

**-МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

На правах рукописи

ХАЧАТРЯН

Зарине Варужановна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

КАН Наталья Енқыновна

кандидат биологических наук

КРАСНЫЙ Алексей Михайлович

Москва – 2021

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Современные представления о задержке роста плода (обзор литературы).....	12
1.1. Современные принципы диагностики и классификации.....	12
1.2. Этиологические и патогенетические аспекты задержки роста плода.....	19
1.3. Перспективы прогнозирования и диагностики задержки роста плода.....	23
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	31
2.1. Материалы исследования.....	31
2.2. Методы исследования.....	36
Результаты собственных исследований	
Глава 3. Исходная клинико-anamnestическая характеристика у беременных с задержкой роста плода.....	49
Глава 4. Течение беременности и ее исходы, диагностические критерии задержки роста плода на основании определения внеклеточной фетальной ДНК и метилирования генов.....	58
4.1 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови	69
4.1.1 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода	69
4.1.2 Исследование уровня внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода и преэклампсии.....	75
4.2. Исследование метилирования генов.....	78
4.2.1 Исследование метилирования генов в плаценте.....	78
4.2.2. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в плазме материнской крови при задержке роста плода.....	81

4.2.3. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в пуповинной крови при задержке роста плода.....	85
Глава 5. Обсуждение полученных результатов.....	88
Выводы.....	108
Практические рекомендации.....	110
Список сокращений.....	112
Список литературы.....	114

Введение

Актуальность проблемы

Задержка роста плода является одной из ведущих проблем современного акушерства, ее частота по данным различных авторов составляет 5-18% [3; 21; 98; 118; 143]. Данное осложнение беременности характеризуется патологическим состоянием ограничения генетически запрограммированного роста плода, которое свидетельствует о его страдании [262]. 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 [38; 40; 64; 66; 200; 201; 202].

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 [42; 45; 117; 199].

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 [7; 189; 266]. Особое значение отводится определению данного маркера при задержке роста плода, так как последняя относится к плацента-ассоциированным осложнениям беременности. Как известно, задержка роста плода сопровождается нарушением баланса между пролиферативными и апоптотическими процессами при формировании плаценты, что приводит к неполноценной

инвазии вневорсинчатого трофобласта в спиральные артерии и развитию гемодинамических нарушений в фето-плацентарном кровотоке [44; 88; 280].

С конца XX века внимание исследователей обращено на изучение взаимосвязи между низкой массой тела при рождении и риском развития метаболических, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний [64; 65; 66; 136; 155; 281; 285]. Понимание важности механизмов внутриутробного программирования легло в основу исследований в области эпигенетики [118; 124; 139; 151; 152; 153; 164; 171; 284, 287; 291]. Наиболее изученным эпигенетическим механизмом контроля экспрессии генов является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК [206]. 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.

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 [24; 85; 99].

Существуют данные об ассоциации изменения уровня внеклеточной фетальной ДНК в I триместре с развитием задержки роста плода [6; 60; 81; 149; 233; 283]. 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 [25; 250; 291]

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.

Методология и методы исследования

Работа была выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Клиническая часть работы выполнялась в акушерском отделении (заведующий – д.м.н., профессор Кан Н.Е.). Специальные методы исследования осуществлялись в лаборатории цитологии (изучение внеклеточной фетальной ДНК, метилирования генов) (заведующий – к.б.н. А.М. Красный) и в патологоанатомическом отделении (исследование плацент) (заведующий – д.м.н., профессор А.И. Щеголев). В исследование было включено 219 беременных, которые обратились в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России на проведение данного исследования. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие.

На первом этапе было проведено ретроспективное когортное исследование, в которое вошли пациентки с задержкой роста плода и физиологическим течением беременности. Пациентки с задержкой роста плода в зависимости от срока манифестации были разделены на раннюю и позднюю формы.

Стандартные методы исследования проводились в соответствии с приказом Минздрава России № 572н от 01 ноября 2012 г. На втором этапе были проведены специальные исследования: ПЦР в режиме реального времени, иммунофлуоресцентный и гистохимический анализ, MS-HRM (анализ кривых плавления с высоким разрешением) и пиросеквенирование.

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, рекомендованных 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЗАДЕРЖКЕ РОСТА ПЛОДА (обзор литературы)

1.1. Современные принципы диагностики и классификации

В настоящее время задержка роста плода (ЗРП) остается одной из актуальных проблем современного акушерства и не имеет тенденции к снижению [3; 21; 98;]. Согласно различным авторам частота ЗРП в России составляет от 5 до 18% [118; 143]. Результаты эпидемиологических исследований указывают на вариацию частоты ЗРП среди различных популяций. Данное осложнение беременности является более распространённым в странах, которые располагают ограниченными ресурсами. Исследовательская группа по эпидемиологии детского здоровья провела исследование с использованием данных международного консорциума по росту плода и новорожденного в 21-ом веке (INTERGROWTH-21) и получила данные, согласно которым доля маловесных к сроку гестации новорожденных составила 19,3 % в странах с ограниченными ресурсами, тогда как в развитых странах данная когорта составляет 10% [209; 272]. Важно отметить, что в данном исследовании доля маловесных к сроку гестации новорожденных в структуре неонатальной смерти составила 22 % [209].

Маловесные к сроку гестации дети входят в группу риска по развитию ряда осложнений в перинатальном периоде. Высокий риск антенатальных осложнений объясняет ассоциацию ЗРП с ятрогенными преждевременными родами [17; 38; 48]. Согласно многочисленным исследованиям, недоношенные маловесные к сроку гестации дети подвержены более высокому риску развития таких осложнений неонатального периода как некротизирующий энтероколит, внутрижелудочковые кровоизлияния, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, респираторный дистресс-синдром, бронхолегочная дисплазия по сравнению с недоношенными детьми антропометрическими показателями, соответствующими сроку гестации [99; 72; 242].

При задержке роста плода асфиксия является одним из наиболее распространенных осложнений перинатального периода, что связано с патогенетическими механизмами ее формирования, а именно развитием плацентарной недостаточности и гипоксического поражения органов, что в свою очередь вызывает перераспределение кровотока с его централизацией [99; 242]. Другим распространенным осложнением раннего неонатального периода является гипогликемия, риск которой повышается соответственно степени тяжести ЗРП, и связан с нарушением синтеза контринсулярных гормонов [136; 155]. Малые к сроку гестации новорожденные подвержены нарушениям иммунной системы, в частности снижением активности клеточного звена врожденного иммунитета [62]. Кроме того младенцы данной когорты входят в группу риска по развитию неврологических нарушений, гипербилирубинемии и выраженной термоллабильности [168; 288].

Помимо высокой заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, дети с ЗРП подвержены высокому риску развития сердечно-сосудистых, метаболических и неврологических заболеваний при достижении ими зрелого возраста [201]. Анализ эпидемиологических данных, опубликованных в последние четыре десятилетия, продемонстрировал, что низкая масса тела при рождении была связана с повышенным риском смерти от ишемической болезни сердца [65; 285], гипертензивных состояний [136], инсульта [167], а также метаболических нарушений [21; 64; 155]. Эти данные согласуются с концепцией внутриутробного программирования Баркера, согласно которой дефицит энергии и изменение механизмов регуляции влияют на метаболизм плода и осложняют не только перинатальный период, но также имеют отдаленные последствия [285].

В настоящее время в мировой практике нет единого термина, обозначающего состояние плода, при котором наблюдается уменьшение его

массо-ростовых показателей. ЗРП является патологическим состоянием ограничения генетически запрограммированного роста плода, которое свидетельствует о его страдании [50; 51]. При этом в структуре детей, рожденных с массой тела меньше 10-ого перцентиля, 50% составляют дети, низкая масса при рождении которых обусловлена конституциональными особенностями, в 40% низкая масса при рождении является исходом плацентарной недостаточности, а в 10% случаев связана с различными плодовыми факторами. Крайне важным является тот факт, что масса плода более 10-ого перцентиля необязательно свидетельствует о нормальном росте плода, что подчеркивает необходимость комплексной оценки состояния плода.

В настоящее время для обозначения данной патологии можно встретить такие термины как «маловесный к сроку гестации» и «задержка роста плода». Данные термины не являются синонимичными. Маловесный к сроку гестации («small for gestational age») – это плод с предполагаемой массой менее 10-ого перцентиля, обусловленной его конституциональными особенностями, а не задержкой роста [56]. Задержка роста плода («intrauterine growth restriction/retardation») – это патологическое ограничение генетически запрограммированного роста плода, свидетельствующее о его страдании [55]. Следует отметить, что даже в случае конституционально маловесного к сроку гестации плода нет доказательств отсутствия задержки его роста [50; 51; 262].

Маловесный к сроку гестации плод характеризуется умеренно малыми размерами, нормальными темпами роста в течение беременности, объемом амниотической жидкости и показателями доплерометрии пупочной артерии. При этом его размеры соответствуют таким характеристикам матери, как рост, масса, и этническая принадлежность [220].

Отсутствие единой системы диагностических критериев приводит к недостаточной эффективности антенатального выявления ЗРП [117; 131; 143]. В мировой практике нет единых общепринятых критериев для

постановки диагноза. Согласно Американскому колледжу акушеров и гинекологов (ACOG, 2019) и Канадскому обществу акушеров-гинекологов (SOGC, 2013) диагноз ЗРП устанавливается при предполагаемой массе плода менее 10-ого перцентиля по данным ультразвукового исследования [54]. По данным Королевского колледжа акушеров-гинекологов (RCOG, 2013), а также многоцентрового рандомизированного исследования К.Е. Voers et al. (2012) диагноз ЗРП может быть поставлен не только при предполагаемой массе плода менее 10-ого перцентиля, но и при выявлении окружности живота ниже данного значения [119; 232]. Согласно другим исследованиям диагноз ЗРП можно предположить при выявлении окружности живота менее 10-ого перцентиля по данным УЗИ и пульсационного индекса (ПИ) в пупочной артерии более 95-ого перцентиля [227; 240; 262]. Большой интерес представляет исследование J. Unterscheider et al. (2013), где оптимальными критериями при постановке диагноза ЗРП были выбраны окружность живота менее 5-ого перцентиля по данным УЗИ и ПИ в пупочной артерии более 95-ого перцентиля [217].

В одном из последних исследований, получивших популярность в мировом сообществе акушеров-гинекологов, с целью разработки единого консенсусного документа в 2016 году S.J. Gordijn и коллегами было проведено исследование для разработки единых критериев ЗРП на основе Дельфийской системы [98]. Для оценки важности каждого параметра эксперты использовали пятибалльную шкалу Ликерта, где 1 – абсолютно неважно; 2 – неважно; 3 – нейтрально; 4 – важно; а 5 баллов – очень важно. В опрос были включены фетометрические, доплерометрические и биохимические показатели. После обработки данных получены критерии, которые были одобрены более 60% экспертов, и рекомендованы в качестве диагностических критериев ЗРП. Данные факторы в последующем были разделены на большие и малые [98]. Для ранней формы были определены следующие большие критерии: окружность живота менее 3-его перцентиля, предполагаемая масса плода менее 3-его перцентиля, нулевой/реверсный

диастолический кровоток в пупочной артерии. Малыми критериями для постановки данной формы послужили: окружность живота менее 3-его перцентиля, предполагаемая масса плода менее 10-ого перцентиля; ПИ в маточных артериях или артериях пуповины более 95-ого перцентиля. Для поздней формы были также определены большие критерии – окружность живота менее 3-его перцентил и предполагаемая масса плода менее 3-его перцентиля. К малым критериям поздней формы ЗРП были отнесены фетометрические показатели – окружность живота менее 10-ого перцентиля, предполагаемая масса плода менее 10-ого перцентиля, замедление динамики прироста окружности живота (превышение двух квартилей), замедление динамики прироста предполагаемой массы плода (превышение двух квартилей). При этом для постановки диагноза согласно разработанной модели необходим один большой критерий или сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия [98].

Вопрос постнатальной постановки диагноза ЗРП не теряет своей актуальности в связи с отсутствием единых международных протоколов. Так как дети, с массой тела при рождении менее 10-ого перцентиля могут не иметь задержки роста, а новорожденные с массой более 10-ого перцентиля могут страдать от данной патологии, важным остается комплексная оценка состояния плода и новорожденного и поиск новых показателей, которые могут помочь в улучшении диагностики. Интересными представляются данные консенсуса по определению задержки роста у новорожденных, который был проведен в 2018 году. В результате проведенного исследования к большим диагностическим критерием задержки роста была отнесена масса новорожденного менее 3-его перцентиля согласно кривым роста [130]. Масса новорожденного менее 10-ого перцентиля, окружность головки менее 10-ого перцентиля, длина тела менее 10-ого перцентиля, наличие пренатального диагноза ЗРП и данные анамнеза об ассоциированных осложнениях (преэклампсия, артериальная гипертензия, инфекции) представлены как

малые критерии, а их сочетание в количестве трех и более было представлено в качестве постнатального подтверждения диагноза ЗРП.

В соответствии с МКБ-10 [International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)], ЗРП классифицируется в следующих рубриках (O30–O48), (O36), (P00–P96), (P00–P96).

В настоящее время наибольшей популярностью в клинической практике пользуется хронологическая классификация, основанная на разделении задержки роста плода на раннюю и позднюю формы. Порогом деления считается срок 32-34 недели по данным различных авторов [117; 131; 144]. Общепринятой точкой отсечки в настоящее время принят срок гестации 32 недели [144; 199]. Ранняя форма задержки роста плода (манифестация до 32 недель гестации) составляет 20-30% всех случаев. В основе формирования данной формы лежит нарушение плацентации, а именно неполноценная инвазия трофобласта в миометральный сегмент спиральных артерий, что приводит к увеличению сопротивления в маточных артериях, и повышает риск развития преэклампсии. В таких условиях возникающая гипоксия требует адаптации кардиоваскулярной системы плода, что проявляется его высокой толерантностью к низким уровням кислорода [96; 145]. Перинатальная заболеваемость и смертность при ранней форме являются крайне высокими, а главной проблемой является тактика ведения данной группы беременных [122; 203].

Поздняя форма (манифестация после 32 недель гестации) составляет 70-80% всех случаев задержки роста плода. При данном фенотипе незначительные плацентарные нарушения приводят к гипоксии легкой степени, которая также требует развития компенсаторных механизмов со стороны сердечно-сосудистой системы плода. При этом степень толерантности плода к гипоксии остается низкой, что делает невозможным его длительное пребывание в условиях низких уровней кислорода. Поздняя форма ЗРП редко ассоциирована с высоким риском развития преэклампсии

[133; 134]. Перинатальная заболеваемость и смертность при поздней форме остаются низкими, а главной проблемой является диагностика, так как при незначительных плацентарных нарушениях, ультразвуковые и доплерометрические показатели остаются в пределах нормативных значений [143].

Плацентарная недостаточность выступает в качестве одной из ведущих причин развития ЗРП, в связи с чем существуют классификации, основанные на степени плацентарных нарушений и совокупности показателей доплерометрии. Так, F. Figueras et al выделяют стадию 1, которая характеризуется умеренной плацентарной недостаточностью с сохранением кровотока в артериях пуповины, стадию 2 – тяжелую плацентарную недостаточность регистрацией в более чем половине сердечного циклов нулевого диастолического кровотока в артериях пуповины, стадию 3 – когда к вышеописанным изменениям присоединяются возникновение обратного диастолического кровотока в артериях пуповины, но с положительной а-волна в венозном протоке, и стадию 4 – когда в венозном протоке регистрируется отрицательная а-волна, свидетельствующая о высокой вероятности ацидоза у плода [117; 131;144].

Внутриутробный рост плода характеризуется сменой процессов клеточной гиперплазии на процессы клеточной гипертрофии. При этом наблюдается влияние определенных факторов данные процессы путем их торможения или ускорения. При задержке роста плода влияние этиологических факторов на ранних сроках гестации, когда преобладают процессы клеточной гиперплазии, приводит к развитию симметричной формы ЗРП, которая характеризуется ограничением потенциала роста плода, пропорциональным уменьшением всех фетометрических параметров [75; 76; 78]. При нарушениях на поздних сроках гестации после 30-32 недель, когда превалируют процессы клеточной гипертрофии, формируется асимметричная форма задержки роста плода, или гипотрофический тип, который характеризуется преимущественным отставанием размеров туловища при

относительно нормальных размерах головки и бедра [78]. Данная классификации не имеет клинического значения, однако, она важна для понимания патогенетических механизмов, вовлеченных в формирование ЗРП.

1.2. Этиологические и патогенетические аспекты задержки роста плода

Развитие ЗРП возможно под воздействием материнских, плацентарных, внутриутробных или генетических факторов, но также важным является то, что у каждой беременной может возникнуть индивидуальное сочетание различных патогенетических механизмов.

В современной литературе описаны многочисленные факторы риска развития ЗРП. Так, к материнским факторам относят возраст старше 35 лет, индекс массы тела меньше 20 и больше 25, короткий (меньше 6 месяцев) и длительный (больше 60 месяцев) интергравидарный период, низкое социальное положение, употребление алкоголя, наркотиков и курение являются важными факторами риска ЗРП [29; 232]. К существенным факторам риска относят соматические заболевания матери, сопровождающиеся хронической гипоксией и ангиопатией: хроническую артериальную гипертензию, сахарный диабет, хроническую болезнь почек, антифосфолипидный синдром [18; 23; 232]. К особенностям питания, которые могут внести вклад в развитие ЗРП относят потребление кофеина больше 300 мкг в сутки и исключение из диеты фруктов [232]. Воздействие ионизирующего излучения, проживание в высокогорных областях, стресс, депрессивные расстройства также являются факторами риска ЗРП [248; 268]. К плацентарным факторам риска относят – инфаркты и тромбозы плаценты и аномалии ее строения. Предрасполагающими факторами к ЗРП также могут послужить аномалии пуповины.

К плодовым факторам риска ЗРП относятся хромосомные аномалии, генетические мутации, врожденные пороки развития, болезни обмена, инфекционные поражения, а также многоплодная беременность [---].

В норме при инвазии вневорсинчатого хориона в спиральные артерии, происходит их преобразование вплоть до миометральных сегментов с потерей мышечных и эластических компонентов. Это приводит к потере способности спиральных артерий реагировать на вазоконстрикторные факторы. В течение многих лет считалось, что основной задачей ремоделирования спиральных артерий является увеличение перфузии в межворсинчатом пространстве, которая в определенной степени действительно повышает маточный кровоток от 45 мл/мин вне беременности до 750 мл/мин во время беременности. Однако основным эффектом расширения терминальных отделов спиральных артерий является обеспечение относительного замедления скорости кровотока во избежание разрушения ворсинчатого дерева, часть которого находится в непосредственном контакте с кровотоком. Снижение скорости кровотока обеспечивает время для транспорта кислорода, что является одним из немаловажных факторов нормального внутриутробного роста. Помимо данных процессов в миометрии наблюдается усиленное образование сосудистых шунтов между артериями и венами [224].

В основе формирования плацентарной недостаточности лежит неполноценная инвазия вневорсинчатого хориона с неполным преобразованием спиральных артерий, которое происходит только в децидуальных сегментах, не затрагивая миометральные. Это приводит к сохранению способности спиральных артерий отвечать на вазоконстрикторные агенты, что вызывает снижение маточно-плацентарной перфузии [75; 76]. Неполное преобразование спиральных артерий приводит к усиленной скорости материнского кровотока, следовательно, разрушению терминальных ворсин и выходу их фрагментов в материнский кровоток. Повреждение ворсинок приводит к выделению прокоагулянтов в межворсинчатое пространство, активации каскада коагуляции, окклюзии сосудов и инфаркту плаценты. В условиях плацентарной ишемии наблюдается окклюзия маточных сосудов, в том числе спиральных артерий,

пенистыми клетками, которые подобны наблюдаемым в системных сосудах при их атеросклеротическом поражении. Данные изменения приводят к развитию оксидативного стресса, что обусловлено сохраняющейся чувствительностью спиральных артерий к вазоконстрикторам [77; 78; 224].

Одними из наиболее изученных механизмов, демонстрирующих отдаленные последствия плацентарной недостаточности, являются процессы, которые лежат в основе повреждения головного мозга плода и приводят к возникновению реакций, напрямую или опосредованно влияющих на развитие головного мозга. Плацентарная недостаточность снижает синтез нейтрофических факторов, стероидов и их метаболитов, в том числе аллопрегнанолона, обладающего защитными функциями для головного мозга [175] и, таким образом, приводит к повреждению головного мозга. При задержке роста плода наблюдается запуск молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMP), активация макрофагов, а также идиопатический виллит, которые способствуют системной циркуляции медиаторов воспаления. Системная воспалительная реакция запускает диффузную активацию церебральной микроглии и нейровоспаления, опосредованного микроглией, что вызывает не только нарушение функции микроглии, но и повреждение созревающих олигодендроцитов. Наблюдаемая при плацентарной недостаточности гипоксия вызывает гибель нейроцитов и тем самым составляет основу для развития серьезных неврологических нарушений [175; 187].

Отсутствие единых диагностических критериев ЗРП оказывает негативное влияние на частоту обнаружения данной патологии на антенатальном этапе. Однако, помимо проблемы диагностики, в настоящее время внимание клиницистов занимает другая важная проблема – отсутствие эффективных методов лечения данного осложнения беременности. В связи с чем в настоящее время внимание исследователей обращено на изучение молекулярных механизмов формирования ЗРП, которые могут в будущем послужить основой для разработки эффективных методов лечения.

Развитие плаценты при беременности требуют баланса между пролиферативными и апоптотическими процессами. Апоптоз является одним из физиологических процессов при формировании плаценты, поэтому выход апоптотического материала в материнский кровоток не вызывает системный воспалительный ответ. При плацента-ассоциированных осложнениях беременности, наблюдается нарушение баланса между данными процессами [224]. При этом в плаценте наблюдается возникновение зон некроза в синцитиотрофобласте, которые способствуют высвобождению в системный кровоток матери, не только продуктов апоптоза, но и некроза. Не так давно был описан такой программируемый тип некротической клеточной гибели как некроптоз [178]. В настоящее время известны несколько белков, которые участвуют в реализации сигнальных путей некроптоза. Среди них NAD-зависимая деацетилаза сиртуин 2 (SIRT 2), псевдокиназа смешанного происхождения (MLKL) [178]. Однако, наиболее важными белками, которые участвуют в инициации процессов некроптоза являются протеинкиназы 1 и 3, взаимодействующие с белком (RIPK 1 и 3). При некроптозе образуется внутриклеточный комплекс, который активирует SIRT 2 и вызывает деацетилирование RIPK 1 [178]. Данный процесс путем фосфорилирования RIPK 3 позволяет активировать псевдокиназу MLKL, который путем регуляции обмена ионов, меняет осмотическое давление и вызывает разрыв плазматической мембраны [224]. Большой интерес представляет изучение плацент при задержке роста плода с точки зрения реализации данных механизмов. N.J. Hannan и соавт. обнаружили SIRT 2 и RIPK 1 в цитоплазме цитотрофобласта, синцитотрофобласта и эндотелии во всех плацентах при задержке роста плода. Обнаружение ключевых участников подтвердило присутствие некроптоза при плацентарной недостаточности [178].

Необходимо отметить, что любые изменения со стороны матери, плаценты или плода могут потенциально влиять на биологическую активность плода и приводить к нарушению его роста. Таким образом,

изучение механизмов, лежащих в основе данных процессов, может стать основой для разработки в будущем новых терапевтических подходов.

