изучено содержание вфДНК, которое не установило статистически значимых различий в исследуемых группах. Однако, при анализе с учетом форм было выявлено снижение концентрации вфДНК при ранней форме задержки роста плода до 89,03 (44,52;178,32) ГЕ/мл, в отличие от поздней – 244,14 (145,23;422,47) ГЕ/мл и группы сравнения – 211,05 (133,64;567,81) ГЕ/мл (p<0,001) (рисунок 1А).

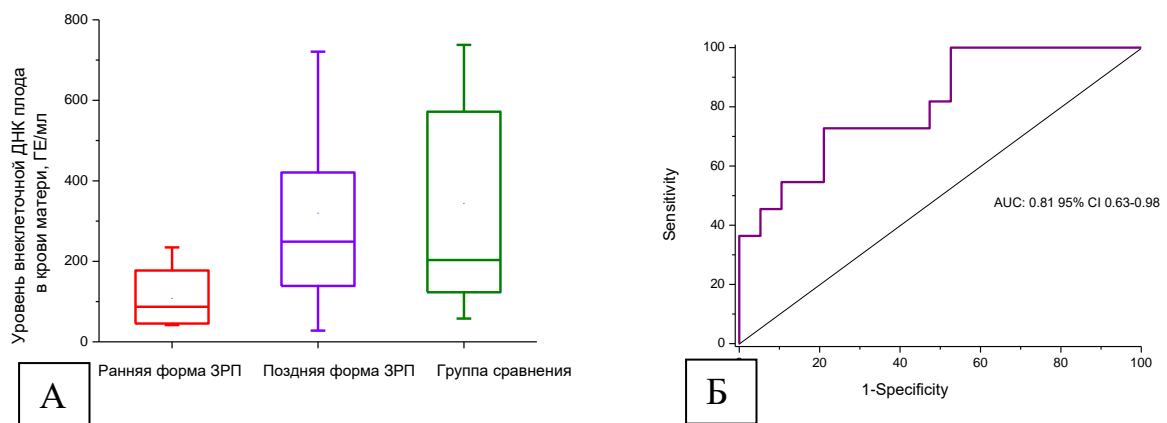


Рисунок 1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК при задержке роста плода (А). Оценка диагностической эффективности определения уровня вфДНК в плазме крови для выделения беременных женщин с ранней формой задержки роста плода (Б).

Проведенный ROC-анализ показал, что определение уровня вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении 119,11 ГЕ/мл позволяет верифицировать раннюю форму задержки роста плода с высокой

чувствительностью (73,1%) и специфичностью (79,3%) (AUC=0.81) (рисунок 1Б).

Полученные результаты согласуются с работами по изучению значимости вфДНК в диагностике задержки роста плода на ранних сроках беременности (Кудрявцева Е.В., 2020; Krishna I. et al., 2016; Morano D. et al., 2018; Carrara J. et al., 2019). Принимая во внимание данные о связи между уровнем вфДНК и развитием плацентарной дисфункции (Садекова А.А. и соавт., 2019; Rolnik D.L. et al., 2018) нами проведено исследование морфометрических показателей и гистологических особенностей плаценты. Выявлена сильная корреляционная связь между концентрацией вфДНК и массой плаценты ($r=0,79$; $p<0,001$). При иммунофлуоресцентном анализе плацент в группе ранней формы задержки роста плода обнаружено выраженное нарушение архитектоники с превалированием обширных аваскулярных зон за счет межворсинчатого фибриноида с изменением дифференцировки ворсин и доминированием стромального компонента (рисунок 2).