1.3. Перспективы прогнозирования и диагностики задержки роста плода

Современные протоколы диагностики ЗРП включают в себя комбинированные алгоритмы с использованием биохимических, ультразвуковых и доплеровских методов исследования. В настоящее время большой интерес представляет поиск и новых неинвазивных маркеров, которые могли бы выступить в качестве прогностических и диагностических в отношении ЗРП. В 2000 году С. Ong et al. провели оценку уровня бета-хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) и ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы (РАРР-А) на 10-14 недели гестации и пришли к выводу, что низкие уровни бета-хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) и РАРР-А ассоциированы с развитием осложнений беременности [214]. Подобные результаты были получены в исследовании К. Spencer et al. в 2005 году, в котором были получены данные об ассоциации низкого уровня РАРР-А с неблагоприятными исходами беременности [146; 227]. Однако, согласно исследованиям Т. Leung et al. и Y. Zhong et al. при уровне РАРР-А в первом триместре ниже 5-го перцентиля чувствительность обнаружения ЗРП колеблется в диапазоне от 8 до 33 %, что демонстрирует РАРР-А в качестве недостаточного скринингового инструмента [226, 231; 23].

В исследовании Е. Keikkala проводилось исследование уровня гипергликозилированного хорионического гонадотропина человека в первом триместре. Было обнаружено, что низкий уровень данного маркера коррелировал с низким уровнем ассоциированного с беременностью протеина-А плазмы и приводил к плацента-ассоциированным осложнениям беременности. Согласно полученным данным прогностическая способность гипергликозилированного хорионического гонадотропина показала 90%

специфичность и 69% чувствительность при учете среднего артериального давления [145].

Плацентарный белок 13 (PP-13) представляет собой пептид, участвующий в процессах инвазии трофобласта в спиральные артерии и их ремоделировании. В 2007 году I. Chaftez et al. показали, что низкие уровни плацентарного белка 13 в первом триместре были ассоциированы с преждевременными родами у женщин с ЗРП [148]. Используя комплексную оценку, включающую определение уровня плацентарного фактора 13, ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы и доплерометрии маточной артерии на 11-13 неделе беременности, L. Poop et al. определили модель прогнозирования ЗРП с высокой чувствительностью и специфичностью, а частоту ложно-положительных результатов в 5% [138; 147].

Такие связанные с плацентой ангиогенные факторы как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарный фактор роста (PlGF) также оценивались во многих исследованиях. Растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFlt-1) представляет собой антиангиогенный протеин, выполняющий роль мощного ингибитора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF) путем блокирования их взаимодействия со специфическими рецепторами. Дисбаланс между антиангиогенными и ангиогенными факторами связан с развитием таких плацента-ассоциированных осложнений беременности как преэклампсия и ЗРП [174].

В 2013 году A. Conde-Agudela et al. провели метаанализ, который включил в себя 53 исследования и 39974 женщин. В исследовании была проведена оценка 37 новых биомаркеров, среди которых были факторы, связанные с ангиогенезом – плацентарный фактор роста (PlGF), растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFlt-1), растворимый эндоглин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); биомаркеры, отражающие эндотелиальную функцию и окислительный стресс – гомоцистеин, лептин, асимметричный

диметиларгинин (ADMA), растворимая межклеточная молекула адгезии (sICAM-1), интерферон-С, С-реактивный белок, фолат; связанные с плацентой белки – связывающие инсулиноподобный фактор роста белки-1 и -3, металлопротеаза 12 (ADAM-12), плацентарный белок 13, активин А, гормон роста (GH) плаценты, а также такие генетические маркеры и исследования по метаболомике. Результаты метаанализа показали, что ни один из оцененных биомаркеров не показал высокой прогностической значимости в отношении ЗРП [96; 147].

Таким образом, результаты исследований демонстрируют отсутствие в настоящее время высокоинформативных неинвазивных предикторов ЗРП, что диктует необходимость поиска новых маркеров данного осложнения беременности.

Открытие внеклеточной фетальной ДНК (cff-DNA) в 1997 году Y.M. Lo и соавт. стало революционным событием в клинической генетике, расширив возможности неинвазивной пренатальной диагностики [190]. Данная работа легла в основу многочисленных исследований, стремившихся расширить диагностические возможности вфДНК. Первые попытки клинического применения данного маркера были предприняты с целью определения пола плода в случаях отягощенного семейного анамнеза по сцепленным с полом заболеваниям [103; 239]. В дальнейшем большой вклад в совершенствование методологических подходов внесла разработка количественной ПЦР в режиме реального времени с целью идентификации конкретных генов плода [215; 227]. Так, были обнаружены специфичные для Y-хромосомы последовательности DYS14 и DYZ3 Y-хромосомы плода [116; 264], что стало основой для исследований по определению уровня вфДНК при анеуплоидных беременностях [219; 235]. Большое значение имели исследования вфДНК методом ПЦР в режиме реального времени при заболеваниях, связанных с мутацией конкретных генов [189]. Обнаруженные в 2006 году K.C. Chan и соавт. изменения в степени метилирования промотора RASSF1A гена в материнской и фетальной внеклеточной ДНК

легли в основу разработки нового метода исследования. Учитывая то, что промотор RASSF1A гена гиперметилирован в фетальной фракции внеклеточной ДНК, его идентификация путем ПЦР в режиме реального времени соответствует вфДНК и дает точное представление об ее уровне [137; 161; 212]. Весомым событием в области неинвазивной пренатальной диагностики стало определение вфДНК с помощью массивного параллельного секвенирования или секвенирования второго поколения (next-generation sequencing – NGS) [55; 212]. Данный метод расширил возможности диагностики не только анеуплоидий, но и других хромосомных аномалий плода [74; 87; 89; 213; 268].

Внеклеточная фетальная ДНК составляет лишь 10% от общего количества внеклеточной ДНК, который циркулирует в материнском кровотоке [54; 138; 212]. Вопросы происхождения вфДНК все еще остаются не до конца изученными. В настоящее время концепция о плацентарном происхождении внеклеточной фетальной ДНК (вфДНК) является общепринятой и находит подтверждение во многих исследованиях [190]. Косвенными доказательствами являются результаты исследований, демонстрировавших рост концентрации вфДНК со сроком беременности [60], корреляцию ее уровня с плацентарными факторами [114] и элиминацию после завершения беременности [237]. Как известно, после родов вфДНК элиминируется из организма в течение непродолжительного времени [237], в то время как в случае неполного самопроизвольного выкидыша [149], анэмбриональной беременности [87] сохраняются ее высокие значения. Обнаружение в материнской крови специфичных плацентарных молекул также явилось доказательством плацентарной природы вфДНК [209]. Другим свидетельством плацентарного происхождения вфДНК были выявленные корреляционные связи ее концентрации с хорионическим гонадотропином человека [238; 264]. Так, D. Rolnik и соавт., получили прямую корреляционную связь между уровнем плацентарных белков PAPP-A и PIGF с уровнем вфДНК при преэклампсии и задержке роста плода, что

также может служить одним из доказательств плацентарной природы вфДНК [60]. Другим источником вфДНК могут быть попавшие в материнский кровоток и подвергшиеся апоптозу гемопозитические клетки плода. Данная теория была опровергнута после обнаружения вфДНК к 28-30 дню гестации – периоду, когда нет установленного фето-плацентарного кровообращения [68]. Другим описанным механизмом повышения уровня вфДНК является непосредственный перенос ДНК через плаценту или оболочки за счет градиента концентрации [69].

В. Huppertz и соавт. показали, что плацента характеризуется последовательными процессами пролиферации, дифференцировки цитотрофобласта и дальнейшего апоптоза клеток [114]. На основании проведенных *in vitro* исследований авторы выдвинули предположение о том, что вфДНК выделяется в материнский кровоток при слиянии клеток в процессе формирования синцитиотрофобласта [158; 159; 160]. Дальнейшее развитие данное предположение нашло в исследовании С. Litton и соавт., которые показали, что клетки трофобластического происхождения высвобождаются в материнский кровоток в форме синцитиальных узлов и служат основным источником вфДНК [189] (рисунок 1). Помимо апоптоза, сопровождающим нормальное развитие плаценты, другими причинами высвобождения вфДНК в материнский кровоток могут стать некроз и апонекроз клеток [189]. Кроме того, одним из описанных механизмов повышения уровня вфДНК является прямой перенос ДНК через плаценту или амниотические оболочки [219], что доказано путем выявления вфДНК в других биологических тканях матери [68; 69]. Плацентарное происхождение вфДНК делает ее специфичным для беременности маркером и объясняет большой интерес ее изучения в качестве неинвазивного маркера осложнений беременности.

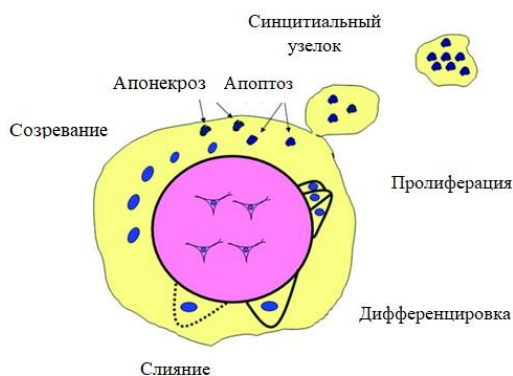


Рисунок 1. Клетки цитотрофобласта пролиферируют и подвергают дифференцировке во время роста плода. Сливаясь с синцитиотрофобластами, они образуют апоптотический материал, который выделяется в материнский кровоток в виде синцитиальных узелков. Иногда апонекроз возникает, если апоптотический каскад не происходит и некротический материал попадает в материнскую кровоток.

Первые исследования в данной области были направлены на изучение уровня вфДНК при ПЭ. Так, 1997 году Y.M. Lo и соавт. продолжили свои исследования и обнаружили повышение уровня вфДНК при ПЭ, предположив, что в основе полученных изменений лежат как усиление процессов высвобождения нуклеиновых кислот в материнский кровоток, так и снижение их клиренса [29]. S. Hahn и соавт. предположили, что вфДНК может выступать в качестве прогностического маркера ПЭ [190]. Более поздние исследования продемонстрировали взаимосвязь диагностической значимости вфДНК с тяжестью преэклампсии [94].

Одним из первых исследований по оценке вфДНК при ЗРП была работа A. Sekizawa и соавт. в 2007 году, где были получены результаты об отсутствии значимых изменений уровня вфДНК при ЗРП по сравнению с физиологически протекающей беременностью. Стоит отметить, что полученные результаты могли быть обусловлены малой выборкой исследования [83; 84]. Подобные результаты были получены и позднее у T. Rafaeli-Yehudai и соавт., которые также проводили сравнительный анализ концентрации вфДНК при ЗРП и нормальной беременности [197]. Исследование K. D. Gerson и соавт. показали, что фракция фетальной ДНК ниже 25-ого перцентилля не была ассоциирована с рождением маловесных

детей, однако, была связана с развитием плацентарной недостаточности и гипертензивных расстройств [194]. Диаметрально противоположные данные были получены в работе M. Smid и соавт., где было продемонстрировано повышение уровня вфДНК при ЗРП [102]. Данное исследование не было единственным в этой области. В последующем похожие результаты были получены в исследованиях M. Alberty и соавт. [149; 233] и M. Al Nakib и соавт. [277], которые также представили данные о повышении вфДНК при ЗРП. Стоит отметить, что в вышеописанных исследованиях авторами не было проведено разделение исследуемых групп ЗРП на раннюю и позднюю формы, что может иметь большое значение ввиду различных патогенетических вариантов данных форм.

Другая часть исследований показала снижение уровня фетальной фракции внеклеточной свободной ДНК. Так в работе D. L. Rolnik и соавт. было показано, что низкие концентрации внеклеточной фетальной ДНК в первом триместре отражают плацентарную недостаточность и ассоциированы с такими осложнениями беременности как ЗРП и ПЭ [60]. D. Morano и соавт., провели сравнение уровней фетальной фракции свободной внеклеточной ДНК в первом триместре беременности между группами женщин, у которых беременность осложнилась ранней и поздней формой задержки роста плода, и контрольной группой. Согласно полученным данным, медиана внеклеточной фетальной ДНК составила 0,69 (ДИ 0,44 – 0,84) для ранней формы ЗРП, 0,93 (ДИ 0,83 – 1,03) для поздней формы и 1,00 (ДИ 0,89–1,12) для контрольной группы. Полученные результаты подтвердили выдвинутую авторами гипотезу об ассоциации низких концентраций вфДНК с низкой массой плаценты и плацентарной недостаточностью, которая сопровождает практически все случаи ранней формы ЗРП [81]. Однако данные ретроспективные исследования были проведены на ранних сроках беременности с целью оценки прогностической роли вфДНК в отношении ЗРП.

Изучение эпигенетических изменений ДНК представляет большой интерес в связи с перспективностью разработки новых диагностических тестов на основании определения эпигенетических меток в биологических субстратах. Эпигенетические механизмы – квазистабильные, обратимые и наследуемые модификации изменений структуры хроматина или ДНК с их последующей фенотипической экспрессией. Данные механизмы приводят к изменению активности гена без изменений его кодирующей последовательности. Благодаря совершенствованию молекулярно-генетических методов исследования, стала возможной оценка эпигенетической регуляции. Тем не менее, многие вопросы работы данной системы остаются невыясненными. В настоящее время изучены следующие эпигенетические механизмы: метилирование цитозиновых оснований ДНК, модификация гистонов [142], ремоделирование хроматина [151] и регуляция экспрессии генов малыми некодирующими РНК (miRNA) [188]. Полученные знания об эпигенетической регуляции позволят в будущем внедрить их в развитие новых терапевтических методов. Обратимый и неспецифичный характер эпигенетических факторов и их роль в качестве посредников между геномом и окружающей средой, делает их одними из самых перспективных терапевтических мишеней. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов, осуществляющих контроль генной экспрессии, является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК [206; 249].

Таким образом, несмотря на совершенствующиеся схемы скрининга и диагностики, ЗРП не имеет тенденции к снижению, в связи с чем актуальным остается поиск и разработка новых высокочувствительных и специфичных диагностических тестов пренатальной диагностики ЗРП. В настоящее время большой интерес представляет применение молекулярно-генетических методов в неинвазивной диагностике осложнений, связанных с беременностью.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

С 01 октября 2017г. по 01 августа 2019г. проведено исследование, в которое согласно особенностям течения беременности и критериям включения и исключения были включены 305 пациенток. В дальнейшем после постнатального подтверждения диагноза в исследование были отобраны 219 беременных. С целью уточнения вклада факторов риска в развитие ЗРП на 1 этапе исследования было проведено когортное ретроспективное исследование, в которое были включены 2 группы – группу I (основную) составили 105 беременных с ЗРП, группу II (сравнения) 114 пациентки с физиологической беременностью. С учетом срока манифестации ЗРП, основная группа I была разделена на две подгруппы: IA – 49 беременные с ранней формой и IB – 56 пациенток с поздней формой ЗРП.

Для поиска диагностических маркеров и неинвазивных предикторов данного патологического состояния был проведен 2 этап исследования. Основную группу I составили 48 беременных с ЗРП, а группу II – сравнения – 45 пациенток, у которых беременность протекала без осложнений. Принимая во внимание различные клинические и патогенетические критерии ранней и поздней формы ЗРП, основная группа I была разделена на 2 подгруппы: IA – 23 беременные с ранней формой и IB – 25 пациенток с поздней формой ЗРП (рисунок 2).

Все пациентки были проинформированы с целью и методами проводимого исследования, и ими были даны информированные согласия на участие в научном исследовании.

Работа выполнялась в ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН Г.Т. Сухих). Клиническая часть работы выполнена в акушерском отделении (заведующий – д.м.н., профессор Н.Е. Кан). Специальные методы исследования осуществлялись в лаборатории цитологии (заведующий – к.б.н. А.М. Красный).

Когортное ретроспективное исследование

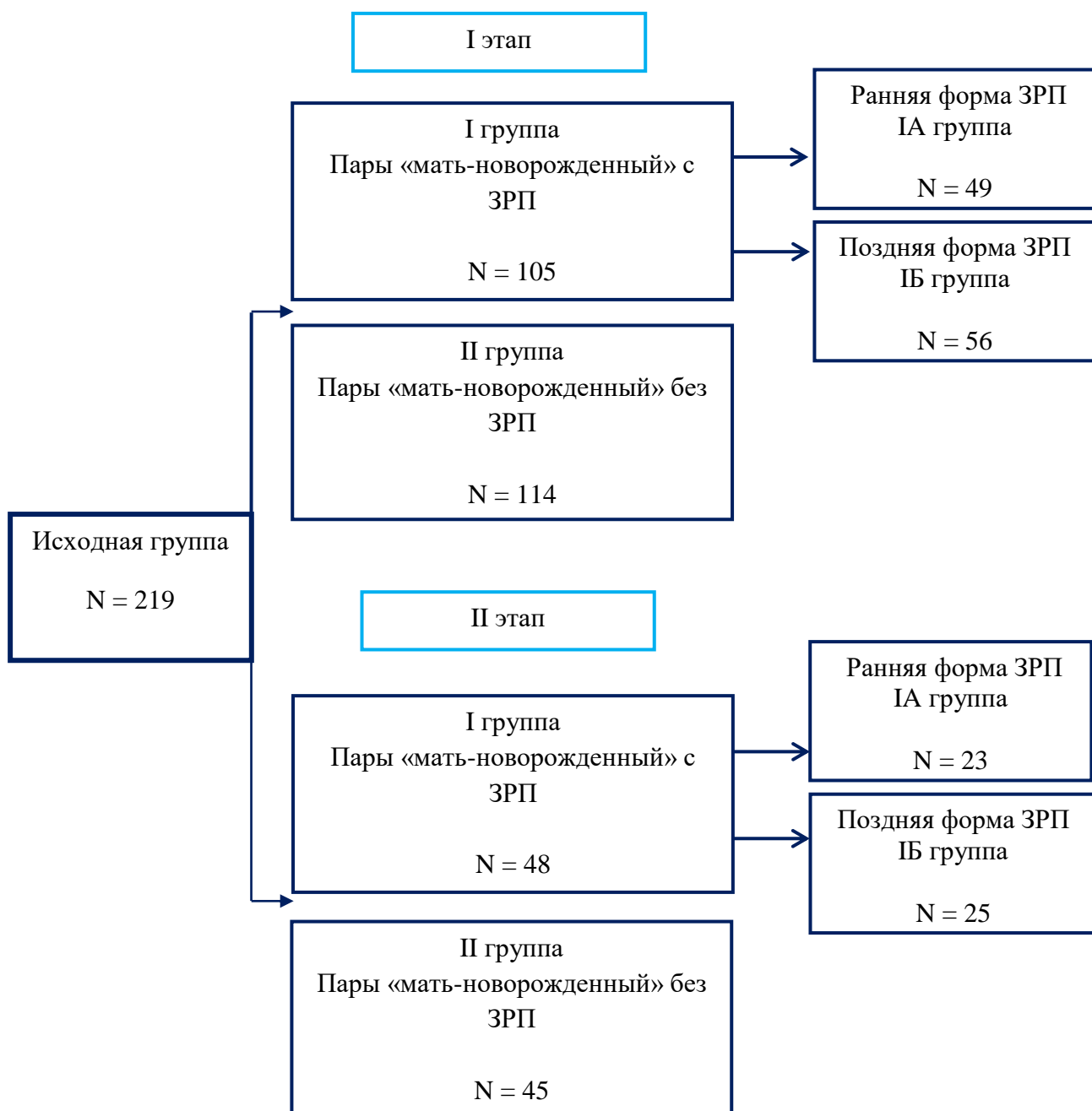


Рисунок 2. Дизайн исследования

Диагноз ЗРП на антенатальном этапе устанавливался согласно критериям единого консенсусного документа по Дельфийской системе для ранней и поздней форм ЗРП (таблица 1).

Таблица 1. Критерии диагностики ранней и поздней форм ЗРП согласно международному консенсусу по Дельфийской системе (2016 год)

Критерии диагностики ранней формы ЗРП		
Большие критерии (достаточного одного для диагностики)	Малые критерии (необходимо сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия)	
ОЖ меньше 3-го перцентиля ПМП меньше 3-го перцентиля Нулевой и реверсный диастолический кровотоки в артериях пуповины	Фетометрические критерии	Допплерометрические критерии
	ОЖ меньше 10-го перцентиля ПМП меньше 10-го перцентиля	ПИ в маточных артериях больше 95-го перцентиля ПИ в артериях пуповины больше 95-го перцентиля

Критерии диагностики поздней формы ЗРП		
Большие критерии (достаточного одного для диагностики)	Малые критерии (необходимо сочетание как минимум одного фетометрического и одного доплерометрического критерия)	
ОЖ меньше 3-го перцентиля ПМП меньше 3-го перцентиля	Фетометрические критерии	Допплерометрические критерии
	ОЖ меньше 10-го перцентиля ПМП меньше 10-го перцентиля Замедление динамики прироста ОЖ (превышение двух квартилей) Замедление динамики прироста ПМП (превышение двух квартилей)	ПИ в артериях пуповины больше 95-го перцентиля ЦПО меньше 5-го перцентиля

Постнатальный диагноз маловесного к сроку гестации устанавливался при показателях массы и длины тела новорожденного меньше 10 перцентиля согласно принятым кривым роста. Оценка массо-ростовых показателей детей проводилась с помощью кривых роста Фентона (2013 год) [---].

Нами были детально изучены семейный и собственный анамнез пациенток, в особенности наличие заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыделительной и эндокринной систем, нарушений гемостаза, вредных

привычек. Был проведен анализ акушерско-гинекологического анамнеза, в том числе на наличие задержки роста плода, преэклампсии и преждевременных родов в анамнезе у повторнородящих, социально-экономического статуса, исходной клинической характеристики, течения беременности, особенностей и исхода родов, а также состояния плода и новорожденного.

Для сбора необходимой информации согласно задачам настоящего исследования была разработана карта обследования беременных, которая состояла из двух разделов: первый включал подробное изложение анамнестических данных; второй раздел содержал информацию о течение данной беременности и ее исходах.

Критериями включения в исследование для основной группы являлись:

- Одноплодная беременность при сроке от 22 до 40 недель;
- Возраст беременных от 18 до 45 лет;
- Беременность, осложнившаяся ЗРП.

Критериями включения в исследование для группы сравнения являлись:

- Одноплодная беременность при сроке от 22 до 40 недель;
- Возраст беременных от 18 до 45 лет;
- Отсутствие ЗРП.

Критерии исключения беременных во всех группах исследования:

- Тяжелая экстрагенитальная патология;
- Многоплодная беременность;
- Беременность, наступившая после донации ооцита;
- Внутриутробные пороки развития плода;
- Генетические заболевания матери и плода;
- Острая фаза или обострение хронических инфекционных заболеваний;
- Миома матки больших размеров

Для выполнения поставленных задач всем пациенткам, включенным в исследование, был выполнен стандартный набор обследования согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 ноября 2012 года № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» (таблица 2).

Таблица 2. Лабораторные исследования и сроки забора материала для их проведения у обследованных пациенток

Показатели	До родов	После родов
	22-40 недель	1 ^{ые} сутки после родов
Определение основных групп крови (А, В, 0) и резус-принадлежности	+	–
Определение антител к бледной трепонеме (<i>Treponema pallidum</i>), ВИЧ, HBsAg, HCV	+	–
Общий (клинический) анализ крови развернутый	+	+
Коагулограмма (ориентировочное исследование системы гемостаза)	+	–
Биохимический анализ крови	+	–
Общий анализ мочи	+	+
УЗИ плода	+	–
Доплерометрия	+	–
КТГ	+	–
Определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК	+	–
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в плазме	+	–
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в плаценте	–	+
Флуоресцентная иммуногистохимия плаценты	–	+
Определение уровня метилирования генов TLR2 и ICR H19/IGF2 в пуповинной крови	–	+

Медиана сроков в исследуемых группах была сопоставима, что позволило в дальнейшем оценить результаты специальных методов исследования и перинатальные исходы (таблица 3).