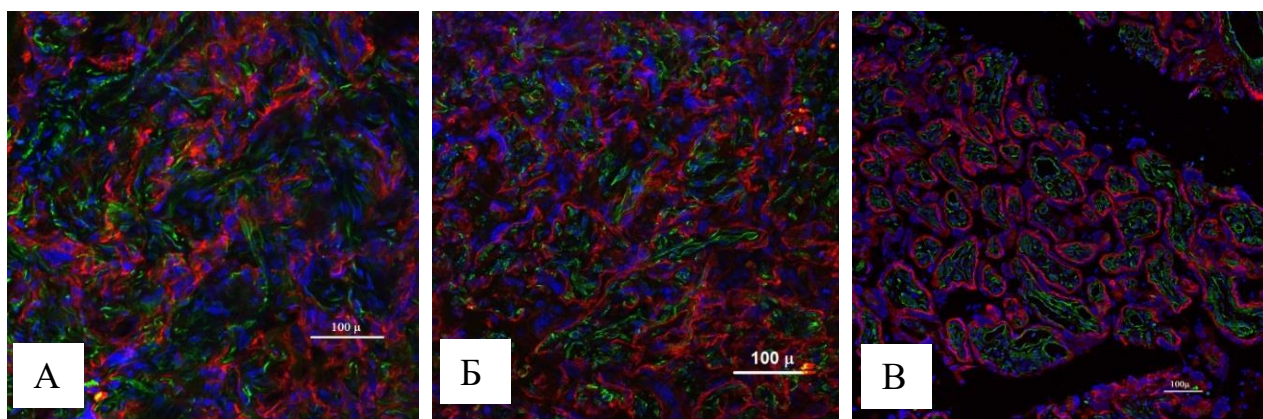


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентный анализ плацент при ранней форме задержки роста плода (А), поздней форме задержки роста плода (Б), физиологической беременности (В) Обозначения: красный – *E-cadherin*; синий – *DAPI*; зеленый – виментин

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

В исследованиях М.А. Clapp et al. (2015) с применением многовариантных логистических регрессий была подтверждена взаимосвязь между низким уровнем вфДНК и риском рождения маловесных к сроку гестации детей. Полученные нами данные установили наличие сильной прямой корреляционной связи между уровнем вфДНК, массой ($r=0,72$; $p<0,001$) и ростом ($r=0,71$; $p<0,001$) новорожденных в случаях ранней формы задержки роста плода. Выявленная зависимость может быть следствием нарушения плацентации, гипоплазии и изменения архитектоники плаценты. Определение диагностически значимых уровней вфДНК позволяет верифицировать формы задержки роста плода и согласуется с современными представлениями о различных механизмах их формирования. Кроме того, определение вфДНК позволяет прогнозировать риск рождения детей с низкими массо-ростовыми показателями.

Принимая во внимание сведения о высокой частоте осложнений при задержке роста плода и преэклампсии, мы провели исследование, которое показало более высокий уровень вфДНК при сочетании данных осложнений, составивший 2440,15 (1456,24;3696,56) ГЕ/мл ($p<0,001$). Данные представлены на рисунке 3А.

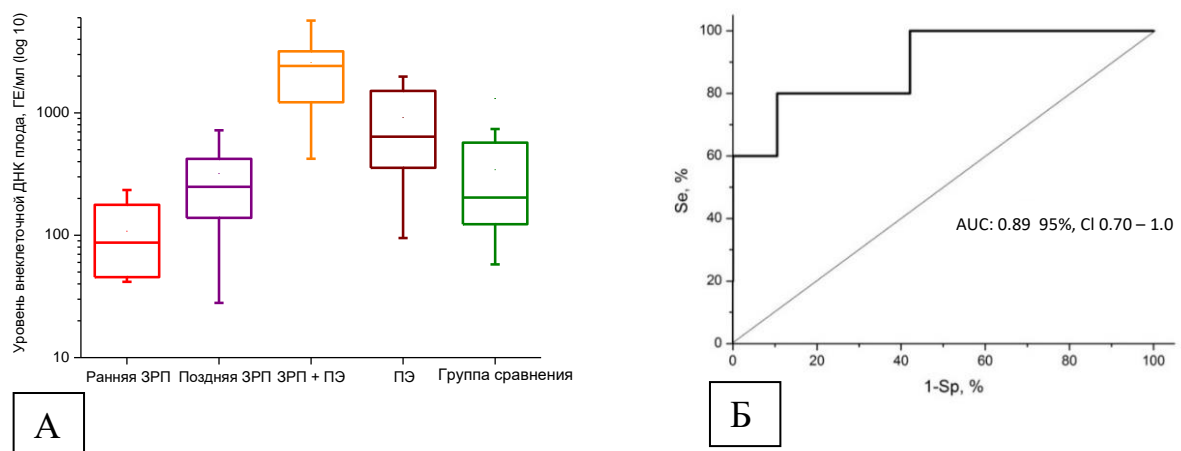


Рисунок 3. Исследование вфДНК при задержке роста плода и преэклампсии (А). Оценка диагностической значимости определения концентрации вфДНК у беременных с задержкой роста плода и преэклампсией с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока (Б)