Таблица 3. Срок беременности, на котором осуществлен забор биоматериала в подгруппах

Срок беременности, на котором осуществлен забор биоматериала			
Подгруппа IA	Подгруппа IB	Группа II	p-value
Ранняя форма ЗРП	Поздняя форма ЗРП	Контрольная	
32,0 (27,2; 38,2)	33,2 (28,1; 38,5)	32,5 (26,5; 39,0)	p = 0,31

2.2 Методы исследования

При выполнении исследования были использованы современные высокоинформативные методы, с применением реактивов и оборудования ведущих производителей.

При формировании и проведении исследования применялись следующие принципы:

1. Сопоставление клинико-anamnestической характеристики пациенток, течения беременности, родов, морфологических особенностей последа, состояния плода и новорожденного у беременных исследуемых групп.

2. Сопоставимые друг к другу сроки исследования различных физиологических и биохимических параметров, а также проведение специальных методов исследования.

3. Применение современных методов статистической обработки для и анализа полученных результатов.

Общеклинические методы

При проведении подробного анализа данных анамнеза каждой пациентки особое внимание уделяли течению беременности, исходам предыдущих беременностей (выявление в анамнезе искусственных прерываний беременности, преэклампсии, преждевременных родов, неразвивающихся беременностей, самопроизвольных выкидышей, внутриутробного инфицирования плода, рождение детей, маловесных к сроку гестации, с пороками развития, генетическими заболеваниями, перинатальные потери).

Объективное исследование включало в себя оценку общего состояния, состояния систем органов дыхания, кровообращения, пищеварения, мочеполовой системы, а также неврологического статуса.

При наружном акушерском исследовании определяли положение и позицию плода, предлежащую часть и ее отношение к входу в малый таз, двигательную активность плода с аускультацией его сердечных тонов, а также оценивали состояние передней брюшной стенки. Результаты измерения окружности живота и высоты дна матки сранивали с их нормативными показателями для соответствующего гестационного срока. При доношенной беременности проводился расчет предполагаемой массы плода согласно общепринятым формулам (Жордания, Джонсона, Якубовой).

При гинекологическом исследовании проводилась оценка кожных покровов и слизистых наружных половых органов, характера выделений из половых путей, состояния шейки матки при осмотре с помощью гинекологических зеркал и при бимануальном влагалищном исследовании с определением степени «зрелости» шейки матки по шкале Бишоп (консистенция, длина, проходимость цервикального канала, отношение шейки матки к проводной оси малого таза).

Измерение АД проводилось на обеих руках механическим тонометром аускультативным методом по Н.С. Короткову через 5 минут отдыха, в положении сидя пациентки, с обеспечением поддержки спины и руки и расположением манжеты на уровне сердца. Производилось три измерения АД с интервалом 1-2 минуты, а дополнительное измерение требовалось лишь в случае разницы первых двух результатов более чем 10 мм рт.ст. Регистрировалось АД, которое являлось средним из двух последних измерений. При этом использовали фазы I (появление первых звуков) и V (внезапное уменьшение/исчезновение) тонов Короткова для определения САД и ДАД соответственно. При выявлении разницы на руках ориентировались на более высокие значения. Показатели АД фиксировались с точностью до 2 мм рт. ст.

Функциональные методы исследования

Ультразвуковое исследование

Всем пациенткам проводилось ультразвуковое скрининговое исследование на сроках от 22 до 40 недели беременности с помощью экспертных ультразвуковых систем – сканеров Toshiba Aplio SSA 790A («Toshiba», Япония), «GE Voluson E8 expert» («General Electric», Соединенные Штаты Америки), «Samsung Medison Accuvix A30» («Samsung Medison», Южная Корея). Расчет предполагаемой массы плода проводили по биометрическим показателям на основании формул, предложенных В.Н. Демидовым и соавт. (1987), F.P Hadlock и соавт. (1984). Оценка количества околоплодных вод проводилась путем измерения глубины максимального вертикального кармана жидкости и индекса амниотической жидкости. Зрелость плаценты определяли по критериям Р. А. Grannum (1983).

Допплерометрическое исследование кровотока

в системе «мать-плацента-плод»

Изучение гемодинамики маточно-плацентарно-плодового кровообращения проводилось при помощи ультразвуковых сканеров «GE Voluson E8 expert» («General Electric», Соединенные Штаты Америки), «Samsung Medison Accuvix A30» («Samsung Medison», Южная Корея), HI VISION Preirus («Hitachi», Япония) с использованием трансабдоминальных датчиков частотой 3,5 и 5,0 МГц в режиме пульсовой доплеровской волны. Для оценки кровотока в маточных артериях использовалось среднее значение пульсационного индекса (ПИ) в правой и левой маточных артериях. Оценка кровотока в артерии пуповины проводилась путем нескольких измерений в близости от пупочного кольца плода. Церебрально-плацентарное отношение рассчитывалось как отношение ПИ в средней мозговой артерии к ПИ в артериях пуповины.

Аntenатальная кардиотокография

Оценку состояния плода с 33 недель беременности проводилась на основе метода ультразвуковой локации плода путем антенатальной и интранатальной кардиотокографии при помощи автоматизированных кардиотокографов «УНИКОС-03» (Россия) и «Sonicaid Team» (Великобритания) с частотой зондирующего ультразвукового сигнала 2 МГц. Анализ осуществлялся в течение 60 минут и включал определение variability базального ритма сердечных сокращений плода, количество и амплитуду акцелераций и децелераций, а также показатель состояния плода (ПСП), который вычисляется по формуле предложенной В.Н. Демидовым (1991). Значение ПСП $\leq 1,0$ указывает на отсутствие нарушения; 1,0 - 2,0 – начальные проявления нарушения; 2,0 - 3,0 – выраженные нарушения и более 3,0 – резко выраженные нарушения состояния плода.

Специальные методы исследования

Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме крови матери

Для количественного определения внеклеточной фетальной ДНК были собраны образцы по 5 мл венозной крови беременных в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Обработка образцов производилась в течение 60 минут после забора биологического материала. Выделение плазмы происходило после двухэтапного центрифугирования при 4 °С: на первом этапе в течение 10 минут при ускорении 200 g, на втором – в течение 10 минут при ускорении 4500 g. Хранение образцов плазмы осуществлялось при температуре -80 °С. Выделение внеклеточной фетальной ДНК производилось в два этапа. Определение концентрации внеклеточной фетальной ДНК основано на данных о том, что в геноме плода промотор гена RASSF1A гиперметилирован, что означает, что концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц внеклеточной фетальной ДНК. На первом этапе с помощью количественного

ПЦР-анализа концентрации промотора гена RASSF1A был определен уровень общей внеклеточной ДНК. Для этого из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия), согласно рекомендациям изготовителя, выделяли общую внеклеточную ДНК. Полученную ДНК после предварительной очистки хлороформом переосаждали этанолом с соосаждителем нуклеиновых кислот «Satellite Red» («Евроген», Россия) разводили в 13 мкл воды. С целью выделения гиперметилированного промотора гена RASSF1A применялась реакция метилчувствительной рестрикции со 10 мкл раствора ДНК. В работе была использована эндонуклеаза рестрикции BstUI («New England Biolabs», США) 60 Е (единиц активности). Реакция рестрикции проводилась в течение 6 ч при температуре 60°C. После предварительного удаления рестриктаз с помощью хлороформа проводилось осаждение ДНК этанолом и ее дальнейшее растворение в 10 мкл воды. Для контроля рестрикции 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР с праймерами к гену АСТВ. При отсутствии ответа оставшийся раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к RASSF1A. ПЦР-анализ проводился одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, изготовленного с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия). Концентрация стандарта ДНК была определена с помощью спектрофотометра «DeNovix» (США). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 («BioRad», США). Программа ПЦР: 95 °С - 3 мин, 45 циклов: 95 °С 10 с, 60 °С, 30 с 72 °С.

Морфологические методы исследования

При морфологическом исследовании на первом этапе были изучены 232 последа (плацента, оболочки, пуповина), полученных от 232 родов.

Были использованы такие методы исследования, как:

1. Макроскопический – осмотр и описание пуповины, плодных оболочек и ворсинчатой части плаценты.

2. Морфометрический – определение общей массы плаценты с плодными оболочками и пуповиной до фиксации. Исследование пуповины включало определение длины, диаметра, места отхождения, количества сосудов, степени извитости, наличия патологических очагов. При исследовании оболочек обращали внимание на их цвет и прозрачность, место разрыва. Осмотр ворсинчатой части включал оценку размеров котиледонов, определение наличия патологических очагов, а также подсчет ворсин с различной степенью васкуляризации.

Для морфологического исследования на втором этапе были исследованы 93 последа, полученных от 93 родов с использованием следующих методов:

3. Флуоресцентная иммуногистохимия (иммуофлуоресцентный анализ).

При проведении непрямого метода флуоресцирующих антител использовались образцы плацент, полученные не позднее 10 минут после родоразрешения. Острым путем производился забор небольших фрагментов ткани плаценты размерами 2,0 x 1,0 x 0,5 см из парацентральной зоны (включающей ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки). Плацентарный материал освобождали от примесей путем отмывания в физиологическом растворе. Хранение подготовленных фрагментов производилось в стерильных маркированных криопробирках при температуре -80 С. Далее из полученного материала с помощью криостата изготавливались срезы толщиной 8 мкм. Сначала проводилось окрашивание криосрезов раствором антител против виментина (маркер клеток стромальной части плаценты) и Е-кадгерина (маркер клеток трофобласта), затем конъюгированным с флуоресцентным красителем вторых антител против первых антител и флуоресцентным интеркалирующим красителем для окрашивания нуклеиновых кислот 4',6-диамиидно-2-фенилиндолом (DAPI). Полученные срезы изучались при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на микроскопе «Leica SP5» («Leica Microsystems», Германия), что позволило изучить особенности строения ворсин при ЗРП.

4. Гистохимическое исследование.

TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidyltransferase — mediated dUTP—biotin Nick—End Labeling), или терминальное дезоксиуридиновое мечение концов — это метод, направленный на идентификацию и количественное определение подвергшихся апоптозу клеток, при котором происходит распад ДНК под действием эндонуклеаз с образованием кратных размеру одной нуклеосомы фрагментов. При использовании TUNEL-метода происходит специфическое связывание с 3'- концом разорванной нити ДНК дУТФ, меченого биотином в присутствии фермента дезоксирибонуклеотидтрансферазы. Для проведения исследования ткань плаценты фиксировали в течение 24 ч в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере (PBS) при температуре 4 °С. С последующим переносом без отмывания в 30% сахарозу еще на 24 ч при температуре 4 °С. После этого ткань подвергалась заморозке в специальной среде «Tissue-Tek O.C.T. Compound» («Sakura Finetek», США). Срезы толщиной 8 мкм изготавливали на криостате «Microm HM 525» («Thermo Scientific», США). Реакцию TUNEL проводили с использованием набора «In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein» («Roche», Германия) согласно рекомендациям производителя, с последующим окрашиванием пропидий йодидом в концентрации 2 мкм на PBS всей ДНК. Срезы исследовали на конфокальном микроскопе «Leica SP5» («Leica Microsystems», Германия).

Исследование уровня метилирования генов с помощью анализа кривых плавления с высоким разрешением.

С целью исследования уровня метилирования генов в плаценте были применены образцы плацент, полученные в течение 10 минут после родоразрешения. Забор фрагментов плацентарной ткани размерами 2,0 x 1,0 x 0,5 см производился из парацентральной зоны и обязательно включал ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки. Обработанные фрагменты хранились в криопробирках при температуре -80 С.

Для исследования уровня метилирования генов в плазме материнской крови были собраны образцы периферической крови объемом по 5 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). В течение 60 минут после забора производилась обработка полученных образцов. После проведения двухэтапного центрифугирования при 4 °С (1 этап – продолжительность 10 минут, ускорение 200g; 2 этап – продолжительность 10 минут, ускорение 4500g) выделяли образцы плазмы, которые хранили при температуре - 80 °С. Из полученных образцов плацент и плазмы материнской крови проводилось выделение ДНК с применением наборов «QIAamp DNA Mini Kit» («Quiagen», США) согласно протоколу изготовителя. На следующем этапе производилась бисульфитная конверсия ДНК при помощи набора «EpiJET Bisulfite Conversion Kit» («Thermo Scientific», США), которая приводила к конвертированию всех неметилированных цитозинов в урацилы. При этом метилированные цитозины не подвергались изменению.

Перед проведением ПЦР был проведен отбор праймеров по факту отсутствия динуклеотидов CpG. Далее проводилась ПЦР с праймерами к фрагменту CpG-островков исследуемых генов с использованием следующей программы амплификации: 1-й этап - 95° - 5 мин; 2-й этап - 95° - 15 с., 60° - 30 с., 72° - 45 с (30 циклов); 3-й этап - 95° - 15 с., 50° - 30 с., 72° - 45 с (25 циклов), в результате чего происходила замена урацилов на тимины. Для детектирования полученных продуктов ПЦР добавлялся специфичный к двухцепочечной ДНК интеркалирующий флуоресцентный краситель «EvaGreen» («Синтол», Россия). Для построения кривой плавления была использована следующая программа: 1-й этап – 95° - 30 с; 2-й этап – 60° - 10 мин., 3-й этап – 60°- 90° с шагом 0,2°.

Определение уровня метилирования проводилось с помощью методы анализа кривых плавления с высоким разрешением (methylation-specific high resolution melts, MS-HRM) с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis Software, версия 3 («BioRad», США) [290]. В

результате анализа кривые плавления распределились следующим образом: от кривой с наименьшим метилированием – нижняя, до кривой с максимальным метилированием – верхняя (рисунок 3). Количественная оценка метилирования проводилась с использованием относительных единиц интенсивности флуоресценции (RFU) при температуре максимального расхождения кривых (на рисунке 6 - 76,5 °C). Для проведения ПЦР и MS-HRM использовали амплификатор CFX-96 («BioRad», США).

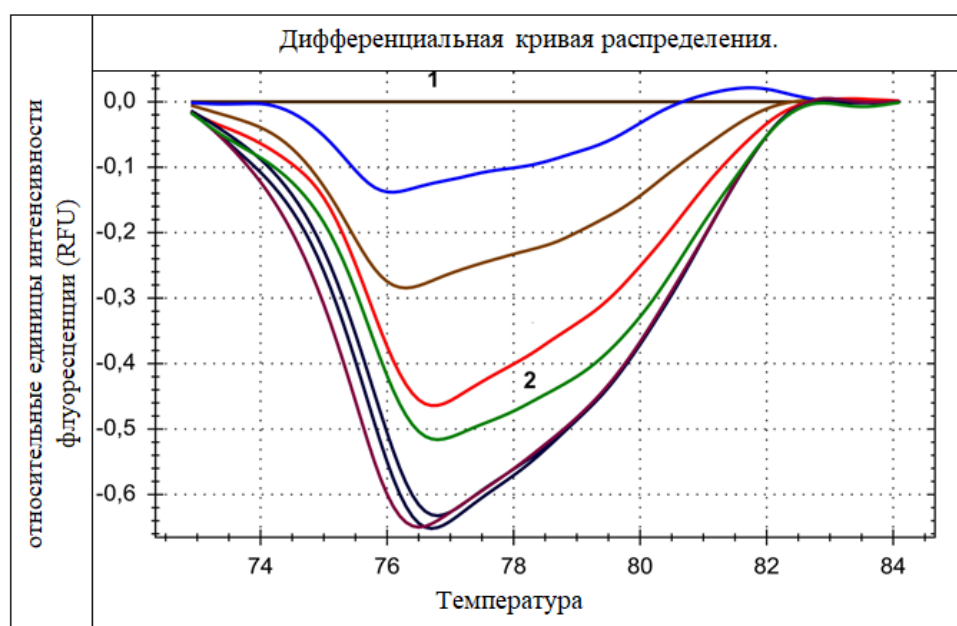


Рисунок 3. Расчет относительного уровня метилирования по относительным флуоресцентным единицам (RFU) при температуре максимальных пиков кривых HRM ($T_{\max \text{ peak}} 76,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

1 – кривая образца со стопроцентным метилированием, по которой нормированы результаты.

2 – оптимальная пороговая кривая, разделяющая образцы ткани основной и контрольной групп.

Исследование уровня метилирования генов методом пиросеквенирования

Для определения уровня метилирования генов в пуповинной крови образцы собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, затем центрифугировали при температуре 4°C в течение 20 минут при ускорении 300g, затем в течение 10 минут при ускорении 14000g. Пиросеквенирование проводилось с использованием пиросеквенатора «PyroMark Q48» («Qiagen», Германия). Пиросеквенирование представляет собой метод, включающий определенную последовательность реакций (рисунок 4). На первом этапе проводится амплификация фрагмента ДНК и биотинилирование цепи - матрицы для пиросеквенирования с последующей денатурацией, изоляцией и гибридизацией биотинилированного одноцепочечного ампликона. Далее в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ-сульфуриказы, люциферазы, апиразы, и субстратов: аденозин - 5'-фосфосульфата (APS) и люциферина осуществляется инкубация праймера и одноцепочечной матрицы. На следующем этапе производится добавление первого дезоксирибонуклеотид трифосфата (dNTP), которое сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквимолярном количеству встроившихся нуклеотидов. Под воздействием АТФ-сульфуриказы в присутствии аденозин-5'-фосфосульфата происходит превращение пирофосфата в АТФ, которая запускает реакцию окисления люциферина в оксилуциферин и образование видимого света. После выявления видимого света CCD-камерой на пирограмме регистрируются изображения в виде пиков. При этом высота пиков пропорциональна количеству встроившихся в матрицу нуклеотидов. В результате построения комплементарной цепи ДНК формируется пирограмма, позволяющая определить уровень метилирования каждого CpG-сайта исследуемого образца

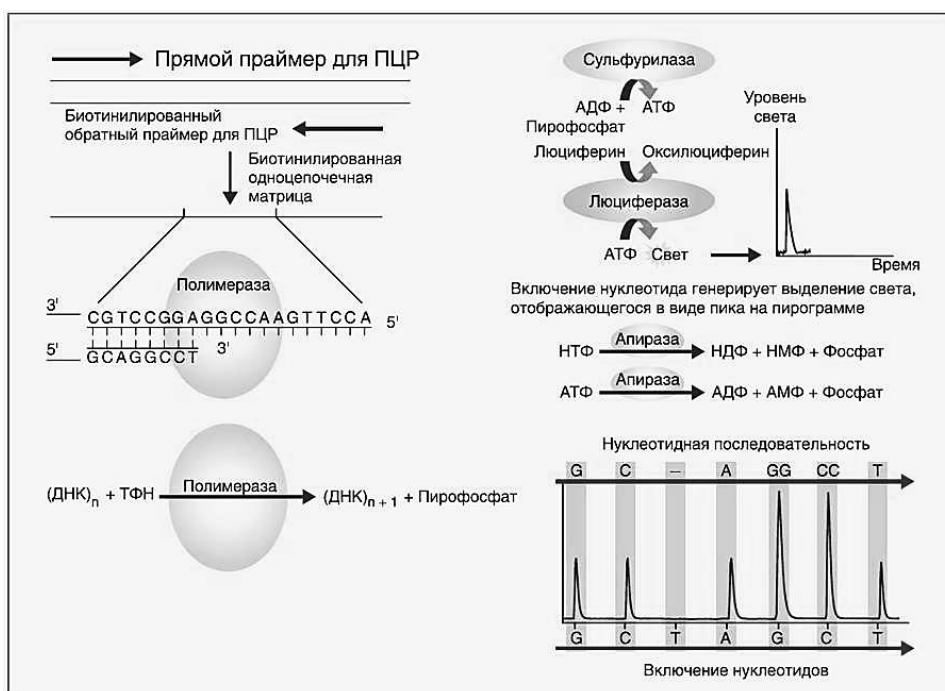


Рисунок 4. Схема процесса пиросеквенирования «PyroMark Q48» («Qiagen», Германия).

Изучение перинатальных исходов

Изучение здоровья детей в раннем и позднем неонатальном периоде является одним из главных показателей эффективности применения различных методов профилактики и лечения на антенатальном этапе. Оценка раннего и позднего неонатального периода была проведена у 232 новорожденных. После рождения все дети были осмотрены врачом-неонатологом. Младенцам проводились оценка состояния по шкале Апгар, измерение антропометрических показателей – массы, роста, окружности головки, плеч и грудной клетки. Постнатальная оценка массо-ростовых показателей проводилась с помощью кривых роста Т. Fenton (2013 год) для мальчиков и девочек [---]. Антропометрические показатели считаются соответствующими гестационному возрасту при их нахождении между 10-ым и 90-ым перцентилями. Диагноз маловесного к сроку гестации устанавливался при показателях массы и длины новорожденного меньше 10-ого перцентиля. В дальнейшем изучались динамика антропометрических показателей, течение раннего адаптационного периода, нутритивный статус,

динамика состояния новорожденных при возникновении осложнений в раннем неонатальном периоде.

Статистические методы

Все полученные результаты в ходе исследования вносились в специально разработанную для данного исследования тематическую карту и в электронные таблицы MS Excel for windows.

Статистический анализ проводился с помощью программных обеспечений «Attestat» (Россия), «OriginPro 8.5» (США), «SPSS Statistics 23.0» и Statistica for Windows v.11 (США).

Для оценки нормальности распределения изучаемой выборки проводился тест Шапиро-Уилка. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе P в формате $N (P\%)$. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате $M (SD)$. Для определения различий в группах по средним значениям использовался T -критерий Стьюдента и дисперсионный анализ. При распределении признаков, отличающихся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей $Q1$ и $Q3$ в формате $Me (Q1; Q3)$. Качественные показатели были представлены как в абсолютных, так и в относительных величинах (%). Данные считались статистически значимыми при доверительном интервале $p < 0,05$.

Статистический анализ проводили с помощью χ^2 -теста для сравнения категориальных данных, методом теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения.

Также для каждого количественного параметра были определены ошибка среднего (t), и 95% доверительный интервал, для бинарных данных определяли отношение шансов (OR) и его доверительный интервал (CI). Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического

корреляционного критерия Спирмена. 95% доверительный интервал для коэффициента корреляции определяли с помощью преобразования Фишера. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

Для оценки потенциальной прогностической значимости исследуемых параметров разработали модель логистической регрессии. При построении бинарной логистической регрессионной модели применялся прямой метод Вальда. Качество приближения регрессионных моделей при каждом последующем шаге оценивалось с применением функции подобия – отрицательного удвоенного значения логарифма этой функции ($-2LL$). Объяснимая с помощью логистической регрессии часть дисперсии вычислялась по методу Наделькеркеса. Для оценки удельного веса предикторов, включенных в модель, проводился дискриминантный анализ с принудительным включением полученных предикторов. Удельный вес предиктора вычисляли как частное от деления абсолютной величины соответствующего нормированного коэффициента дискриминантной функции на сумму абсолютных величин всех нормированных коэффициентов.

Оценка качества полученных моделей определяли путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой (AUC), а также расчета чувствительности и специфичности разработанной модели в точке порогового значения. Пороговое значение выбиралось по критерию максимальной суммарной чувствительности и специфичности.