Проведенный ROC-анализ установил, что площадь под ROC-кривой составила 0,89 (95%, ДИ 0,70-1,0). При пороговом значении ДНК 1608,23 ГЕ/мл, чувствительность составила 80,1%, специфичность 89,4% (рисунок 3Б). Полученные данные имеют важное практическое значение, так как сочетание указанных осложнений беременности характеризуется наиболее неблагоприятными перинатальными исходами (Кан Н.Е. и соавт., 2019; Lees S. et al., 2013; Carter E.V. et al., 2017).

Для изучения связи между плацентарными нарушениями и изменением уровня вфДНК было проведено гистохимическое исследование плацент при сочетании задержки роста плода и преэклампсии с применением TUNEL-метода. Было выявлено усиление апоптоза как клеток трофобласта ворсин всех генераций, так и стромы стволовых ворсин (рисунок 4), что согласуется с данными других исследователей, которые установили, что одним из основных источников наличия вфДНК в материнском кровотоке являются процессы апоптоза (Красный А.М. и соавт., 2018; Sifakis S. et al., 2015; Nandi, K. et al., 2020).

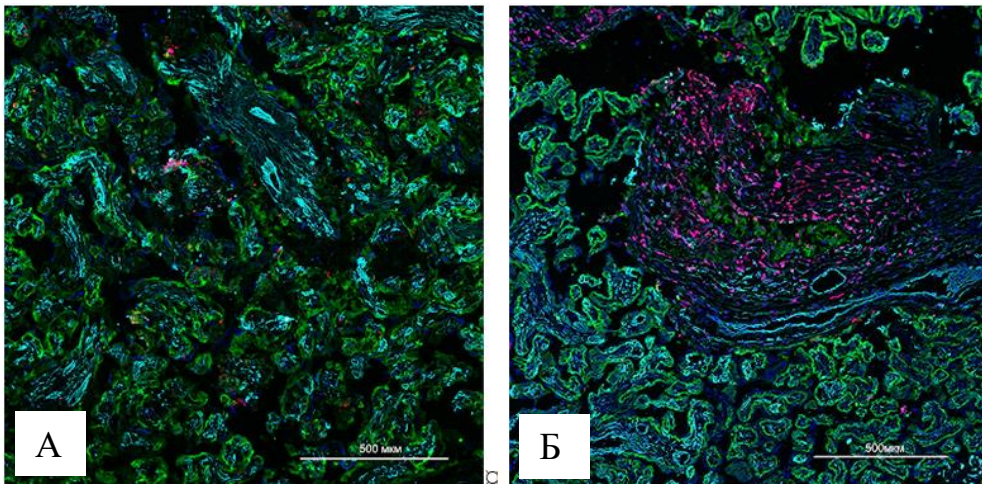


Рисунок 4. Гистохимическое исследование степени апоптоза TUNEL-методом при физиологической беременности (А) и сочетании задержки роста плода и преэклампсии (Б). Красный – TUNEL; синий – DAPI; зеленый – цитокератин-7; бирюзовый – виментин.

Эпигенетические процессы могут вносить существенный вклад в регуляцию патогенетических механизмов задержки роста плода (Schleithoff S. et al., 2012; Zhu Z. et al., 2019). Для исследования уровня метилирования

был произведен отбор генов с потенциальной ролью в патогенезе задержки роста плода – *CDO1*, *MMP2*, *CEBPA*, *LEP*, *HLA-G*, *VEGF*, *MEST*, *CDH1*, *TLR2*, *BMP6*, *GNA12*, *DAPK3*, *DFNA5*, ICR (импринтинг контролирующая область) *IGF2/H19*. Применение анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) выявило статически значимые изменения в генах *TLR2* и ICR *IGF2/H19* (рисунок 5).

Было выявлено снижение относительного уровня метилирования гена *TLR2*, составившее в группе задержки роста плода 0,26 (0,14;0,30), а в группе сравнения – 0,31 (0,26;0,34), ($p=0,01$), и снижение метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* до 0,17 (0,06;0,24) при задержке роста плода по сравнению с физиологической беременностью 0,33 (0,30;0,37), ($p<0,001$).

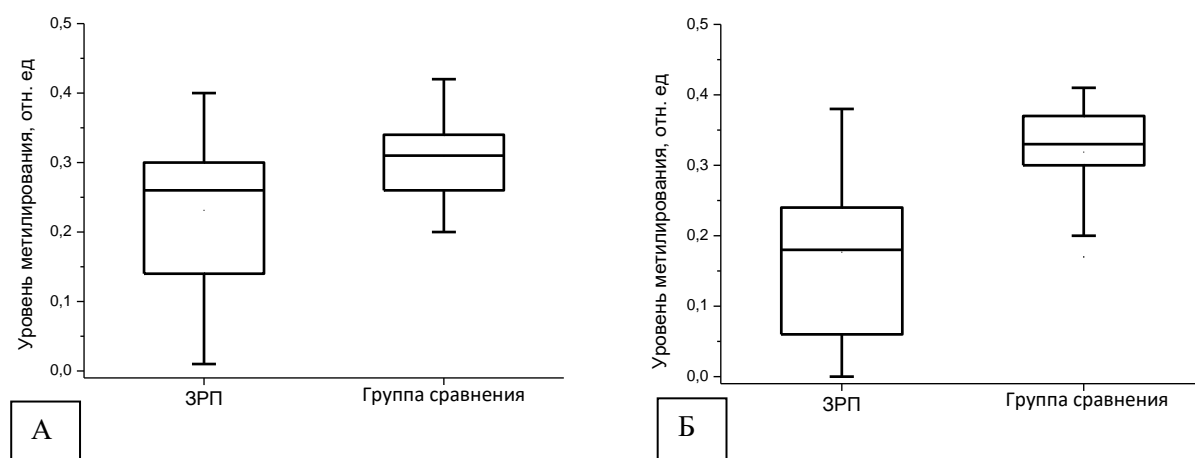


Рисунок 5. Относительный уровень метилирования *TLR2* (А) и импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* (Б) в плацентах при задержке роста плода и физиологической беременности.

На следующем этапе было проведено исследование метилирования *TLR2* и импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* в плазме материнской крови. Было обнаружено, что в группе ранней формы задержки роста плода уровень метилирования гена *TLR2* составил 0,01 (0,0;0,45) и был статистически значимо ниже, чем в группе сравнения 0,43 (0,05;0,53), ($p=0,02$) (рисунок 6А).

При пороговом значении относительного уровня метилирования *TLR2* 0,012 чувствительность метода составила 88,1%, а специфичность 60,2% (AUC=0,72, 95% ДИ 0,56-0,88) (рисунок 6Б).