Результаты собственных исследований

ГЛАВА 3. ИСХОДНАЯ КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ С ЗАДЕРЖКОЙ РОСТА ПЛОДА

На первом этапе в данную работу согласно критериям включения и исключения были включены 219 пациенток, родоразрешенных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 2017 по 2019 год.

Согласно наличию осложнения беременности в виде ЗРП, были сформированы две группы: группа I – основная, состоящая из 105 женщин, беременность которых осложнилась ЗРП, и группа II – контрольная, состоящая из 114 условно здоровых беременных.

У включенных в исследование пациенток были изучены данные анамнеза с особым акцентом на наличие заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыделительной и эндокринной систем, нарушений гемостаза, вредных привычек. При анализе акушерско-гинекологического анамнеза особый анализ проводился по наличию задержки роста плода, преэклампсии и преждевременных родов в анамнезе у повторнородящих. Были изучены социально-экономический статус, исходная клиническая характеристика, течение беременности, особенности и исходы родов, а также состояние плода и новорожденного. Был проведен тщательный анализ семейного анамнеза, в том числе на наличие тромботических и метаболических нарушений.

До начала участия в исследовании пациентками было подписано добровольное информированное согласие на участие. Включение в исследование проводилось по обращаемости.

Критериями включения в исследование для основной группы являлись срок беременности 22-40 недель, возраст беременных от 18 до 45 лет, одноплодная беременность, осложнившаяся ЗРП. Критериями включения в исследование для группы сравнения являлись отсутствие ЗРП, одноплодная

беременность при сроке от 22 до 40 недель, возраст беременных от 18 до 45 лет.

Критерии исключения беременных во всех группах исследования послужили 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.

Анализ соматического и акушерско-гинекологического анамнеза

Возраст, включенных в исследование беременных варьировал в пределах от 18 до 44 лет и составил 33 (28; 39) года в основной группе и 30 (26; 31) лет в группе сравнения. Для точной оценки возраста как фактора риска ЗРП, было проведено распределение женщин по возрасту (таблица 4).

Таблица 4. Распределение пациенток исследуемых групп по возрасту (n, %).

Группы/Возраст	18-23 лет		24-29 лет		30-35 лет		36 и более лет	
Группа 1 (n=105)	18	17,1 %	27	25,7 %	37	35,2 %	23	21,9 %
Группа 2 (n=114)	29	25,4 %	41	36 %	30	26,3 %	14	12,3 %

*статистически значимые различия между группами $p < 0,05$

Анализ возраста и антропометрических показателей пациенток не выявил статистически значимых различий между группами. Масса тела в основной группе составила 68 (60;78) кг, а в группе сравнения 69 (66;80) кг. Показатели ИМТ также не были статистически значимо различны в исследуемых группах, составив 25,5 (23,0;27,0) в основной группе и 24,5 (22,8;26,0), ($p > 0.05$) в группе сравнения.

Анализ социально-экономической характеристики и не показал различий в исследуемых группах. Оценка и анализ вредных привычек также не показал различий в исследуемых группах.

Анализ генетических факторов риска включал в себя учет наследственных факторов риска – наличие заболеваний сердечно-сосудистой системы, тромбозов и тромбоэмболических осложнений в возрасте до 50 лет

у родственников первой и второй линии. Согласно полученным данным у пациенток основной группы наследственность была чаще отягощена сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с группой контроля ($n=35, 33,3\%$) ($OR=0,8 (0,4-1,6)$), $p>0,05$).

На втором этапе с целью оценки генетических факторов риска был проведен анализ носительства полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска, который включал в себя либо носительство гомозиготного варианта полиморфизма 1691 G->A (R506Q) гена F5 либо носительство гомозиготного варианта полиморфизма коагуляционного фактора II (F2: 20210 G>A), сочетание носительства гетерозиготной формы полиморфизма данных генов, дефицит антитромбина III, дефицит протеина C, дефицит протеина S согласно клиническим рекомендациям "Профилактика венозных тромбоэмболических осложнений акушерстве и гинекологии". Согласно полученным данным у пациенток основной группы риск тромбофилических состояний был выше по сравнению с пациентками контрольной группы, что было обусловлено дефектами в генах II и V факторов свертывания крови ($n=6, 5,7\%$) ($OR= 2,5 (1,4-9,2)$), $p<0,01$). Анализ дефицита антитромбина III, дефицита протеина C, и дефицита протеина S не показал статистически значимых различий в исследуемых группах.

На третьем этапе был проведен анализ на наличие антифосфолипидного синдрома у пациенток в исследуемых группах. Диагноз был подтвержден врачом-гематологом с учетом диагностических критериев антифосфолипидного синдрома:

- клинические критерии: один или более эпизод тромбоза венозных, артериальных или мелких внутриорганных сосудов любой локализации, подтверждённый морфологическими или инструментальными методами исследования;

- лабораторные критерии: наличие антител IgG и/или IgM к кардиолипину в средних или высоких титрах, выявленных путем стандартизованного иммуноферментного метода дважды с интервалом не

менее 12 недель; наличие антител IgG и/или IgM к $\beta 2$ гликопротеину-1, выявленных с помощью стандартизованного иммуноферментного метода дважды с интервалом не менее 12 недель; волчаночный антикоагулянт, выявленный дважды с интервалом не менее 12 недель стандартизованным коагулологическим методом.

- акушерские критерии: один или более эпизод гибели нормального плода после 10 недель беременности при отсутствии причин; одни или более преждевременные роды (нормальным новорождённым) до 34 недель беременности осложненной преэклампсией или тяжёлой плацентарной недостаточностью; наличие трех и более спонтанных аборт до 10 недель беременности. Анализ данных показал, что у пациенток основной группы частота антифосфолипидного синдрома была выше по сравнению с пациентками контрольной группы, в которой данная патология не встречалась (n=5, 4,8 %) (OR= 2,1 (1,2 – 18,4)), p<0,01).

На следующем этапе исследования был проведен анализ структуры соматической патологии в группах исследования. Частота и структура соматических заболеваний представлена в таблице 5 и на рисунке 5.

Таблица 5. Структура соматической заболеваемости в группах (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Мигрень	12 (11,4%)	10 (8,7%)
Хроническая артериальная гипертензия	12 (11,4%) *	5 (4,4%)
Варикозное расширение вен нижних конечностей	29 (27,6 %)	27 (23,7%)
Пролапс митрального клапана	12 (11,4%)	10 (8,8%)
Антифосфолипидный синдром	5 (4,8 %)*	0 (0%)
Носительство полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска	10 (9,5%)*	2 (1,75%)
Бронхиальная астма	7 (6,6%)	5 (4,4%)
Хронический цистит	24 (22,9%)	18 (15,8 %)
Хронический пиелонефрит	26 (24,7%)*	8 (7,0%)
Аутоиммунный тиреоидит	6 (5,7%)	4 (3,5%)
Узловой и диффузный зоб	11 (10,5%)	9 (7,9%)
Нарушение жирового обмена	5 (4,8 %)	4 (3,5%)
Хронический тонзиллит	16 (15,2%)	14 (12,3%)

*статистически значимые различия между группами p <0,05

Сравнительный анализ исходной анамнестической характеристики женщин исследуемых групп позволил установить следующие закономерности: у беременных с задержкой роста плода была отмечена статистически значимая более высокая частота заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно хронической артериальной гипертензии по сравнению с группой контроля (n=12, 11,4%) (OR= 2,3 (1,6-8,5)), $p<0,01$). Статистически значимых различий в частоте пролапса митрального клапана, варикозного расширения вен нижних конечностей и других заболеваний сердечно-сосудистой системы установлено не было.

Анализ заболеваний носо- и ротоглотки показал, что в основной группе частота хронического тонзиллита (n=16, 15,2 %) (OR= 2,3 (1,9-18,6), $p>0,05$) не различалась с группой сравнения.

Анализ заболеваний желудочно-кишечного тракта установил, что в основной группе частота хронического поверхностного гастрита (n=22, 20,9 %) (OR=4,0 (1,8-19,4), $p>0,05$), хронического атрофического гастрита (n=1, 0,95%) (OR=0,8 (0,05-13,8) $p>0,05$), хронического холецистита (n=4, 3,8%) (OR=1,7 (0,1-19,4), $p>0,05$) статистически значимо не различалась с группой сравнения.

Среди заболеваний мочевыводящей системы статистически значимым были различия в частоте хронического пиелонефрита (n=26 (24,7%) (OR=4,6 (1,8-18,3), $p<0,01$). В основной группе частота цистита (n=24 (22,9%) (OR=5,4 (1,6-46,3) $p>0,05$) и мочекаменной болезни (n=1, 1,2%) (OR=0,8 (0,05-13,8) $p>0,05$) была выше, чем в группе сравнения.

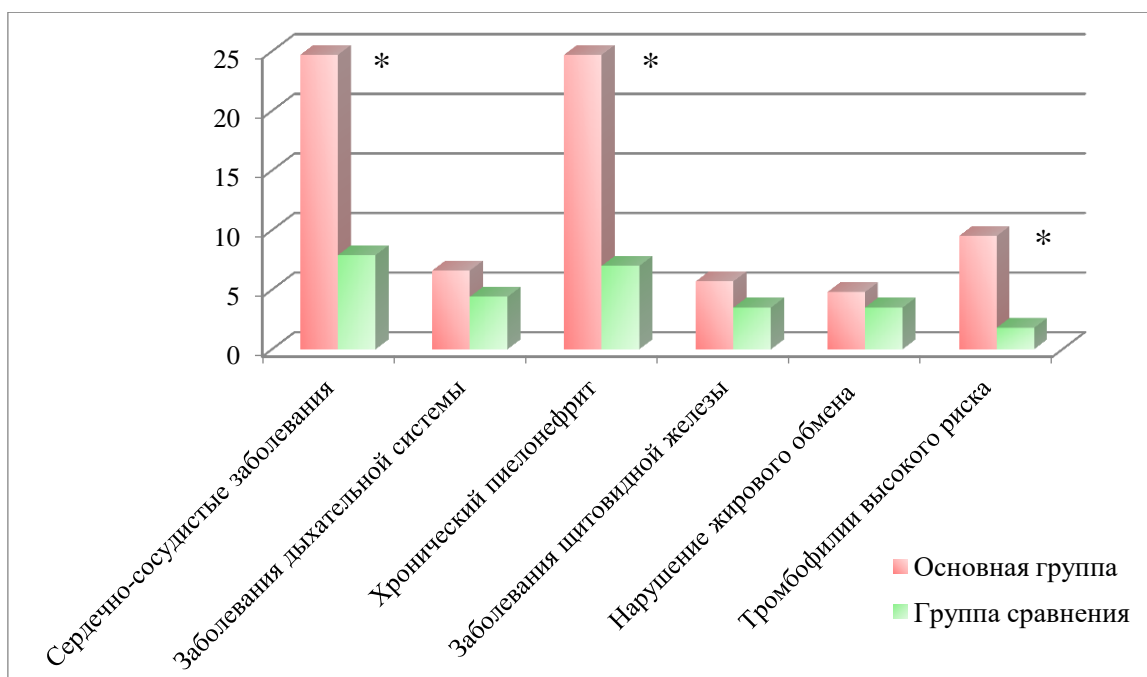


Рисунок 5. Частота встречаемости экстрагенитальной патологии в исследуемых группах.

Анализ заболеваний эндокринной системы не показал статистически значимых различий в частоте аутоиммунного тиреоидита ($n=6$, 5,7%) ($OR=3,4$ (1,6-21,4), $p>0,05$), узлового и диффузного зоба ($n=11$, 10,5%) ($OR=5,3$ (2,1-16,4), $p>0,05$), нарушений жирового обмена ($n=5$, 4,8%) ($OR=2,3$ (1,1-17,2), $p>0,05$) и других эндокринных патологий в исследуемых группах.

Анализ соматического анамнеза показал статистически значимые различия в частоте хронической артериальной гипертензии, хронического пиелонефрита, носительстве полиморфизма генов тромбофилии высокого тромбогенного риска и антифосфолипидного синдрома у беременных с задержкой роста плода.

С целью изучения состояния репродуктивного здоровья женщин, был проведен анализ акушерско-гинекологического анамнеза. Частота гинекологической заболеваемости представлена в таблице 6 и на рисунке 6.

Таблица 6. Структура гинекологической заболеваемости у пациенток в группах исследования (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Миома матки малых размеров	12 (11,4%)	10 (8,8%)
Аденомиоз	9 (8,6%)	7 (6,1%)
Наружный генитальный эндометриоз	7 (6,6%)	5 (4,4%)
Гиперплазия эндометрия	2 (1,9%)	2 (1,8%)
Полип эндометрия	6 (5,7%)	3 (2,6%)
Хронический цервицит	14 (13,3%)*	5 (4,4%)
Хронический эндометрит	6 (5,7%)	4 (3,5%)
Хронический сальпингит и оофорит	4 (3,8%)	3 (2,6%)
Бесплодие I и II	8 (7,6%)	3 (2,6%)

*Статистически значимые различия между группами $p < 0,05$

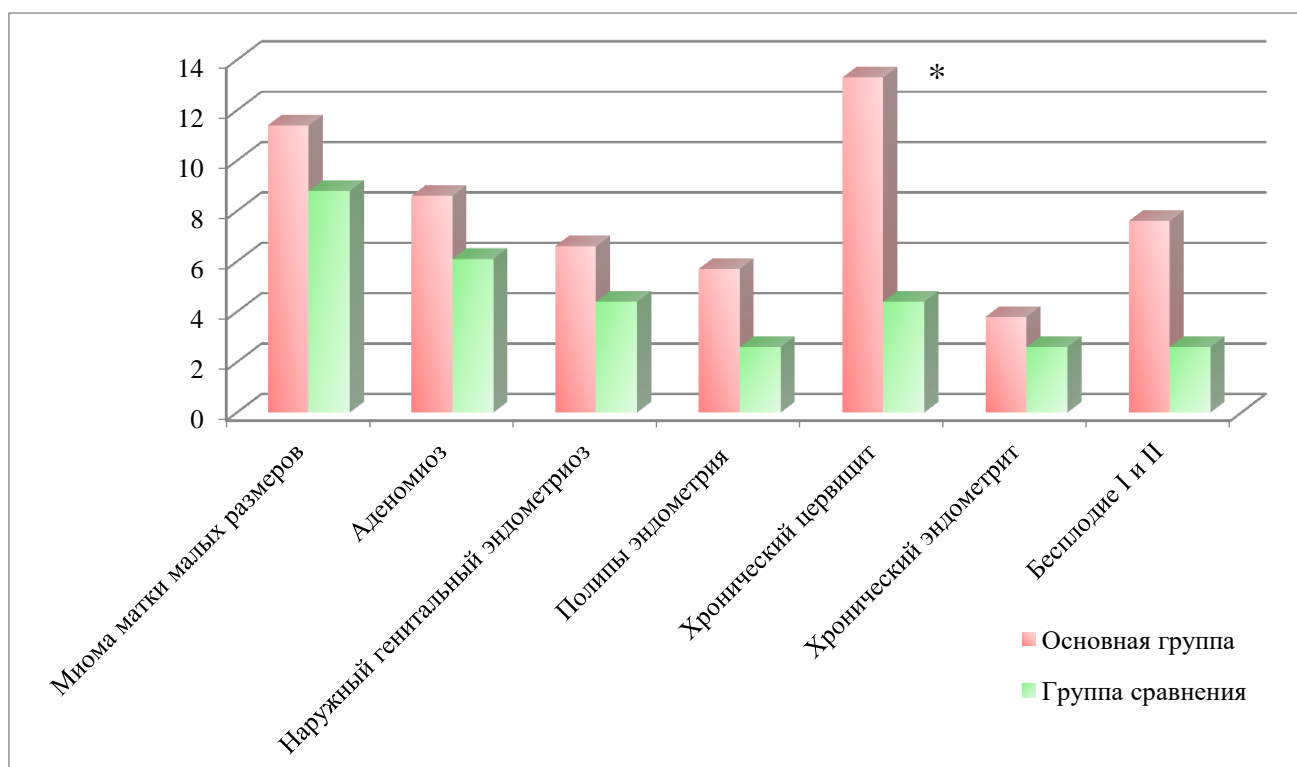


Рисунок 6. Частота встречаемости гинекологических заболеваний в исследуемых группах.

Анализ менструальной функции не выявил различий по группам и соответствовал популяционным нормам.

Среди гинекологических заболеваний в группе 1 было отмечено увеличение частоты миомы матки малых размеров (n=12, 11,4%) (OR=0,6 (2,0-18,3), $p > 0,05$), полипов эндометрия (n=6, 5,7%) (OR=1,5 (1,4-12,2), $p > 0,05$) и бесплодия (n=7, 7,6%) (OR= 0,5 (0,5-18,0), $p > 0,05$). В основной

группе было отмечено статически значимое увеличение хронического цервицита (n=14, 13,3%) (OR=1,6 (0,8-16,3), p<0,05).

Анализ воспалительных заболеваний генитального тракта не выявил различий по заболеваемости в исследуемых группах.

В основной группе число первобеременных составило 41 (39%), повторобеременных 64 (61%), первородящих 62 (59,0%), а повторнородящих 38 (41%); в группе сравнения первобеременные составили 51 (44,7%), повторобеременные первородящие составили 62 (54,4%), повторнородящие 52 (45,6%).

Анализ исходов предыдущих беременностей показал, что в основной группе было отмечено статистически значимое увеличение частоты неразвивающейся беременности (n=9, 14,0%) (OR=2,6 (0,8-12,3), p<0,05) и задержки роста плода (n= 12, 18,8 %) (OR=2,5 (1,2-13,4), p<0,01), (таблица 7, рисунок 7). Статистически значимых различий по частоте преэклампсии (n= 2, 3,1 %) (OR= 1,3 (0,7-11,4), p>0,05) и преждевременных родов (n=6, 9,4%) (OR=1,2 (0,6-15,1), p>0,05) получено не было.

Таблица 7. Исходы предыдущих беременностей у пациенток в группах исследования (n, %).

Нозологические формы	Группа 1 n=64 (%)	Группа 2 n=62 (%)
Искусственный аборт медикаментозный	5 (7,8%)	6 (9,7%)
Искусственный аборт хирургический	4 (6,25%)	3 (4,8%)
Неразвивающаяся беременность	9 (14,0%)*	2 (3,2%)
Самопроизвольный выкидыш	6 (9,4%)	4 (6,5%)
Преждевременные роды	6 (9,4%)	3 (4,8%)
Задержка роста плода	12 (18,8%)*	1 (1,6%)
Преэклампсия	2 (3,1 %)	0 (0%)
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	1 (1,6%)	1 (1,6%)

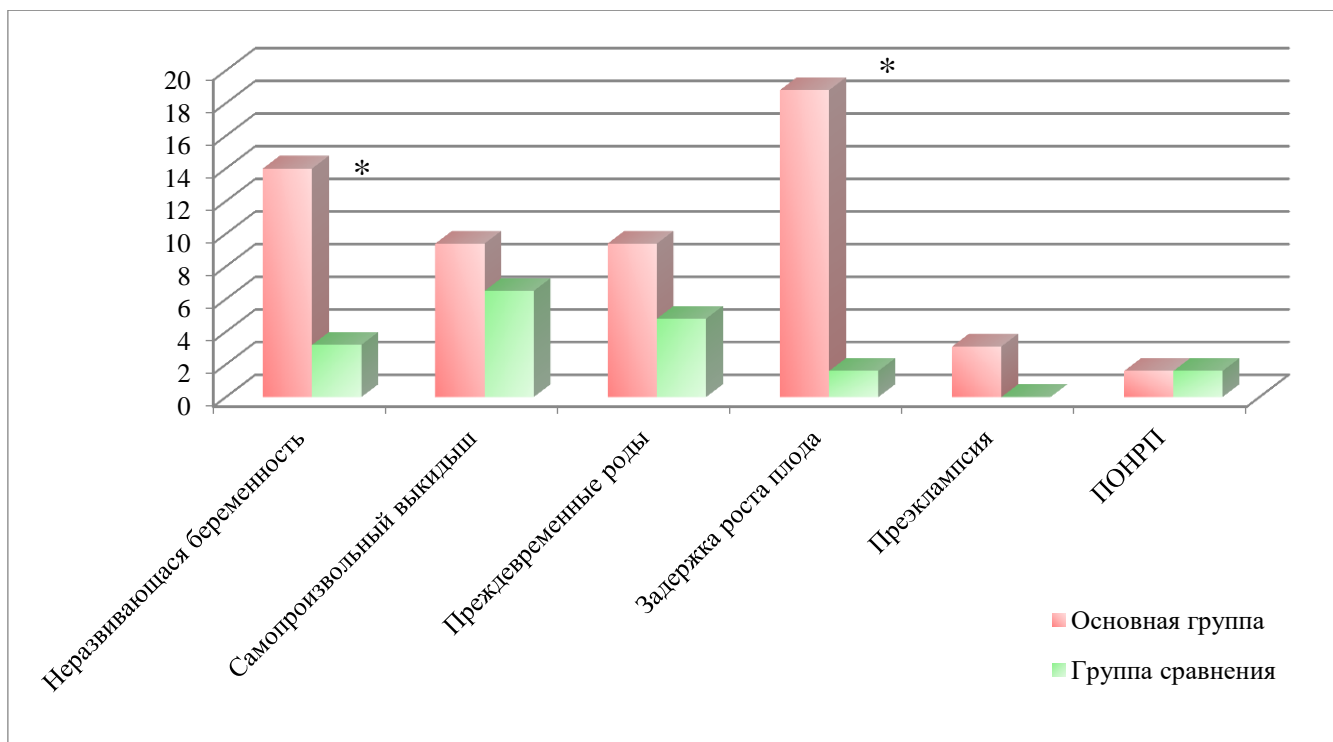


Рисунок 7. Исходы предыдущих беременностей у пациенток в группах исследования.

Таким образом, комплексный анализ клинико-анамнестических данных, течения гестационного периода и перинатальных исходов при задержке роста плода выявил следующие закономерности:

1. У пациенток с задержкой роста плода был отмечен высокий тромбогенный риск, обусловленный носительством полиморфизма генов высокого тромбогенного риска и антифосфолипидному синдрому.
2. При задержке роста плода среди соматических заболеваний статистически значимые различия отмечены только в отношении хронической артериальной гипертензии и хронического пиелонефрита.
3. Высокая частота гинекологических заболеваний в виде хронического цервицита у беременных с задержкой роста плода указывает на ее значимость в качестве факторов риска развития данного осложнения.
4. Анализ акушерского анамнеза позволил выделить задержку роста плода и нерезвивающуюся беременность в исходе предыдущих беременностей в качестве факторов риска задержки роста плода.

ГЛАВА 4. ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ЕЕ ИСХОДЫ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФЕТАЛЬНОЙ ДНК И МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Анализ течения беременности, родов и послеродового периода

Принимая во внимание высокую частоту осложнений при беременностях с задержкой роста плода, был проведен анализ течения беременности в исследуемых группах.

Анализ наступления беременности показал, что в основной группе беременность наступила в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий в 11,4% (n=12), (OR=2,6 (0,9-2,8), а группе сравнения в 5,3 % случаев (n=6), (p>0,05), что связано с более отягощенным гинекологическим анамнезом пациенток основной группы.

Анализ течения I триместра беременности показал, что беременность, осложнившаяся задержкой роста плода чаще, сопровождалась рвотой беременных легкой или умеренной степени (n=26, 24,7%), (OR=1,3 (1,6-1,9), p>0,05). У пациенток с задержкой роста плода частота угрозы прерывания беременности (n=28, 26,7%), (OR=1,6 (0,9-2,3), p>0,05) была выше, чем у группы сравнения. При этом частота кровотечения, осложнившего угрозу прерывания беременности, была статистически значимо выше (n=18, 17,1%), (OR=2,1 (0,6-4,2), p<0,01) у основной группы.