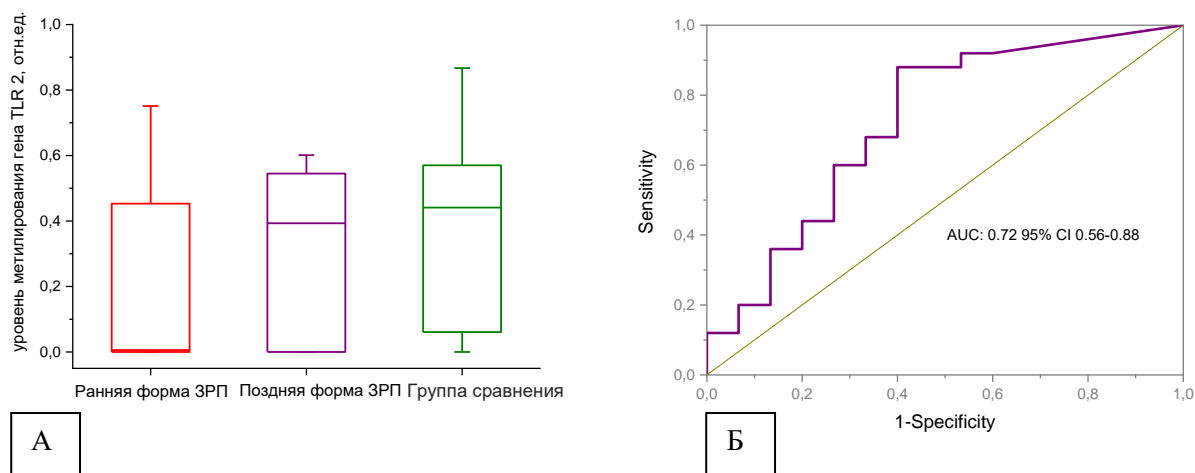


Рисунок 6. Относительный уровень метилирования гена *TLR2* в плазме материнской крови в исследуемых группах (А) и анализ ROC-кривой уровня метилирования гена *TLR2* для дифференциации групп беременных с ранней формой задержки роста плода (Б).

Активация *TLR2*, как известно, приводит к индукции апоптоза посредством адаптерных белков (Коган Е.А. и соавт., 2015; Abrahams V.M. et al., 2008). Учитывая специфичность проапоптотического эффекта для *TLR2*, снижение уровня метилирования гена *TLR2* может приводить к усилению его экспрессии и, как следствие, повышенному апоптозу в плаценте, что играет важную роль в патогенезе задержки роста плода.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* показало его снижение в группе ранней формы задержки роста плода до 0,22 (0,18;0,32), а в группе сравнения – 0,49 (0,44;0,65), ($p=0,03$) (рисунок 7А).

ROC-анализ показал, что при пороговом значении относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* 0,2, чувствительность метода составила 80,4 %, специфичность 80,1 % (рисунок 7Б).

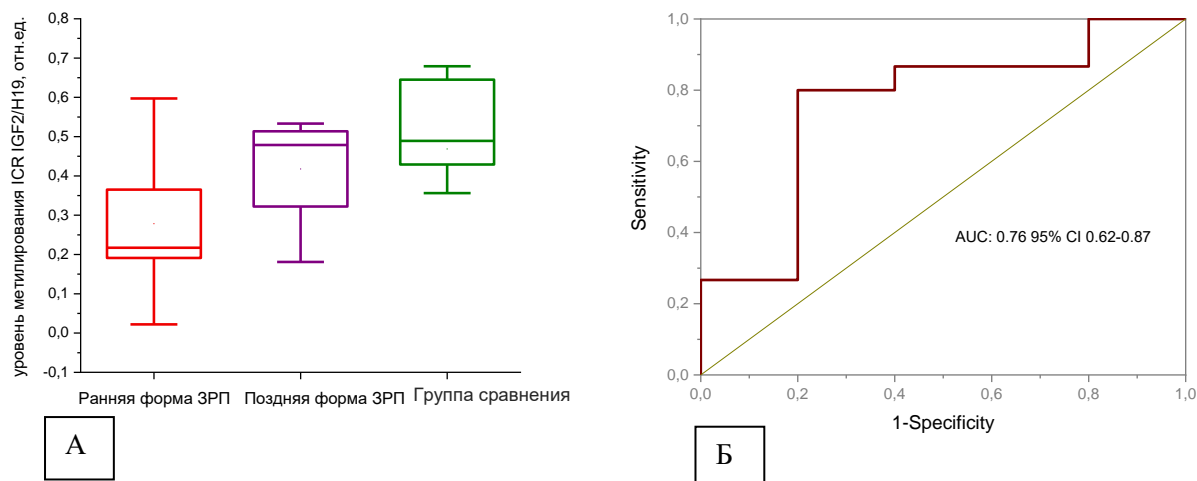


Рисунок 7. Относительный уровень метилирования ICR *IGF2/H19* в плазме материнской крови в исследуемых группах (А) и анализ ROC-кривой уровня метилирования ICR *IGF2/H19* для дифференциации групп беременных с ранней формой задержки роста плода (Б).

Для оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования ICR *IGF2/H19* в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования (рисунок 8А), который составил 42 (38,5;45) % при задержке роста плода, что было ниже значений в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5) %, ($p=0,02$)) (рисунок 8Б).

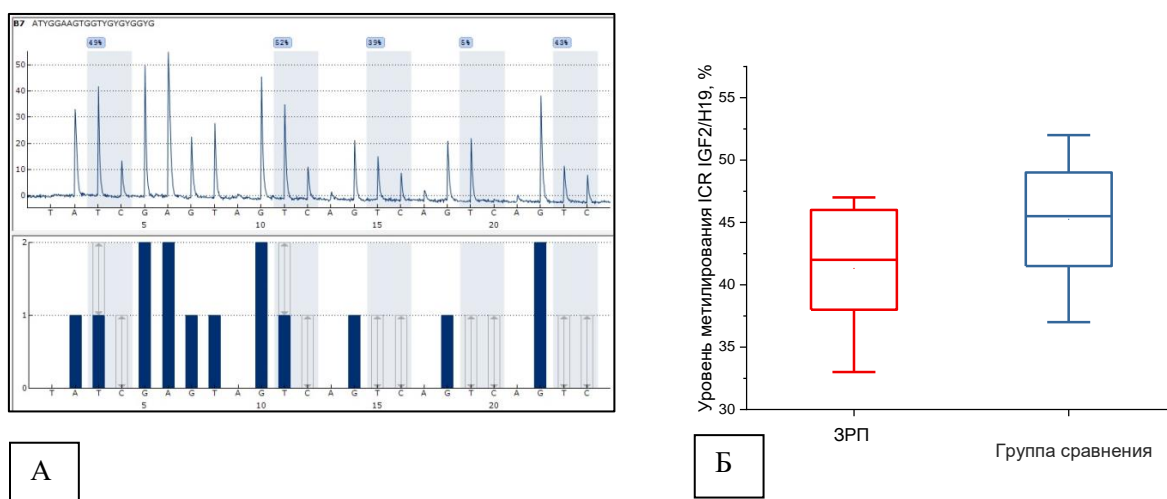


Рисунок 8. Пирограмма оценки метилирования ICR *IGF2/H19*. Выделены все CpG-сайты и показан уровень метилирования каждого в процентах (А). Определение уровня метилирования 2-ого сайта в шестом участке связывания ICR *IGF2/H19* методом пиросеквенирования (Б).

В основе геномного импринтинга лежат процессы метилирования регуляторных областей генов, которые приводят к их моноаллельной экспрессии. Проведенное нами исследование выявило снижение метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* при задержке роста плода, что согласуется с результатами, полученными при изучении метилирования генов в плаценте (Bourque D. K. et al., 2010; Koukoura O. et al., 2011; Xiao X. et al., 2016). Снижение метилирования ICR *IGF2/H19*, по-видимому, явилось причиной снижения экспрессии гена *IGF2*, и, соответственно, торможения регулируемых им многочисленных метаболических путей, что может играть решающую роль при задержке роста плода (Tabano S. et al., 2010; St-Pierre J. et al., 2012; Nawathe A.R. et al., 2016; Xing Y. et al., 2019). Полученные результаты позволяют предположить, что сформированные еще на антенатальном этапе эпигенетические изменения продолжают уже в неонатальном периоде, и имеют большое значение в реализации фетального программирования.

Таким образом, проведенное исследование позволило уточнить новые звенья патогенеза задержки роста плода, а именно роль нарушений эпигенетической регуляции апоптоза и пролиферации в формировании задержки роста плода и выделить новые неинвазивные маркеры для прогнозирования и диагностики задержки роста плода.

Выводы

1. К факторам риска задержки роста плода относятся: наследственные тромбофилии высокого риска (OR=2,5 (1,4-9,2)), антифосфолипидный синдром (OR=2,1 (1,2-18,4)), хроническая артериальная гипертензия (OR=2,3 (1,6-8,5)), пиелонефрит (OR=4,6 (1,8-18,3)) и цервицит (OR=1,6 (0,8-16,3)), неразвивающаяся беременность (OR=2,6 (0,8-12,3)) и задержка роста плода в анамнезе (OR=2,5 (1,2-13,4)), а также угроза прерывания с образованием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности (OR=2,1 (0,6-4,2)) ($p < 0,05$).