Во II триместре в основной группе чаще течение беременности осложнялось угрозой прерывания (n=16, 15,2%), (OR=1,6 (0,6-7,1), p>0,05), с формированием истмико-цервикальной недостаточности, потребовавшей хирургической коррекции (n=3, 2,9%) OR=2,3 (0,6-21,1), p>0,05) и установки акушерского пессария (n=4, 2,8%) OR=1,8 (0,4-18,4), p>0,05). У пациенток с ЗРП II триместр беременности чаще осложнялся анемией легкой или средней степени (n=22, 20,9%) (OR= 1,6 (0,4-8,5), p>0,05), острым кольпитом (n=11, 10,4 %) (OR= 1,2 (0,2-4,5, p>0,05) и обострением хронического цистита (n=8, 7,6%) (OR= 0,9 (0,1-5,2, p>0,05).

В III триместре беременности выявлялась более высокая частота гестационной артериальной гипертензии (n=5, 4,8%) (OR=1,2 (1,2-10,1), p>0,05) и маловодия по данным УЗИ (n=51, 48,6%) (OR=4,6 (0,6-15,2), p<0,01). У пациенток с ЗРП III триместр беременности также как и II чаще осложнялся анемией легкой или средней степени (n=32, 30,5%) (OR= 3,6 (0,9-9,6), p>0,05) и острым кольпитом (n=13, 12,4 %) (OR=1,3 (1,1-5,5), p>0,05). Статистически значимых различий в частоте угрозы преждевременных родов не выявлено.

Не были получены статистически значимые различия по частоте острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей и обострений вирусных инфекций во всех триместрах беременности, однако анализ данных показал, что у беременных основной группы частота острых респираторных инфекций был выше, чем у беременных из группы сравнения (n=38, 36,1 %) (OR=2,4 (0,9-6,3), p>0,05).

Структура осложнений настоящей беременности представлена в таблице 8 и на рисунке 8.

Таблица 8. Осложнения гестационного периода у пациенток в группах исследования (n, %).

Осложнение беременности	Группа 1 n=105 (%)	Группа 2 n=114 (%)
Рвота беременных легкой или умеренной степени	26 (24,7%)	20 (17,5%)
Угрожающий аборт в I триместре в II триместре	28 (26,7%) 16 (15,2%)	22 (19,3%) 11 (9,6%)
Угрожающий аборт с ретрохориальной гематомой	18 (17,1%)*	2 (1,75%)
Острый кольпит в II триместре в III триместре	11 (10,4 %) 13 (12,4 %)	7 (6,1%) 8 (7,0%)
Анемия легкой или средней степени в II триместре в III триместре	22 (20,9%) 32 (30,5%)	16 (14,0%) 25 (21,9 %)
Острые респираторные инфекции верхних дыхательных путей	38 (36,1 %)	26 (22,8%)
Гестационная артериальная гипертензия	5 (4,8%)	2 (1,8%)
Маловодие по данным УЗИ	51 (48,6%)*	11 (9,6%)

*Статистически значимые различия между группами p <0,05

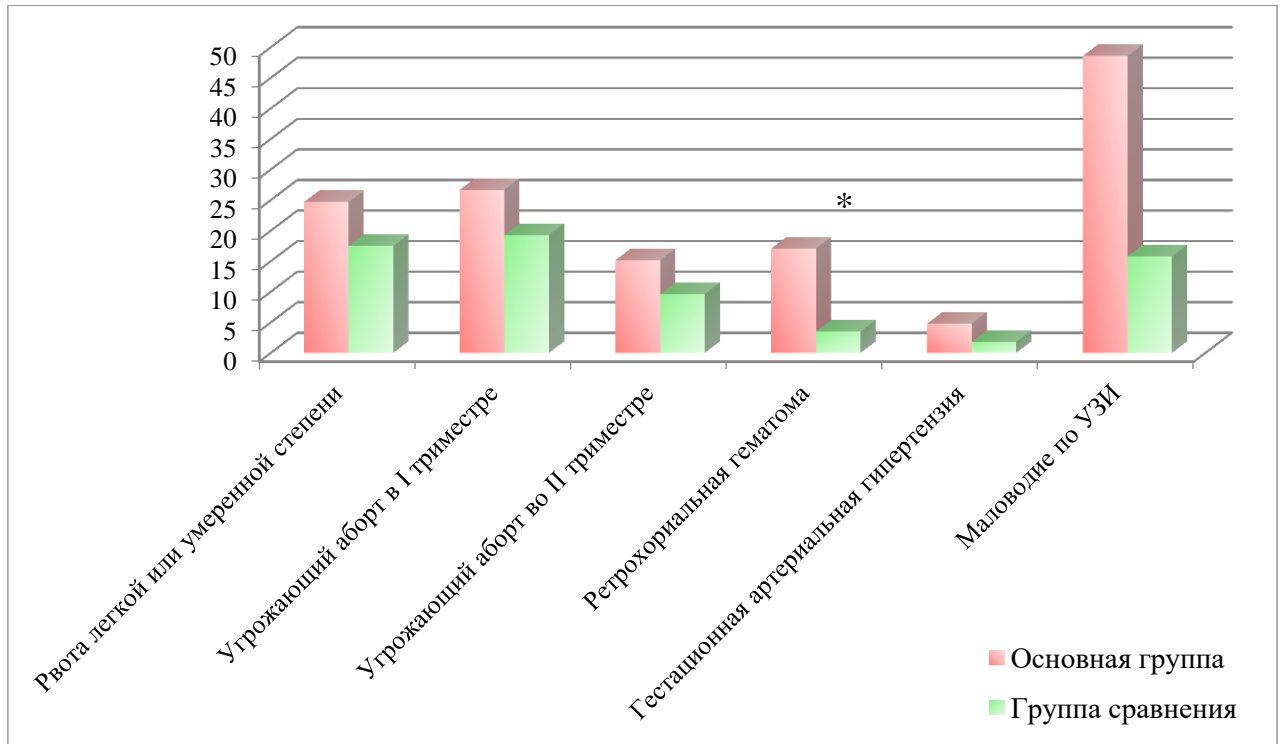


Рисунок 8. Осложнения гестационного периода у пациенток в группах исследования

Принимая во внимание патогенетические и клинические особенности ЗРП, большой интерес представляло изучение показателей доплерометрии в основной группе. Нарушение маточно-плацентарного кровотока было зафиксировано у 21,9% беременных ($n=23$, 21,9 % $p<0,05$), нарушение фето-плацентарного кровотока 18,1% ($n=19$, 18,1% $p<0,01$), сочетанное нарушение маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока было отмечено у 41,9 % беременных ($n=44$, 41,9% $p<0,01$). При этом нарушение фето-плацентарного кровотока с наличием нулевого и обратного диастолического кровотока в артериях пуповины было зафиксировано у 15,2 % беременных ($n=16$, 15,2% $p<0,01$), а нарушение церебро-плацентарного отношения в 7,6 % ($n=8$, 7,6% $p<0,01$). Нормальные показатели кровотока были отмечены у 18,1% ($n=19$, 18,1% $p<0,01$) беременных. Структура показателей доплерометрии в основной группе представлена на рисунке 9.



Рисунок 9. Структура нарушений кровотока в основной группе.

В связи с различными клинико-патогенетическими аспектами ранней и поздней формы задержки роста плода закономерные различия были получены и в показателях доплерометрии маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока. Так в группе ранней формы ЗРП не было отмечено изолированного нарушения маточно-плацентарного кровотока. Сочетанное нарушение кровотока в данной группе беременных достигало 73,5% (n=36, 73,5%) $p<0,01$), нарушение фетоплацентарного кровотока 26,5% (n=13, 26,5%) $p<0,01$) с наличием нулевого и обратного диастолического кровотока в артериях пуповины у 24,4 % (n=12, 24,4%) $p<0,01$) и нарушением церебро-плацентарного отношения у 12,2 % (n=6, 12,2%) $p<0,01$) беременных.

В группе поздней формы ЗРП изолированное нарушение маточно-плацентарного кровотока было отмечено у 41,1 % беременных (n=23, 41,1%) $p<0,01$), сочетание нарушений маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока у 14,3 % (n=8, 14,3%) $p<0,01$), изолированное нарушение фето-плацентарного кровотока у 10,7% (n=6, 10,7%) $p<0,01$) со снижением до нулевого или реверсного диастолического кровотока в артериях пуповины в 7,1% (n=4, 7,1 %) $p<0,01$) и нарушением церебро-плацентарного отношения в 3,6 % (n=2, 3,6%) $p<0,01$) случаев. Структура

показателей доплерометрии при ранней и поздней форме ЗРП представлена на рисунке 10А и 10Б.



Рисунок 10. Структура показателей доплерометрии при ранней (А) и поздней (Б) форме ЗРП.

Как известно, ранняя форма ЗРП сопровождается более неблагоприятными перинатальными исходами, что часто вызвано воздействием с ранних сроков различных материнских и плацентарных факторов и развитием требующих досрочного родоразрешения осложнений. Так, сроки родоразрешения в группе ранней формы ЗРП составили 33,1 (29;35,6) недель, в группе поздней формы ЗРП 37,6 (36,1;40,3) недель (OR=3,2 (1,1-12,1), $p < 0,001$)).

При анализе родоразрешений была установлена статистически значимая более высокая частота (70,4%) ($n=74$, 70,4%) ($OR=3,5$ (1,1-10,6), $p<0,05$) абдоминального родоразрешения у беременных основной группы. При этом частота кесарева сечения в группе ранней формы ЗРП составила 100%. Показаниями к операции кесарева сечения в основной группе в преобладающем числе случаев послужили задержка роста плода, ухудшение состояния плода в виде острой и прогрессирующей гипоксии по данным функциональных методов исследования и наличие рубца на матке после операции кесарева сечения. Ножное положение плода, периферическая витреохориоретинальная дистрофия, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты и предлежание плаценты также послужили показаниями для абдоминального родоразрешения. Структура показаний к операции кесарева сечения в исследуемых группах представлена в таблице 9. Структура показаний к операции кесарева сечения в основной группе представлена на рисунке 11.

Таблица 9. Структура показаний к абдоминальному родоразрешению (n, %).

Показание	Группа 1 n= 74 (%)	Группа 2 n= 32 (%)
Задержка роста плода	35 (47,3%)	-
Острая гипоксия плода	7 (9,5%)	3 (9,4%)
Прогрессирующая гипоксия плода	6 (8,1%)	7 (21,9%)
Рубец на матке после операции кесарева сечения	15 (20,3%)	9 (28,1%)
Ножное предлежание плода	2 (2,7%)	6 (18,6%)
Периферическая витреохориоретинальная дистрофия	1 (1,4%)	4 (12,5%)
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	4 (5,4%)	1 (3,1%)
Предлежание плаценты	4 (5,4%)	2 (6,3%)

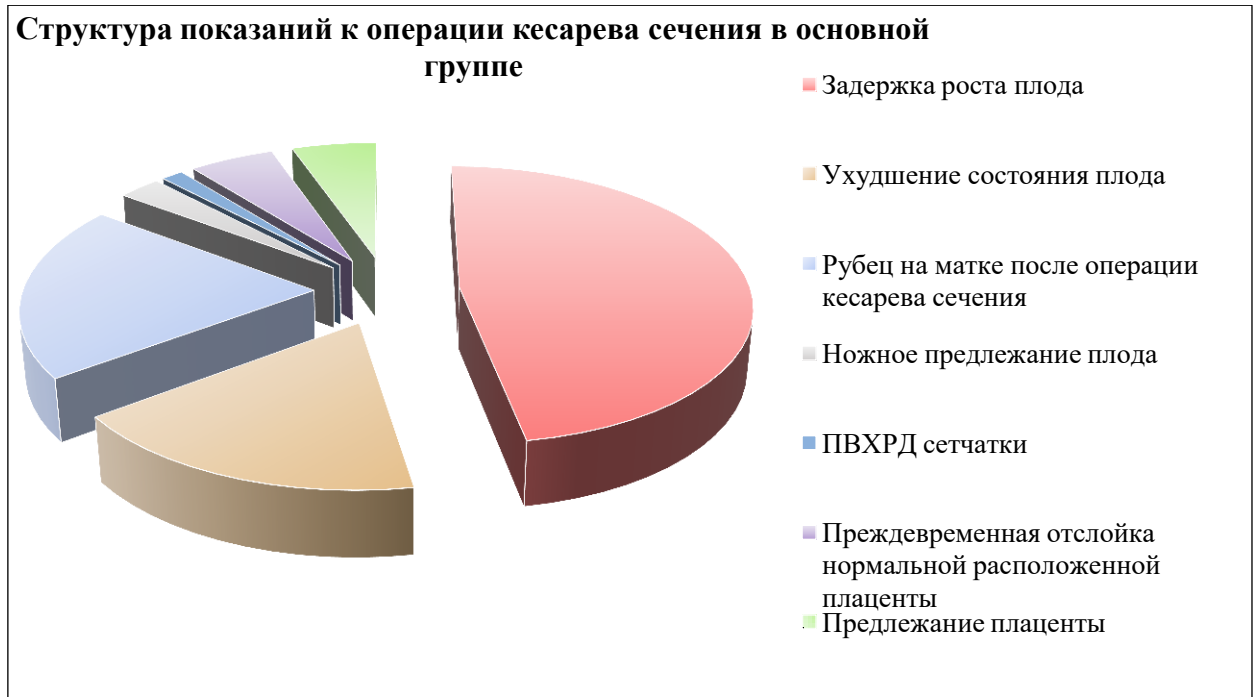


Рисунок 11. Структура показаний к операции кесарева сечения в основной группе.

Анализ послеродового периода не показал статически значимых осложнений у пациенток основной группы.

Анализ перинатальных исходов

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

Общая неонатальная заболеваемость закономерно выше была у новорожденных основной группы. В структуре заболеваемости у детей в основной группе статически значимо встречались врожденная пневмония ($n=34$, 32,4%) ($OR=3,6$ (1,9-10,1), $p < 0,01$), синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания ($n=12$, 11,4%) ($OR=2,6$ (1,8-11,3), $p < 0,001$),

внутрижелудочковые кровоизлияния (n=18, 17,1%) (OR=1,6 (0,8-9,6), p<0,01), некротизирующий энтероколит (n=6, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), p<0,001), бронхолегочная дисплазия (n=8, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), p<0,001), ретинопатия (n=5, 4,8%) (OR=2,2(0,8-12,3), p<0,01), респираторный дистресс-синдром (n=8, 7,6%) (OR=5,3 (0,5-18,2), p<0,001).

В основной группе чаще встречались церебральная депрессия (n=9, 8,6%) (OR=3,6 (0,9-14,2), p<0,05), неонатальная желтуха (n=29, 27,6%) (OR=5,6 (0,3-17,4), p<0,05), анемия новорожденных (n=34, 32,3%) (OR=1,6 (1,4-14,2), p<0,05), полицитемия (n=2, 1,9%) (OR=1,2 (0,6-9,2), p<0,01), тромбоцитопения (n=5, 4,8%) (OR=3,2 (0,9-10,2), p<0,01), срыгивания и руминация (n=15, 14,3%) (OR=4,6 (0,7-15,6), p<0,01), кровоизлияние в кожу (n=16, 15,2%) (OR=6,3 (1,4-21,1), p<0,01), дискинезия желудочно-кишечного тракта (n=7, 6,7%) (OR= 6,2 (0,3-15,4), p<0,01), неонатальная гипогликемия (n=5, 4,8%) (OR=2,4 (1,6-12,4), p<0,01), транзиторная лактазная недостаточность (n=7, 6,7%) (OR= 6,2 (0,3-15,4), p<0,01) преобладали в основной группе чем в группе сравнения.

В основной группе частота асфиксии различной степени тяжести (n=16, 15,2%) (OR=4,3 (1,4-17,5), p<0,01) статистически значимо выше, чем в группе сравнения. При этом в основной группе у новорожденных была диагностирована асфиксия легкой степени (n=10, 9,5%) (OR=2,3 (0,9-12,4), p<0,05) и асфиксия тяжелой степени (n=6, 5,7%) (OR=6,1 (1,9-16,3), p<0,001), тогда как в группе сравнения лишь асфиксия легкой степени (n=6, 5,3%) (OR=1,6 (0,4-16,2), p<0,05). Структура осложнений раннего неонатального периода представлена в таблице 10.

Таблица 10. Структура осложнений раннего неонатального периода

Нозологические формы	Группа 1 n= 105 (%)	Группа 2 n= 114 (%)
Врожденная пневмония	34 (32,4%)	6 (5,3%)
ДВС-синдром	12 (11,4%)	-
ВЖК I и II степени тяжести	18 (17,1%)	7 (6,1%)
НЭК	6 (5,7%)	-
Асфиксия легкой степени	10 (9,5%)	6 (5,3%)
Асфиксия тяжелой степени	6 (5,7%)	-
Респираторный дистресс-синдром	8 (7,6%)	-
Ретинопатия	5 (4,8%)	-
Бронхолегочная дисплазия	8 (7,6%)	-
Церебральная депрессия	9 (8,6%)	4 (12,5%)
Неонатальная желтуха	29 (27,6%)	4 (3,5%)
Анемия новорожденных	34 (32,3%)	6 (5,3%)
Полицитемия	2 (1,9%)	6 (0,9%)
Тромбоцитопения	5 (4,8%)	2 (1,8%)
Срыгивания и руминация	15 (14,3%)	8 (7,0%)
Кровоизлияние в кожу	16 (15,2%)	9 (7,9%)
Неонатальная гипогликемия	5 (4,8%)	1(0,9%)
Транзиторная лактазная недостаточность	7 (6,7%)	1(0,9%)
Дискинезия желудочно-кишечного тракта	7 (6,7%)	1(0,9%)

При внутригрупповом анализе было установлено, что масса тела детей в подгруппе IA ранней формы ЗРП составила 1122,6 (930;1803) г, а в подгруппе IB поздней формы ЗРП 2130 (1537;2662) г ($p<0,001$). Отличия были получены и в оценке состояния по шкале Апгар, которая на 1-ой минуте в подгруппе IA составила 5 (4;6), а в подгруппе IB 6 (5;7) ($p<0,001$) баллов, на 5-ой минуте 6 (5;7) в подгруппе ранней формы и 7 (6;8) баллов в подгруппе поздней формы ЗРП ($p<0,001$). Дети, рожденные с ЭНМТ были в 100% случаев в подгруппе ранней формы ЗРП ($n=11$, 22,4%) ($OR=8,4$ (1,5-16,7), $p<0,001$), а с ОНМТ составили 16,3 % ($n=8$, 16,3%) ($OR=8,4$ (1,5-16,7), $p<0,001$). В IA подгруппе частота врожденной пневмонии ($n=26$, 53,2%)

(OR=6,1 (1,1-16,2), $p<0,001$), ДВС-синдрома (n=8, 16,3%) (OR=7,2 (0,9-19,6), $p<0,01$), ВЖК (n=10, 20,4%) (OR=3,6 (0,4-17,2), $p<0,05$), НЭК (n=5, 10,2%) (OR=6,0 (1,3-13,4), $p<0,01$), асфиксии тяжелой степени (n=5, 10,2%) (OR=6,0 (1,3-13,4), $p<0,01$), бронхолегочной дисплазии (n=7, 14,3%) (OR=4,6 (1,2-18,4), $p<0,001$), ретинопатии (n=5, 10,2%) (OR=7,6 (0,9-19,2), $p<0,001$) были статистически значимо выше, чем в IB подгруппе. Данные внутригруппового анализа представлены на рисунке 12.

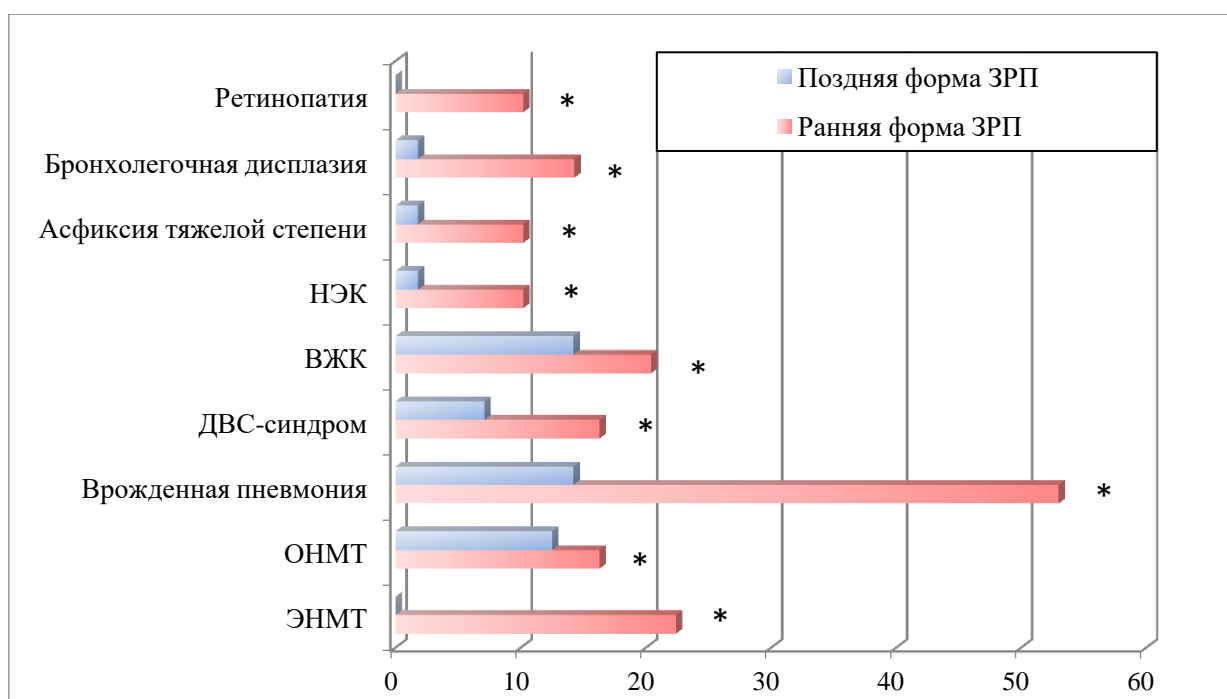


Рисунок 12. Осложнения раннего неонатального периода при ранней и поздней форме ЗРП

Таким образом, комплексный анализ клинико-анамнестических данных, течения гестационного периода и перинатальных исходов при задержке роста плода выявил следующие закономерности:

1. Анализ течения гестационного периода показал, что фактором риска развития задержки роста плода послужил угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре беременности. В группе задержки роста плода также отмечалось статистически значимое увеличение частоты маловодия по данным ультразвукового исследования.

2. Анализ перинатальных исходов показал статистически значимую высокую частоту осложнений раннего неонатального периода при ранней форме задержки роста плода.

3. В основной группе 10,5% составили дети с экстремально низкой массой тела при рождении, а 14,3 % с очень низкой массой тела при рождении.

4. Общая неонатальная заболеваемость закономерно выше была у новорожденных с задержкой роста плода. В структуре заболеваемости у детей в основной группе статистически значимо встречались врожденная пневмония, ДВС-синдром, ВЖК I и II степени тяжести, НЭК, бронхолегочная дисплазия, респираторный дистресс-синдром и ретинопатия.