2. Разработанная модель, включающая выявленные факторы риска, обладает прогностической ценностью и позволяет определить вероятность формирования задержки роста плода с чувствительностью 73,2% и специфичностью 74,0%.

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

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

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

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

7. Аберрантное метилирование импринтинг контролирующей области генов *IGF2/H19*, принимающих участие в регуляции метаболических процессов, со снижением уровня до 42% (38,5;45), $p=0,02$) в пуповинной крови свидетельствует о его роли в развитии задержки роста плода.

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

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

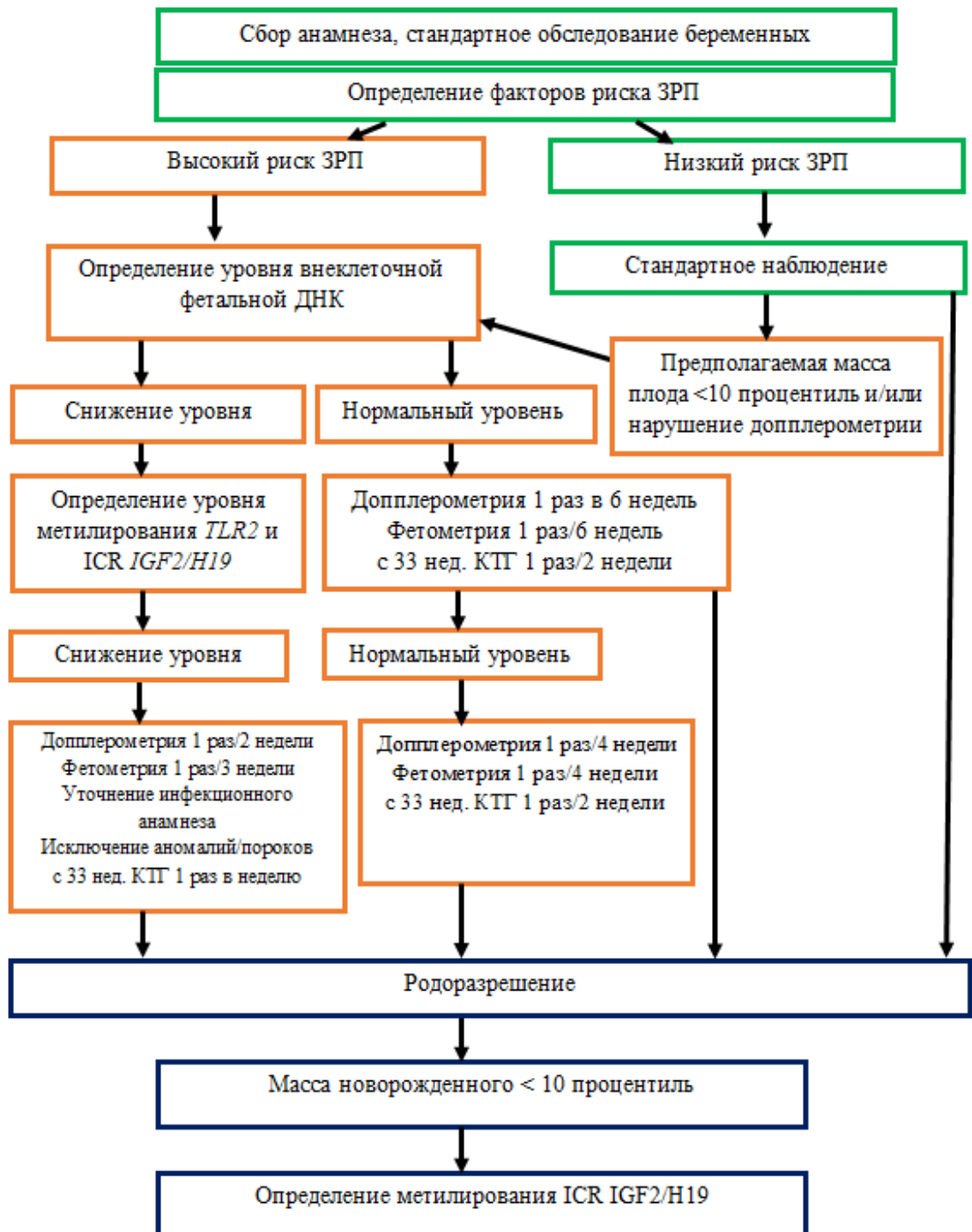
Практические рекомендации

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

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

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

Алгоритм диагностики задержки роста плода



Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Хачатурян А.А., Мантрова Д.А., Ганичкина М.Б., **Хачатрян З.В.** Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при задержке роста плода // Материалы X Юбилейного регионального научно-образовательного форума «Мать и Дитя». – Геленджик, 28–30 июня 2017. – С.121-122.
2. Красный А.М., Хачатурян А.А., Кан Н.Е., **Хачатрян З.В.**, Тютюнник В.Л., Волгина Н.Е., Ганичкина М.Б., Мантрова Д.А., Садекова А.А. Роль Е-кадгерина в формировании задержки роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2018. – №. 6. – С. 38-43.
3. **Хачатрян З. В.**, Ломова Н. А., Хачатурян А. А., Тютюнник В. Л., Кан Н. Е. Профилактика задержки роста плода при плацентарной недостаточности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.27-32.
4. Кан Н. Е., **Хачатрян З. В.**, Тютюнник В. Л., Ломова Н. А., Донников А. Е. Применение фолатов в профилактике задержки роста плода при беременности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.65-67.
5. Ломова Н. А., **Хачатрян З. В.**, Мантрова Д. А., Хачатурян А. А., Кан Н. Е., Тютюнник В. Л. Профилактика задержки роста плода при беременности // **Медицинский совет.** – 2018. – №. 13 – С.86-89.
6. Ганичкина М.Б., **Хачатрян З.В.**, Хачатурян А.А., Мантрова Д.А. Современные подходы к ведению беременных с задержкой роста плода // Материалы XII Международный конгресс по репродуктивной медицине. – Москва, 16-19 января 2019. – С.302-303.
7. Хачатурян А.А., **Хачатрян З.В.**, Мантрова Д.А., Ганичкина М.Б., Тютюнник В.Л., Кан Н.Е. Молекулярно-генетические предикторы врожденной инфекции при задержке роста плода // Материалы XII Международный конгресс по репродуктивной медицине. – Москва, 16-19 января 2019. – С.335-336.

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

9. **Хачатрян З.В.**, Ломова Н.А., Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Донников А.Е. Роль фолатов в профилактике задержки роста плода // Материалы XXV Всероссийского конгресса с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы». – Москва, 2-4 апреля 2019. – С.168-169.

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

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

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

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

14. Хачатрян З.В., Кан Н.Е. Роль внеклеточной фетальной ДНК в диагностике задержки роста плода // **Материалы форума «XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя – 2019» Москва, 25-27 сентября 2019.** – С. 81.

15. Хачатрян З.В., Харченко Д.К., Кан Н.Е. Роль трансформирующего фактора роста β в формировании преэклампсии и задержки роста плода // **Материалы форума «XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя – 2019» Москва, 25-27 сентября 2019.** – С. 81-82.

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

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

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

19. Кан Н.Е., Хачатрян З.В., Амирасланов Э.Ю., Чаговец В.В., Тютюнник В.Л., Ломова Н.А., Стародубцева Н.Л., Кициловская Н.А., Баранов И.И., Франкевич В.Е. Метаболомный профиль беременных при задержке роста плода // **Акушерство и гинекология.** – 2019. – №. 12. – С. 59-65.

20. Кан Н.Е., **Хачатрян З.В.**, Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Амирасланов Э.Ю., Тютюнник В.Л., Ломова Н.А., Франкевич В.Е. Анализ метаболических путей при задержке роста плода // **Биомедицинская химия.** – 2020. – Т. 66. – №. 2. – С. 174-180.

21. Kan N.E., **Khachatryan Z.V.**, Chagovets V.V., Starodubtseva N.L., Amiraslanov E.Yu., Tyutyunnik V.L., Lomova N.A., Frankevich V.E. Analysis of metabolic pathways in intrauterine growth restriction // **Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.** – 2020. – Vol. 14. – №. 4. – P. 356-362.