На основании анализа клинико-anamnestических данных и данных об особенностях 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;

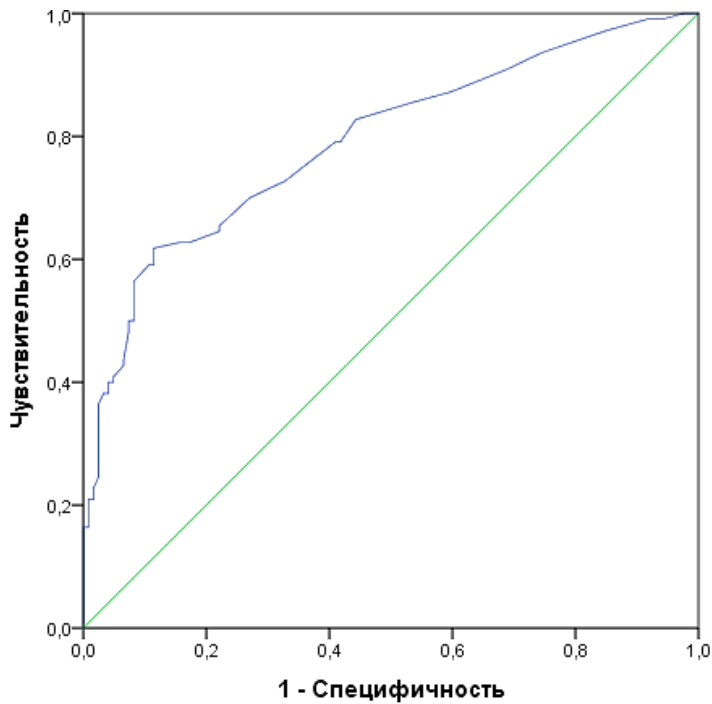
X1 – Хронический пиелонефрит

X2 – Задержка роста плода в анамнезе

X3 – Угрожающий выкидыш с формированием ретрохориальной гематомы

X4 – Хронический цервицит

С целью оценки полученной модели был проведен ROC-анализ с площадью под кривой 0,79 (ДИ 0,73-0,85). Оптимальный порог составил 0,50 с чувствительностью 73,2 % и специфичностью 74,0 % (рисунок 13).



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 13. ROC-кривая для полученной предсказательной модели.

4.1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови

4.1.1. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови при задержке роста плода

Внедрение исследований, основанных на применении ПЦР с целью количественного определения внеклеточной фетальной ДНК позволило сосредоточиться на клиническом применении данного маркера не только в качестве скринингового метода генетических патологий плода, но и в роли прогностического маркера осложнений беременности. Однако, в мировой литературе данные о значении вфДНК в прогнозировании и диагностике ЗРП противоречивы.

С целью количественного определения внеклеточной фетальной ДНК в плазме материнской крови в подгруппе IA ранней формы ЗРП, подгруппе IB поздней формы ЗРП и в группе контроля нами было проведено исследование концентрации гиперметилированной части промотора гена RASSF1A. Принимая во внимание данные о том, что уровень вфДНК увеличивается со

сроком беременности, пациентки были включены в исследование по методу подбора пар с учетом гестационного срока. Таким образом, медиана сроков в исследуемых группах была сопоставима, что позволило в дальнейшем оценить полученные результаты (таблица 2).

Концентрация вфДНК в зависимости от срока беременности, на котором был осуществлен забор биоматериала, при ранней и поздней формах ЗРП, а также в группе сравнения представлена на графике (рисунок 14).

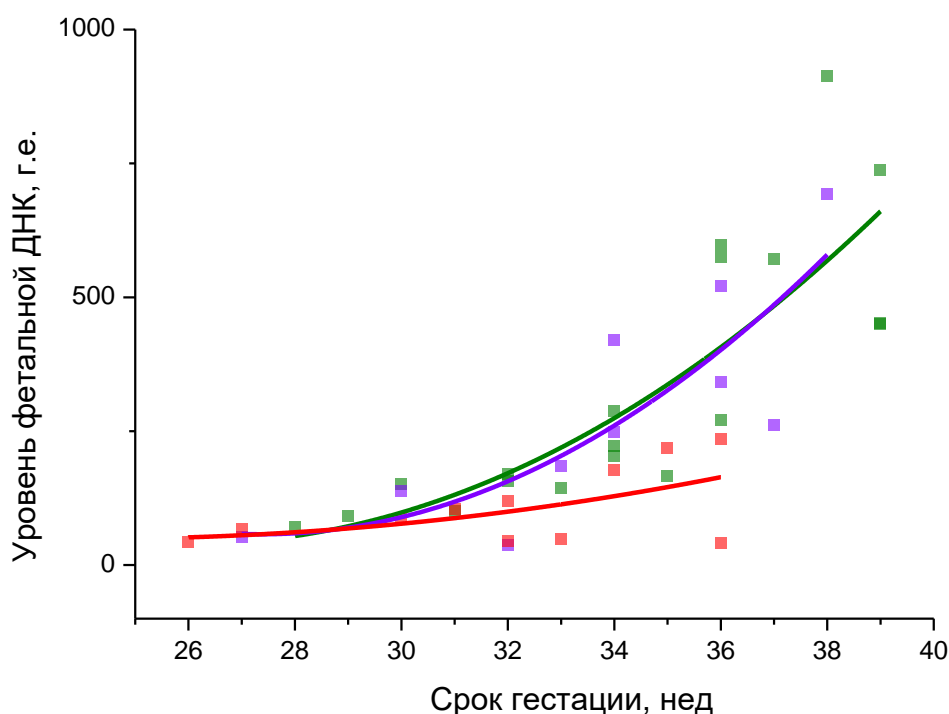


Рисунок 14. Концентрация внеклеточной фетальной ДНК при ранней, поздней формах ЗРП и в группе контроля.

Были получены данные, согласно которым уровень вфДНК в группе ранней формы ЗРП составил 89,03 (44,52; 178,32) ГЕ/мл и был статистически значимо ниже показателей в группе поздней формы ЗРП 244,14 (145,23; 422,47) ГЕ/мл и в группе сравнения 211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл ($p < 0,001$). При этом статически значимых различий между поздней формой ЗРП и группой

сравнения получено не было ($p>0,05$). Результаты исследования представлены на рисунке 15.

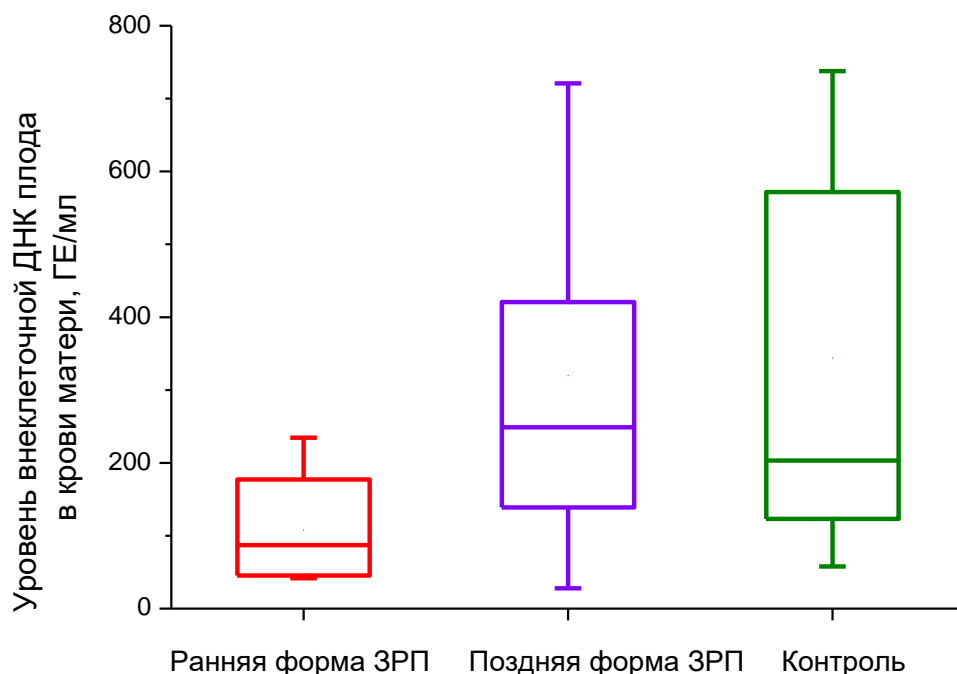


Рисунок 15. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в при ранней и поздней форме ЗРП.

Принимая во внимание данные мировой литературы о взаимосвязи между уровнем вфДНК и массой плаценты, а также полученные данные о статистически значимом снижении уровня вфДНК исключительно в группе ранней формы ЗРП, следующим этапом исследования было подтверждение взаимосвязи между уровнем внеклеточной фетальной ДНК и клиническими критериями с использованием непараметрического метода ранговой корреляции по Спирмену. В качестве порога значимости использовали значение $p\text{-value} < 0,05$. Данные представлены в таблице 10.

Масса плацент в группе ранней формы ЗРП составила 248 (228; 307) граммов, что было статистически значимо ниже данного показателя в группе поздней формы ЗРП 335 (305; 380, $p < 0,05$) граммов и группе сравнения 432

(340; 471, $p < 0,001$) грамма. Анализ установил прямую сильную корреляционную связь между уровнем вфДНК, массой плаценты ($r=0,79$; $p < 0,001$), массой ($r=0,72$; $p < 0,001$) и ростом ($r=0,71$; $p < 0,001$) новорожденного в группе ранней формы ЗРП. Сильная обратная корреляционная связь была получена с неонатальными исходами – с врожденной пневмонией ($r=-0,73$; $p=0,03$), ВЖК II степени ($r=-0,74$; $p=0,03$), НЭК ($r=-0,72$; $p=0,03$) и асфиксией тяжелой степени ($r=-0,75$; $p=0,03$).

Таблица 11. Оценка корреляционной связи между концентрацией вфДНК и клиничко-анамнестическими параметрами в группе ранней формы ЗРП.

Параметры		p-value	Коэффициент r_s
Концентрация вфДНК	Масса плаценты	<0,001	0,79
	Масса новорожденного	<0,001	0,72
	Рост новорожденного	<0,001	0,71
	Врожденная пневмония	0,03	-0,73
	ВЖК II степени тяжести	0,03	-0,74
	НЭК	0,03	-0,72
	Асфиксия тяжелой степени	0,03	-0,75

С целью оценки диагностической эффективности количественного определения вфДНК для ранней формы ЗРП был проведен ROC анализ, который продемонстрировал, что измерение концентрации вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении вфДНК 119,11 ГЕ/мл, позволяет с высокой чувствительностью (73,1%) и специфичностью (79,3%) ($AUC=0.81$, (95% ДИ 0,63-0,98)) диагностировать раннюю форму ЗРП и предсказывать вероятность развития таких осложнений раннего неонатального периода как врожденная пневмония, ВЖК II степени, НЭК и асфиксия тяжелой степени у новорожденных с ранней формой ЗРП (рисунок 16).

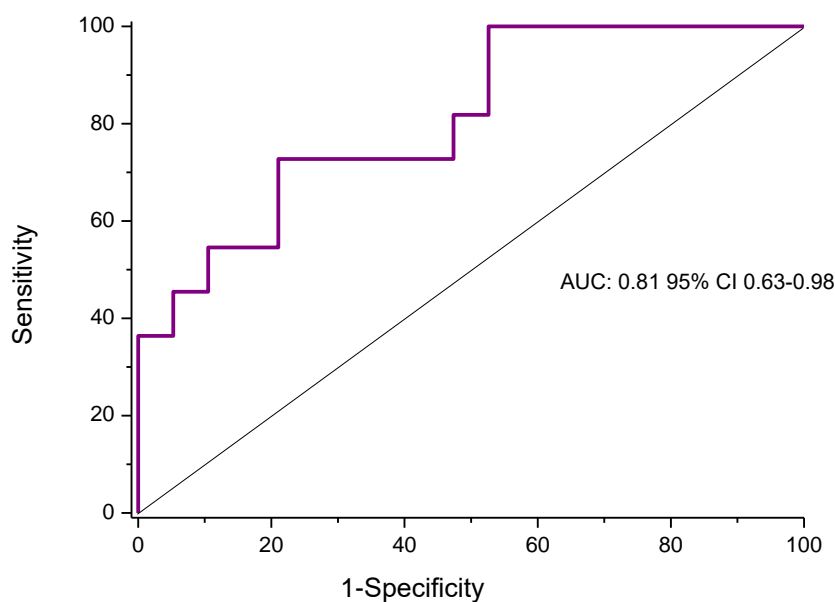


Рисунок 16. Оценка диагностической эффективности определения уровня вфДНК в плазме крови для выделения беременных женщин с ранней формой задержки роста плода.

Для того, чтобы расширить понимание механизмов, лежащих в основе полученных изменений следующим этапом исследования выступил иммунофлюоресцентный анализ плацент при ранней и поздней формах ЗРП, а также при физиологической беременности (рисунок 17).

Анализ плацент при ранней форме ЗРП показал преобладание обширных зон с увеличением количества трофобласта, но отсутствием нормальной архитектоники. Отмечались тесно расположенные по отношению друг к другу промежуточные незрелые ворсины и промежуточные зрелые ворсины с доминированием стромального компонента и гипоплазией капилляров. Избыточное отложение перивиллезного фибриноида способствовало формированию афункциональных зон и уменьшению объема межворсинчатого пространства. В периваскулярных зонах была установлена мононуклеарная и нейтрофильная инфильтрация. Помимо этого, отмечались хаотичные склерозированные ворсины с увеличенным количеством стромальных клеток

и единичными микрососудами. Описанные изменения гипоплазии дистальных отделов ворсин ассоциированы с неполной гестационной трансформацией спиральных артерий и являются проявлением материнской мальперфузии. (рисунок 17, А). Исследование плацент при поздней форме ЗРП показало сохранение дифференцировки ворсин. В зрелых ворсинах были выражены компенсаторно-приспособительные реакции. Повышение активности синцитиотрофобласта приводило к образованию крупных синцитиальных узлов, которые располагались на ножке и состояли из плотно расположенных ядер синцитиотрофобласт, а также увеличению объема капилляров. При этом были зафиксированы небольшие фокусы фибриноида, которые не приводили к снижению интервиллезного объема. Было отмечено небольшое количество промежуточных незрелых, промежуточных зрелых и хаотичных склерозированных ворсин (рисунок 17, Б). Плаценты в группе контроля характеризовались преобладанием терминальных и зрелых промежуточных ворсин, а также свободным от инкрустирующих депозитов фибриноида. Было отмечено, что доля терминального ворсинчатого эндотелия превосходила стромальный компонент (рисунок 17, В).

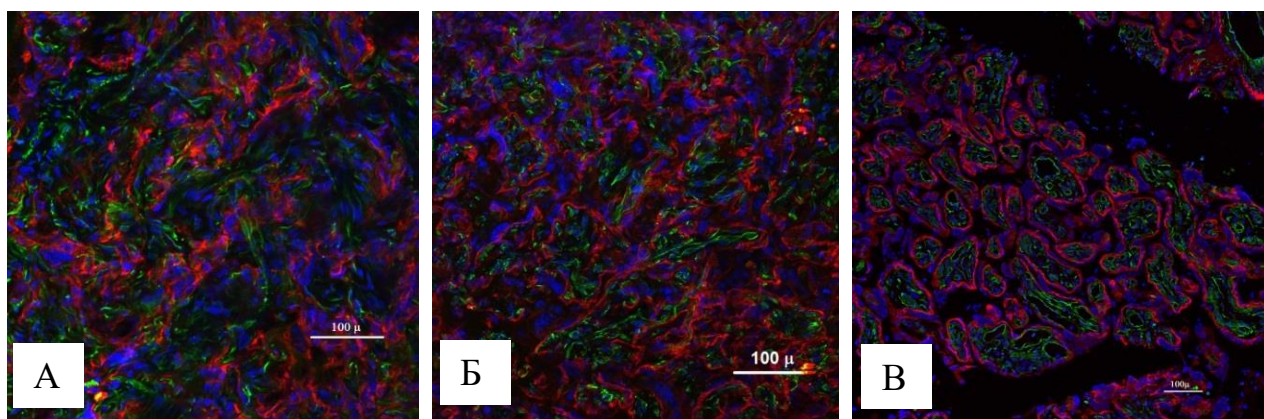


Рисунок 17. Иммунофлюоресцентный анализ плацент при ранней форме ЗРП (А), поздней форме ЗРП (Б), физиологической беременности (В).

Обозначения: красный – E-cadherin; синий – DAPI; зеленый – виментин

4.1.2. Исследование внеклеточной фетальной ДНК в материнской плазме при сочетании задержки роста плода и преэклампсии.

Общеизвестно, что ЗРП и ПЭ, являясь плацента-ассоциированными осложнениями беременности, нередко сопутствуют друг другу. В связи с этим интерес представляло изучение уровня внеклеточной фетальной ДНК и оценка ее диагностической значимости при сочетании данных осложнений. Для этого в исследование согласно критериям включения и исключения, были включены дополнительные группы беременных. Группу I составили пациентки с ЗРП и ПЭ (n=32), группу II (n=32) – сравнения – пациентки с физиологически протекающей беременностью. Все пациентки были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям. Группа пациенток, беременность которых осложнилась ПЭ и ЗРП, была разделена на две подгруппы: подгруппа IA (n=20) – беременные с нарушением фето-плацентарного кровотока по данным доплеромерии и подгруппа IB (n=12) – беременные с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока.

Диагностика ПЭ основывалась на Международной статистической классификации болезней (МКБ) и соответствовала критериям, разработанным Европейским обществом по изучению АГ – существовавшая ранее; гестационная АГ; преэклампсия; существовавшая ранее АГ с гестационной гипертензией и протеинурией; неподдающаяся классификации АГ; ПЭ – гипертензия (давление $\geq 140/90$) и протеинурия (содержание белка выше 0,3г в суточной моче).

Согласно полученным результатам в группе ЗРП и ПЭ было отмечено статистически значимо более высокое значение вфДНК, которое составило 2440 (1456; 3696) ГЕ/мл. При этом концентрация вфДНК в подгруппе IA с нарушением фето-плацентарного кровотока составила 2272,12 (1096,09; 4928,23) ГЕ/мл, а в подгруппе IB без доплерометрических нарушений – 2712,31 (1608, 25; 2800,17) ГЕ/мл. В группе сравнения была получена концентрация вфДНК равная 200,72 (112,63; 352,59, $p<0,01$) ГЕ/мл (рисунок 18).

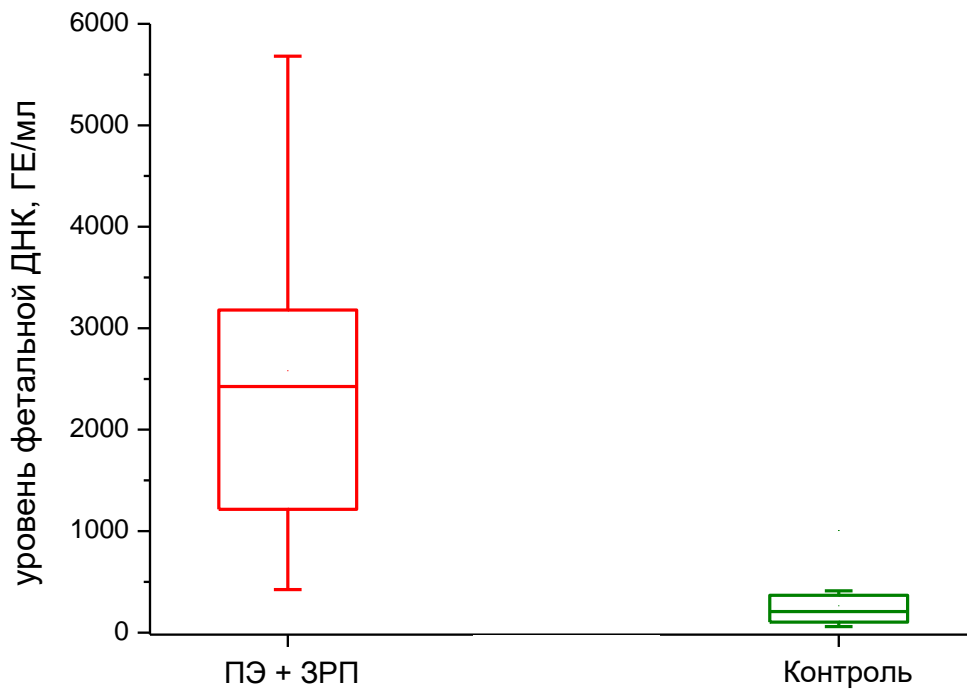


Рисунок 18. Исследование внеклеточной фетальной ДНК при задержке роста плода и преэклампсии.

Для оценки диагностической эффективности количественного определения вфДНК при ЗРП и ПЭ без нарушений фето-плацентарного кровотока был проведен ROC-анализ. Оценка площади под ROC-кривой составила 89,5, 95%, ДИ (70-100). При пороговом значении ДНК 1608,23 GE/мл, чувствительность составила 80,1%, специфичность 89,4%. (рисунок 19).

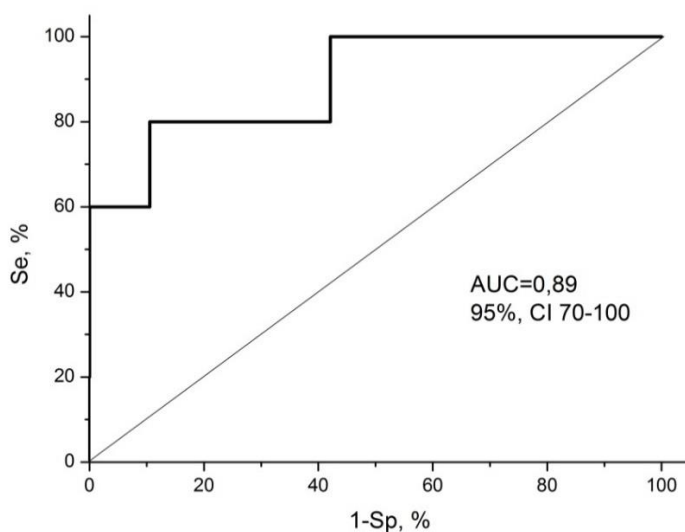


Рисунок 19. Оценка диагностической значимости определения концентрации вфДНК у беременных с ЗРП и ПЭ с нормальными показателями фетоплацентарного кровотока.

Проведенный корреляционный анализ не выявил зависимости уровня вфДНК от массы плаценты при сочетании ЗРП и ПЭ, что послужило причиной для проведения гистологического исследования, целью которого было уточнение патогенетических звеньев плацентарных изменений при сочетанном развитии данных осложнений. Было проведено гистохимическое исследование плацент с применением терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) в плацентах при нормальной беременности (рисунок 20А) и сочетании ЗРП и ПЭ (рисунок 20Б). Применение в качестве меток виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей для идентификации мезенхимальных клеток, цитокератина-7 с целью определения клеток трофобласта, интеркалирующего красителя для окрашивания нуклеиновых кислот 4',6-диамиидно-2-фенилиндола (DAPI) и терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL) для идентификации апоптоза, продемонстрировало выраженный апоптоз в плацентах при ПЭ и ЗРП по сравнению с группой контроля.

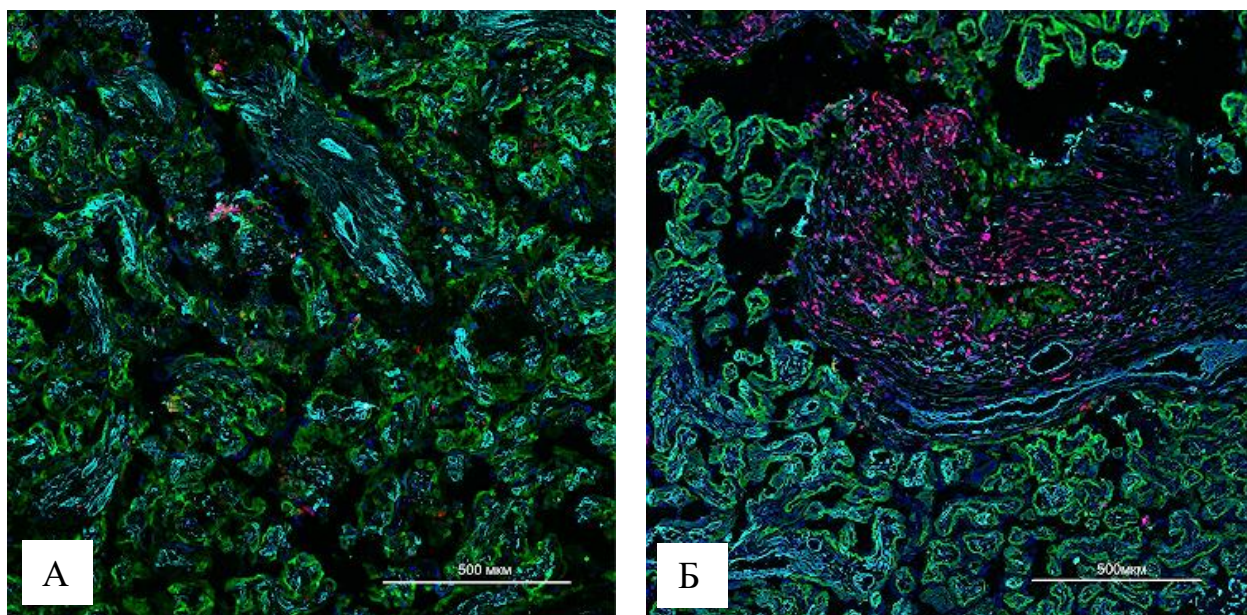


Рисунок 20А - исследование степени апоптоза в плаценте при нормальной беременности

Рисунок 20Б - исследование степени апоптоза в плаценте при ЗРП и ПЭ.

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

Согласно полученным результатам в плацентах при физиологически протекающей беременности наблюдается слабовыраженный апоптоз клеток трофобласта. При сочетании ЗРП и ПЭ наблюдается значительное усиление апоптоза не только клеток трофобласта, но и стромы створовых ворсин.

4.2 Исследование метилирования генов при задержке роста плода

4.2.1. Исследование метилирования генов в плаценте при задержке роста плода

Несмотря на проводимое фундаментальные исследования по изучению механизмов, лежащих в основе ЗРП, до сих пор недостижимым остается применение универсального прогностического и раннего диагностического маркера данного осложнения беременности. В последнее время внимание ученых направлено на изучение эпигенетических изменений, которые возникают в ответ на факторы окружающей среды и приводят к изменению специфической деятельности клеток. Плацента как важнейший транзитный

орган является уникальной основой для изучения взаимодействия внешних и генетических факторов, а также оценки их вклада в развитие осложнений беременности. Изучение эпигенетических изменений ДНК плаценты представляет большой интерес в связи с перспективностью разработки новых диагностических тестов на основании определения эпигенетических меток в других биологических субстратах. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов, осуществляющих контроль генной экспрессии, является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК.

На основании литературных данных, с целью исследования уровня метилирования, были отобраны гены с потенциальной ролью в патогенезе ЗРП – CDO 1, MMP2, СЕВРА, LEP, HLAG, VEGF, MEST, CDH1, TLR2, BMP 6, GNA12, DAPK3, DFNA 5, ICR (импринтинг контролирующая область) IGF2/H19.

Изучение метилирования генов в плаценте выявило статически значимые изменения в гене TLR2 и ICR (импринтинг контролирующей области) IGF2/H19. Было получено снижение относительного уровня метилирования гена TLR2 в группе ЗРП 0,26 (0,14; 0,30) по сравнению с группой сравнения 0,31 (0,26;0,34, $p=0,01$) (рисунок 21).

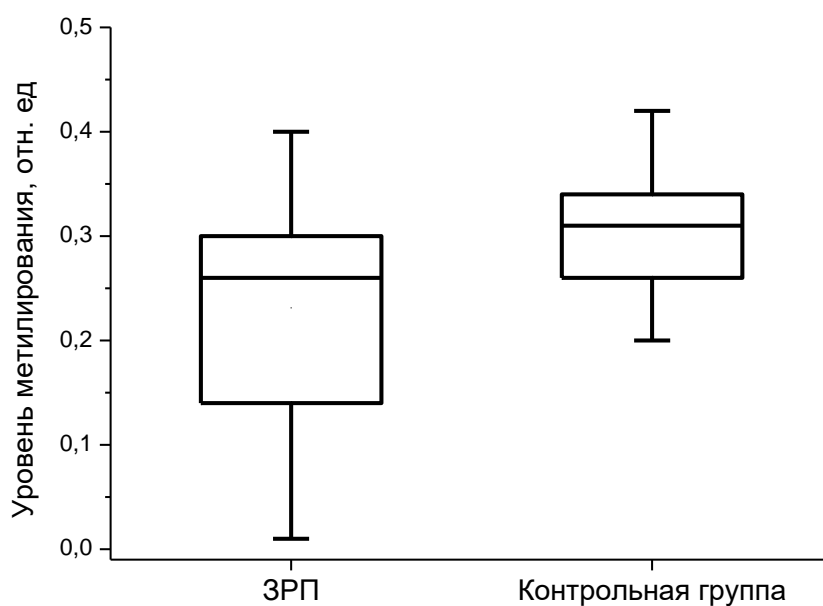


Рисунок 21. Относительный уровень метилирования гена TLR2 в плацентах.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области (ICR) IGF2/H19 также показало статистически значимое снижение относительного уровня метилирования в плацентах с ЗРП 0,17 (0,06; 0,24) по сравнению с группой контроля 0,33 (0,30; 0,37, $p < 0,001$) (рисунок 22).

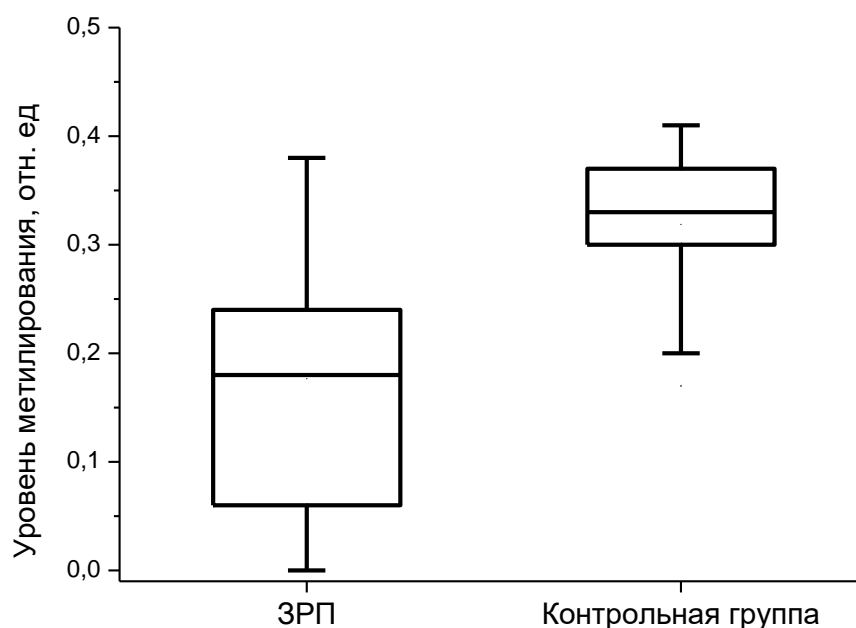


Рисунок 22. Относительный уровень метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19.

4.2.2. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в плазме материнской крови при задержке роста плода

Изучение метилирования профиля генов в плаценте и выделение генов-кандидатов нашло дальнейшее продолжение в исследовании плазмы беременных женщин. Согласно полученным данным уровень метилирования гена TLR2 в плазме материнской крови в группе ранней формы ЗРП составил 0,01 (0,0; 0,45) и был статистически значимо ниже уровня метилирования в группе сравнения 0,43 (0,05;0,53, $p=0,02$). Относительный уровень метилирования TLR2 в плазме женщин в группе поздней формы ЗРП составил 0,39 (0,0;0,55) и значимо не различался с группой сравнения 0,43 (0,05;0,53, $p=0,87$) (рисунок 23).

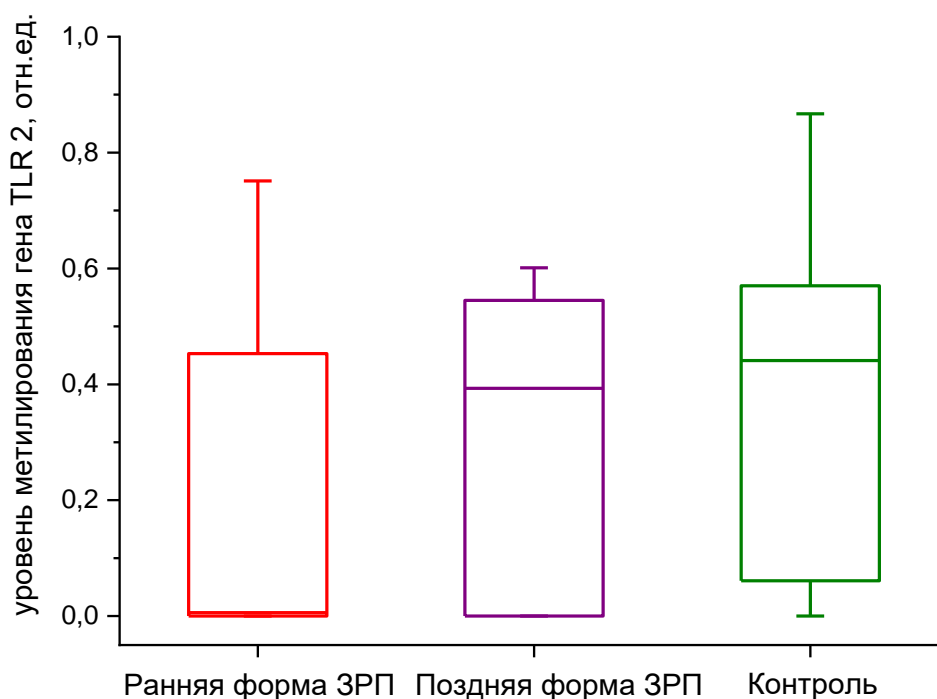


Рисунок 23. Относительный уровень метилирования гена TLR2 в плазме материнской крови в исследуемых группах.

Принимая во внимание полученные данные с целью определения значимости данного исследования в качестве диагностического теста при ранней форме ЗРП был проведен ROC-анализ, который охарактеризовал полученную модель как хорошую, и обосновал перспективность его использования для выявления групп беременных с ранней формой ЗРП с $AUC=0,72$ (95% ДИ 0,56-0,88), При пороговом значении относительного уровня метилирования гена TLR2 0,012 чувствительность метода составила 88,1%, а специфичность 60,2% (рисунок 24).

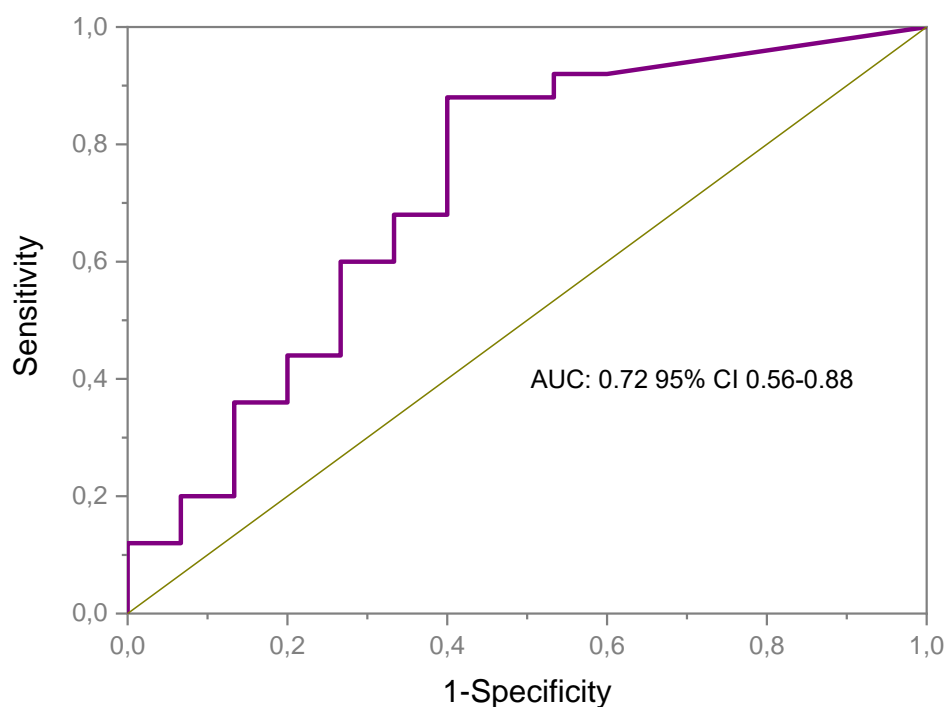


Рисунок 24. Анализ ROC-кривой уровня метилирования гена TLR2 для дифференциации групп беременных с ранней формой ЗРП.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 показало снижение относительного уровня метилирования в группе ранней форме ЗРП, которое составило 0,22 (0,18;0,32) и было статистически значимо ниже относительного уровня метилирования в группе сравнения 0,49 (0,44;0,65, $p=0,03$). Измерение относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в группе поздней формы ЗРП не показало статистически значимых различий с группой сравнения и составило 0,48 (0,32,0,52, $p = 0,53$). Полученные данные представлены графически на рисунке 25.

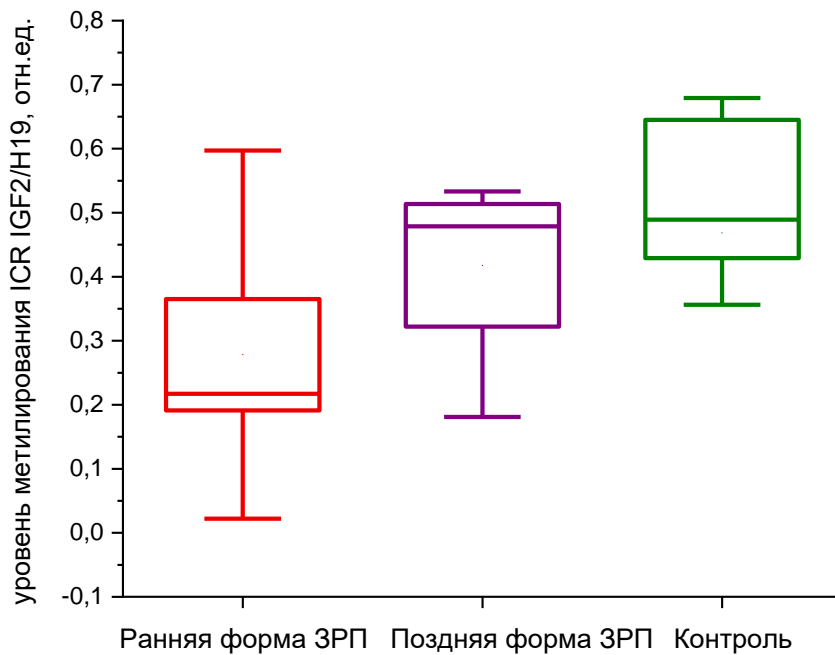


Рисунок 25. Относительный уровень метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови в исследуемых группах.

Для определения значимости определения относительного уровня импринтинг контролирующей области IGF2/H19 в плазме материнской крови в качестве диагностического теста при ранней форме ЗРП был проведен ROC-анализ, который охарактеризовал полученную модель как хорошую, и обосновал перспективность его использования для выявления групп беременных с ранней формой ЗРП с $AUC=0,79$ (95% ДИ 0,62-0,87). При пороговом значении относительного уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 0,2 чувствительность метода составила 80,4%, специфичность 80,1% (рисунок 26)

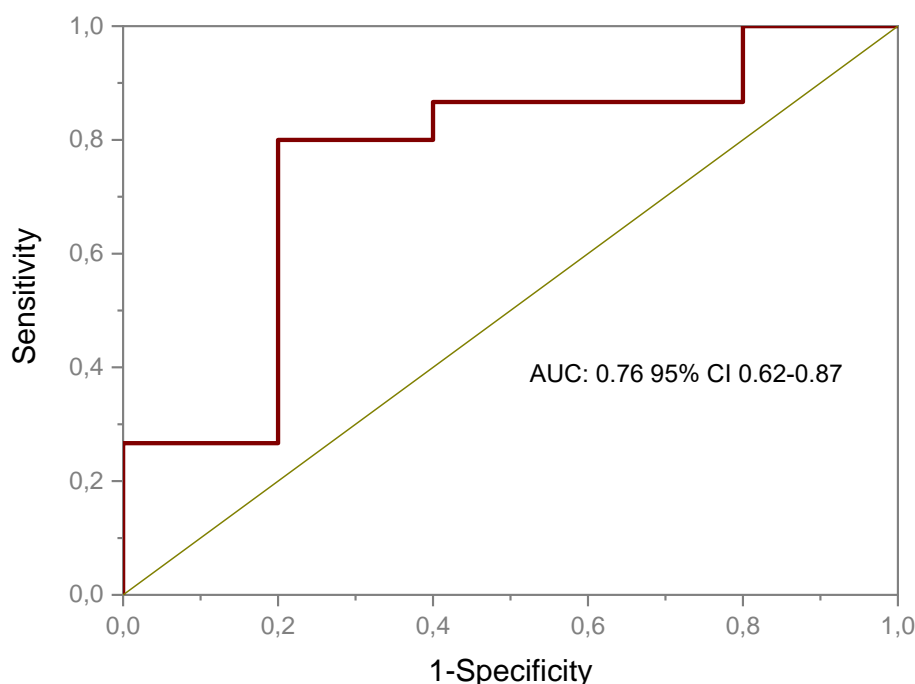


Рисунок 26. Анализ ROC-кривой уровня метилирования импринтинг контролирующей области IGF2/H19 для дифференциации групп беременных с ранней формой ЗРП.

4.2.3. Исследование уровня метилирования гена TLR2 и импринтинг-контролирующей области (ICR) IGF2/H19 в пуповинной крови при задержке роста плода

С целью оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования импринтинг-контролирующей области IGF2/H19 в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования. Для проведения метилирования IGF2/H19 (11p15.5) был проанализирован шестой участок связывания ICR IGF2/H19 с регулятором генной транскрипции CTCF – фактором, связывающимся с последовательностью CCCTC.

Шестой участок связывания ICR IGF2/H19 представляет собой следующую последовательность: TcgGAAGTGGTcgcgcgGcgGTAGT, которая

состоит из 5 сайтов. В результате окончания последнего этапа пиросеквенирования – построения комплементарной цепи ДНК, была сформирована пириграмма (рисунок 27).

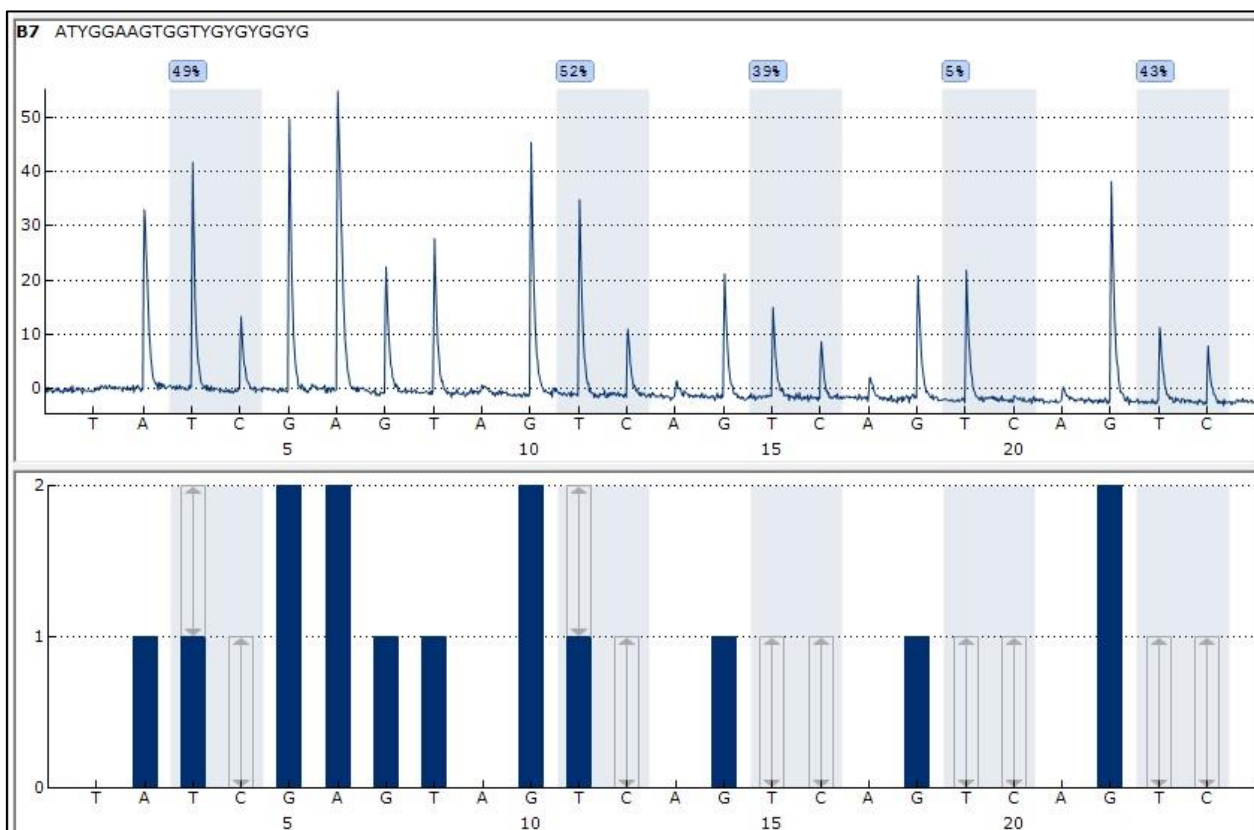


Рисунок 27. Пириграмма оценки метилирования ICR IGF2/H19. Выделены все CpG-сайты и показан уровень метилирования каждого в процентах.

Данные пириграммы позволили определить уровни метилирования каждого CpG-сайта (таблица 11). Были получены статистически значимые изменения уровня метилирования 2-ого CpG-сайта данной последовательности: TcgGAAGTGGTcgcgcgGcgGTAGT. Уровень метилирования данного сайта при ЗРП составил 42 (38,5;45) %, что было ниже значений, полученных в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5) %, $p = 0,02$) (рисунок 28).

Таблица 11. Результаты уровня метилирования CpG-сайтов в шестом участке связывания ICR IGF2/H19

№ сайта	Задержка роста плода			Группа сравнения			
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	p-value
1	44	40.5	46	45	43	48	0,066
2	42	38.5	45	45.5	41.75	48.5	0,017
3	37	35.5	39	37.5	35	41	0,44
4	31	5.5	34.5	33.5	6.5	36.25	0,46
5	39	36.5	46.5	39	37	42.25	0,93

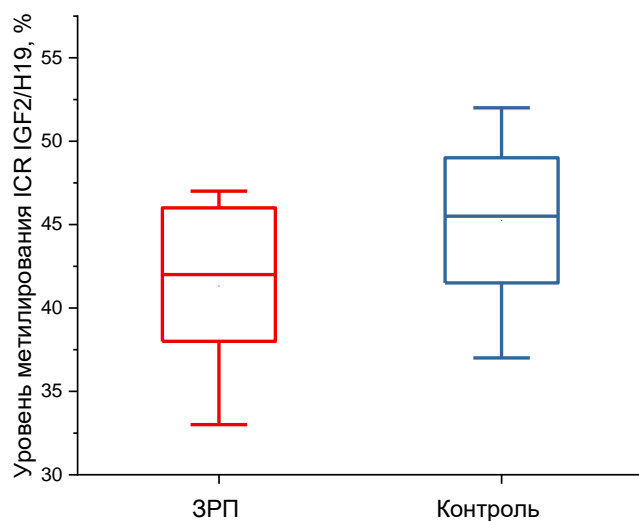


Рисунок 28. Определение уровня метилирования 2-ого сайта в шестом участке связывания ICR IGF2/H19 методом пиросеквенирования.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Задержка роста плода занимает важное место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности и остается одной из ведущих проблем современного акушерства [3; 21; 98; 118; 143]. Согласно эпидемиологическим данным частота данного осложнения беременности выше в странах с ограниченными ресурсами. Так, если доля рожденных маловесными к сроку гестации детей в развитых странах составляет 10 %, то в развивающихся странах, она уже достигает 20% [209].

Общеизвестными являются данные о взаимосвязи между низкой массой тела при рождении и риском развития перинатальных осложнений. Исследовательская группа по эпидемиологии детского здоровья провела исследование, в которое были включены 14 когорт новорожденных с использованием данных Международного консорциума по росту плода и новорожденного в 21-ом веке (INTERGROWTH-21). Согласно полученным данным, доля маловесных к сроку гестации новорожденных в структуре неонатальной смерти составила 22 % [272]. Помимо высокой заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, дети с задержкой роста плода входят в группу риска по развитию сердечно-сосудистых, метаболических и неврологических заболеваний при достижении ими зрелого возраста, что согласуется с теорией внутриутробного программирования [272].

Проблема антенатальной диагностики задержки роста плода до настоящего времени не теряет актуальности. Известно, что данное осложнение беременности выявляется постнатально в 75 % случаев, что связано преимущественно с методологической неоднородностью инструментальных и функциональных методов исследования [117].

В мировом сообществе стремление к совершенствованию диагностики задержки роста плода сопровождается поиском новых факторов риска и последующим внедрением в клиническую практику прогностических моделей. Интересным представляется подход Королевского общества акушеров-гинекологов, которое выделяет различные факторы риска

задержки роста плода, используя при этом ранжирование для демонстрации их прогностической ценности [232].

К факторам риска, имеющим большее значение относят: материнский возраст старше 40 лет, курение более 11 сигарет в день, употребление кокаина, ежедневные чрезмерные физические нагрузки, хроническая артериальная гипертензия, сахарный диабет с развитием ангиопатии, почечная недостаточность, антифосфолипидный синдром, рождение маловесного ребенка и преждевременные роды в исходе предыдущей беременности, а также такие осложнения беременности как угрожающий выкидыш с образованием ретрохориальной гематомы, гестационная артериальная гипертензия тяжелой степени, преэклампсия, а также снижение ассоциированного с беременностью протеин-А плазмы (РАРР-А) ниже 0,4 МоМ. К малым факторам риска отнесены: курение менее 10 сигарет в день, наступление беременности в результате вспомогательных репродуктивных технологий, наличие преэклампсии в исходе предыдущей беременности, интергравидарный период менее 6 и более 60 месяцев, умеренная гестационная артериальная гипертензия, а также особенности диеты [232].

Американское общество акушеров-гинекологов выделяет следующие факторы риска: существовавший до беременности сахарный диабет, почечная недостаточность, аутоиммунные, сердечно-сосудистые и инфекционные заболевания, антифосфолипидный синдром, употребление алкоголя, наркотиков, никотина, применение препаратов с тератогенным эффектом, повторные роды у матери; генетические и хромосомные аномалии и врожденные пороки развития у плода, а также патология плаценты и пуповины [54].

Данные факторы риска являются широко известными, однако, вклад каждого из них оценивается различными авторами неодинаково. Кроме того, анализ эпидемиологических и клинических данных показывает, что задержку роста плода следует относить скорее к полиэтиологическим заболеваниям с мультифакториальной природой. В каждом отдельном случае возможно

уникальное сочетание материнских, плацентарных и плодовых факторов. Принимая во внимание многообразие данных о факторах риска, особенностях течения беременности и родов, состоянии плодов и новорожденных при задержке роста плода, на первом этапе исследования был проведен подробный клинико-анамнестический анализ с целью выделения факторов риска данного осложнения беременности.

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 [28; 34; 86; 92; 124], 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 [18; 23; 92; 251].

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 [3; 5; 271; 106; 208] и инфекционно-воспалительных процессов в органах мочевыделительной системы [28; 229; 258].

Полученные данные об ассоциации задержки роста плода с хронической артериальной гипертензией

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 [38; 40] и рождением маловесных детей [9; 19; 244] 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 согласуется с общеизвестными эпидемиологическими данными [39, 42, 221]. Высокий риск антенатальных осложнений объясняет

ассоциацию задержки роста плода с ятрогенными преждевременными родами [19, 24, 96, 117]. Так, сроки родоразрешения 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.

Проведенный анализ соматического, гинекологического и акушерского анамнеза, а также перинатальных исходов подтвердил значимость анамнестических данных и их существенный вклад в развитие задержки роста плода. Однако, недостаточная предиктивная способность моделей, основанных на учете факторов риска, вызывает потребность в проведении молекулярно-генетических исследований с целью поиска надежных

неинвазивных маркеров, которые обладали бы достаточной прогностической и диагностической ценностью в отношении задержки роста плода.

В настоящее время оценка прогностической и диагностической ценности вфДНК, как одного из наиболее изученных неинвазивных биомолекул, остается важной задачей современного акушерства, что во многом связано с изменением уровня данного маркера до клинической манифестации различных осложнений беременности. Полученные нами результаты исследования гиперметирированной части промотора гена RASSF1A в плазме материнской крови не установили статистически значимых различий между задержкой роста плода и физиологически протекающей беременностью. Однако, при проведении анализа с учетом форм, было показано снижение концентрации вфДНК в группе ранней задержки роста плода до 89,03 (44,52; 178,32) ГЕ/мл, которое было статистически значимо ниже показателей в группах поздней формы – 244,14 (145,23; 422,47) ГЕ/мл и сравнения – 211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл ($p < 0,001$). С целью оценки диагностической значимости был проведен ROC-анализ, который показал, что определение уровня вфДНК в плазме материнской крови при пороговом значении вфДНК 119,11 ГЕ/мл позволяет диагностировать раннюю форму задержки роста плода с высокой чувствительностью (73,1%) и специфичностью (79,3%) (AUC=0.81, 95%, ДИ 0,73-0,85).

Полученные результаты согласуются с результатами исследований по оценке прогностической значимости вфДНК. В исследовании I. Krishna et al. был оценен уровень фетальной фракции ДНК при проведении неинвазивного пренатального теста и продемонстрирована ассоциация между ее низким уровнем (менее 4%) и малым весом при рождении [6]. D. L. Rolnik et al. расширили исследование уровня вфДНК в I триместре беременности и, выполнив корреляционный анализ с применением одномерных и многомерных регрессий, показали, что снижение вфДНК ассоциировано с

повышенным риском развития не только задержки роста плода, но и преэклампсии [10; 22; 41; 42; 43].

Исследования по оценке концентрации вфДНК во многом противоречивы [82; 83; 84; 189; 194, 238], что может быть связано с различными методологическими подходами, в том числе отсутствием учета ранней и поздней форм задержки роста плода. Так, в проспективном исследовании D. Morano et al., целью которого было сравнение уровней фетальной фракции внеклеточной ДНК в I триместре у женщин, беременность которых в исходе осложнилась рождением маловесных к сроку гестации детей, с группой женщин, роды которых завершились рождением здоровых детей с нормальными антропометрическими показателями, был проведен углубленный анализ полученных результатов. Приняв во внимание срок манифестации, авторами было проведено разделение основной группы на раннюю и позднюю формы, и получены данные о статистически значимом снижении уровня вфДНК при ранней форме задержки роста плода по сравнению с поздней и физиологически протекающей беременностью [81]. Интересными представляются результаты работы J. Carrara et al., которые изучили не только диагностическую значимость вфДНК при беременности с высоким риском хромосомной патологии, но и предиктивную ценность данного биомаркера в отношении различных осложнений беременности [283]. Результаты исследования подтвердили высокую чувствительность и специфичность определения вфДНК при хромосомных аномалиях плода, а также показали, что низкая фетальная фракция была связана с рождением детей с массой ниже 5-ого перцентиля (OR=0,87, 95% ДИ 0,79–0,96, p=0,006) [283].

Концепция о плацентарном происхождении вфДНК является общепринятой и находит подтверждение во многих исследованиях [69; 156; 185; 190; 214; 206; 209; 212; 226; 219; 237]. Так, В. Huppertz et al. было показано, что плацента характеризуется последовательными процессами пролиферации и дифференцировки цитотрофобласта, которые

сопровождаются апоптозом его клеток [114]. Проведенные авторами *in vitro* исследования легли в основу предположения о выделении вфДНК в материнский кровоток в результате формирования синцитиотрофобласта. В дальнейшем С. Litton et al. подтвердили, что основным источником данного биомаркера служат клетки трофобластического происхождения [189]. В настоящее время, известно, что клетки трофобласта выделяют в материнский кровоток вфДНК в виде фрагментов из 160–170 пар оснований [215].

Следуя постулату о связи между уровнем вфДНК и развитием плацентарной дисфункции, вызывает интерес изучение плаценты, которая претерпевает каскад изменений, вызванных воздействием различных регуляторных механизмов. Нами было проведено исследование морфометрических показателей и гистологических особенностей плаценты. Результаты исследования показали сильную прямую корреляционную связь между концентрацией вфДНК и массой плаценты ($r=0,79$; $p<0,001$) и послужили одним из косвенных подтверждений плацентарного происхождения вфДНК. При иммунофлуоресцентном анализе плацент в группе ранней формы задержки роста плода было обнаружено выраженное нарушение архитектоники с превалированием обширных аваскулярных зон за счет межворсинчатого фибриноида, а также нарушением дифференцировки ворсин. В гипоплазированных ворсинах наряду с облитерацией сосудов отмечалось доминирование стромального компонента. На ранних сроках физиологической беременности клетки трофобласта подвергаются процессам пролиферации и дифференцировки, в результате которых за счет клеток интерстициального трофобласта происходит инвазия спиральных и радиальных артерий миометрия. Данные клетки обладают набором матричных белков, обеспечивающих инвазивные свойства и ремоделирование сосудов [99]. Помимо интерстициального цитотрофобласта важное значение при нормальном развитии плаценты имеет эндovasкулярный цитотрофобласт. Инвазия последнего происходит с формированием цитотрофобластических «пробок» [73]. При этом мышечные

и эластические компоненты сосудистой стенки подвергаются лизису и полному замещению фибриноидом, который является специфическим белком для эндоваскулярного цитотрофобласта [158; 159; 160]. Описанная гестационная трансформация путем увеличения маточного кровотока обеспечивает растущие энергетические потребности плода [224]. Задержка формирования внутрисосудистых цитотрофобластических «пробок», а значит и неполноценная инвазия цитотрофобласта, приводит к усиленной скорости материнского кровотока и, как следствие, разрушению терминальных ворсин. При этом наблюдается нарушение баланса между процессами пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, увеличению отложений фибрина в ворсинах трофобласта. При этом, несмотря на кажущееся усиление апоптоза в плаценте, клетки цитотрофобласта не подвергаются компенсаторному увеличению их количества. Важным следствием данных процессов является не только ограничение функционального слоя плаценты, но и уменьшение ее массы [238]. Как известно, синцитиотрофобласт, который непрерывно покрывает ворсинчатое дерево, обладает не только уникальными свойствами продукции плацентарных белков [75; 76; 77; 78], но и является основным источником депортируемых фрагментов трофобласта [22], экстраклеточных везикул [259; 260], а также внеклеточной фетальной ДНК. Описанные нами патологические изменения в плацентах при ранней форме задержки роста плода характерны для мальперфузии [21] и выражаются в уменьшении функционального слоя плаценты, что приводит к снижению обменных процессов между матерью и плодом, а также является одним из предполагаемых механизмов снижения уровня вфДНК.

В исследованиях М.А. Clapp et al. с применением многовариантных логистических регрессий была подтверждена взаимосвязь между низким уровнем вфДНК и риском рождения маловесных к сроку гестации детей [193]. 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.

Наше исследование показало, что 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. Полученные данные о высокой диагностической значимости вфДНК в отношении ранней формы задержки роста плода обосновывают перспективность применения вфДНК в качестве важного прогностического маркера задержки роста плода с I триместра беременности.

Согласно результатам исследования Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), проведенным J. Villar et al. преэклампсия в сочетании с задержкой роста плода по сравнению с другими гипертензивными расстройствами ассоциирована с увеличением длительности пребывания женщин в отделении интенсивной терапии, а также высоким риском ранней неонатальной смерти [96]. При этом было показано, что неблагоприятные перинатальные исходы находятся в прямой зависимости от массы новорожденного и срока гестации [96]. В другом исследовании E.V. Carter et al. проводилось сравнение исходов беременности при задержке роста плода и в случае присоединения к ней тяжелой преэклампсии. Анализ данных показал, что в первой группе отмечались наиболее неблагоприятные материнские и неонатальные исходы [167]. Согласно другому когортному ретроспективному исследованию были получены данные о том, что частота неонатальной смерти при ранней форме задержки роста плода составила 8% и была ассоциирована с наличием и тяжестью гипертензивных расстройств у матери [187]. Эти данные подтверждают важность изучения не только отдельных патологических состояний, но и их сочетания, которое часто вызывает более неблагоприятные перинатальные исходы.

В связи с вышеизложенным большой интерес представляло изучение вфДНК при сочетании задержки роста плода и преэклампсии, для чего в исследование была включена дополнительная группа пациенток ($n=32$), разделенная на две подгруппы: беременных с нарушением фето-плацентарного кровотока ($n=20$) и беременных с нормальными доплерометрическими показателями ($n=12$). Было отмечено статистически значимо более высокое значение вфДНК при сочетании задержки роста плода и преэклампсии, которое составило 2440,15 (1456,24;3696,56) ГЕ/мл и во многом превышало данный показатель в группе сравнения (211,05 (133,64; 567,81) ГЕ/мл, $p<0,001$).

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей [191; 198; 233]. M.S. Alberry и et al. провели исследование уровня вфДНК при таких плацента-ассоциированных осложнениях беременности, как преэклампсия и задержка роста плода, и показали значительное повышение уровня данного маркера при этих патологиях [233]. В работе D.W. Kwak et al., направленной на оценку прогностической значимости вфДНК при различных патологических состояниях беременности, были получены данные о повышении уровня данного маркера у женщин, беременность которых впоследствии осложнилась преэклампсией, а также ее сочетанием с задержкой роста плода, что также согласуется с нашими данными [198].

Как известно, доплерометрическое исследование маточно-плацентарного и фето-плацентарного кровотока играет важную роль не только в диагностике ранней и поздней форм задержки роста плода, но и прогнозе перинатальных исходов [50; 51; 67; 187; 221]. Несмотря на то, что доплерометрические показатели являются одними из важнейших в оценке состояния плода, в настоящее время актуальной проблемой остается разработка их общепринятых референсных значений [187]. Отсутствие в мировой практике единых референсных показателей оказывает существенное влияние на эффективность клинических протоколов по ведению беременных с задержкой роста плода [187]. Из этого следует, что внедрение в

клиническую практику неинвазивных маркеров в качестве дополнения к инструментальным и функциональным методам исследования, является важной задачей акушерства, что связано с их потенциальной ролью в улучшении перинатальных исходов. Для уточнения значения вфДНК в улучшении антенатальной диагностики состояния плода нами была проведена оценка ее уровня при преэклампсии и задержке роста плода в зависимости от результатов доплерометрии. Концентрация вфДНК при наличии доплерометрических нарушений составила 2272,12 (1096,09; 4928,23) ГЕ/мл, а при их отсутствии – 2712,31 (1608, 25; 2800,17) ГЕ/мл. С целью оценки диагностической значимости определения вфДНК при сочетании данных осложнений беременности с нормальными показателями фето-плацентарного кровотока был проведен ROC-анализ, который показал, что количественное определение вфДНК при пороговом значении 1608,23 ГЕ/мл с высокой чувствительностью (80,1%) и специфичностью (89,4%) (AUC=0.89, 95%, ДИ 0,70-1,0) позволяет диагностировать задержку роста плода при ее сочетании с преэклампсией даже при отсутствии доплерометрических нарушений. Полученные результаты согласуются с многочисленными исследованиями в данной области [11, 12, 13, 14].

Принимая во внимание непосредственное влияние плацентарных нарушений на уровень вфДНК, нами было проведено изучение плацент при сочетании задержки роста плода и преэклампсии. Гистохимическое исследование с применением терминального дезоксиуридинового мечения концов (TUNEL-метод) показало выраженный апоптоз не только клеток трофобласта ворсин всех генераций, но также стромы створовых ворсин. При физиологической беременности наблюдался незначительный апоптоз лишь клеток трофобласта зрелых ворсин. Полученные результаты могут служить объяснением значительного повышения концентрации вфДНК при сочетании данных осложнений беременности. Как известно, основным источником данного биомаркера является клеточный дебрис, который образуется в исходе апоптоза клеток трофобласта. Значительное увеличение

концентрации вфДНК при сочетании задержки роста плода и преэклампсии может быть связано с одновременной активацией нескольких патогенетических процессов. Как известно, преэклампсия характеризуется развитием оксидативного и нитрозативного стресса [58; 269], что имеет большое значение в усилении апоптоза в плаценте [105]. Существенный вклад в развитие вышеописанных гистологических изменений также вносит присущая для преэклампсии системная воспалительная реакция [265]. Немаловажным является снижение почечного клиренса в материнском организме при преэклампсии, что может играть роль в снижении элиминации вфДНК [137]. Кроме того, помимо апоптоза другими источниками при сочетании данных патологий могут служить некротические процессы в трофобласте.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали хорошую диагностическую значимость вфДНК не только в отношении ранней формы задержки роста плода, но и при сочетании ее с преэклампсией. Было показано, что повышение уровня вфДНК при сочетании данных осложнений беременности ассоциировано с усилением апоптоза в плаценте и позволяет диагностировать задержку роста плода даже при нормальных доплерометрических показателях, что играет важную роль не только в совершенствовании диагностики, но и улучшении перинатальных исходов.

В последние годы описаны ряд процессов, которые влияя на регуляцию патогенетических механизмов формирования задержки роста плода, способствуют снижению прогностической и диагностической ценности ее потенциальных маркеров. Наиболее изученными являются эпигенетические модификации, представляющие собой экспрессию генов за пределами кодирования в последовательности ДНК. Изучение эпигенома, находящегося на стыке между генетическими и внешними факторами, имеет большое значение в расширении знаний не только об основах формирования задержки роста плода, но и развитии ее отдаленных последствий. Выявленная в конце

XX века D. J. P. Barker ассоциация субоптимального роста плода с развитием сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний в зрелом возрасте легла в основу теории о фетальном программировании, также известной как гипотеза Баркера [33.34.35], изучение которой до настоящего времени не теряет актуальности [36 37 38 48 49]. Кроме того, исследование механизмов эпигенетической регуляции представляется перспективным ввиду их возможного использования для разработки новых терапевтических методов. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов, осуществляющих контроль генной экспрессии, является метилирование в области CpG динуклеотидов в промоторных регионах ДНК [50 51].

Для исследования уровня метилирования был произведен отбор генов с потенциальной ролью в патогенезе задержки роста плода – *CDO1*, *MMP2*, *CEBPA*, *LEP*, *HLAG*, *VEGF*, *MEST*, *CDH1*, *TLR2*, *BMP6*, *GNA12*, *DAPK3*, *DFNA5*, ICR (импринтинг контролирующая область) *IGF2/H19*. Данные гены участвуют в поддержании важнейших процессов для внутриутробного роста плода. Их функции заключаются в регуляции апоптоза [6], метаболических процессов [5], иммунных механизмов [7], жировом обмене [5], ангиогенезе [8], а также клеточной адгезии [9].

Несмотря на исключительную роль плаценты, механизмы ее влияния на развитие человека до настоящего времени остаются малоизученными. Эпигенетические модификации в плаценте во многом отличаются от других биологических тканей в связи с ее уникальным вкладом в обеспечение внутриутробного роста плода. Изучение метилирования профиля генов в плаценте с помощью анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) выявило статически значимые изменения в генах *TLR2* и ICR *IGF2/H19*. Определено 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) ($p<0,001$)).

На следующем этапе было проведено исследование метилирования *TLR2* и импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* в плазме материнской крови, и 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) ($p=0,02$)). 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). Измерение относительного уровня метилирования гена *TLR2* при поздней форме задержки роста плода не выявило статистически значимых различий по сравнению с ранней формой и физиологической беременностью.

Как известно, TLR2 – белок из класса толл-подобных рецепторов, который играет ключевую роль во врожденном иммунитете и патогенезе апоптоза, индуцированного пептидогликаном бактерий [274]. Во время беременности экспрессия данного белка осуществляется не только фибробластами, но и макрофагами (клетки Кащенко-Хофбауэра) [276]. TLR2 определяется в плаценте с ранних сроков беременности и увеличивается в присутствии инфекционных агентов [46; 120]. В многочисленных работах было показано, что активация TLR2 в клетках трофобластах в первом и третьем триместре приводит к выраженной секреции цитокинов и хемокинов. [120; 275]. После связывания TLR2 с лигандами инициируются сигнальные пути, которые обеспечивают запуск системного воспалительного ответа. Первый из них – MyD88 (белок Q88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа) – зависимый путь – активируется после связывания TLR2 с TIR (толл-интерлейкин-1 рецепторным) доменом, содержащим адаптерный белок. В результате происходит последующая стимуляция связанных с ИЛ-1 киназ (IRAK-4), фактора 6, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6) и комплекса киназ класса

IB, которые приводят к высвобождению транскрипционного фактора NFκB (ядерного фактора каппа-B). Следствием активации данного пути является транскрипция генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Другой путь активации обеспечивает проапоптотический эффект TLR2. V.M. Abrahams et al. показали, что клетки трофобласта, экспрессирующие TLR2, подвергаются апоптозу после воздействия бактериального пептидогликана и липотейхоевых кислот [46]. При этом активация TLR2 приводит к индукции апоптоза посредством FADD – Fas-ассоциированного белка с доменом смерти, активации каспаз-3,8,9, а также инактивации XIAP – X-сцепленного ингибитора апоптоза [80; 104; 120]. Интересно, что активация другого члена семейства толл-подобных рецепторов – TLR4 – стимулирует выработку провоспалительных цитокинов клетками трофобласта, что указывает на специфичность проапоптотического эффекта для TLR2 [274]. Эти данные означают, что характер ответа на инфекционный агент зависит от типа толл-подобного рецептора, экспрессируемого на клетках трофобласта. Теми же авторами в другом исследовании было показано, что активация TLR2 в первом триместре беременности способна индуцировать усиление апоптоза клеток трофобласта, и, соответственно, служить причиной развития осложнений беременности [46; 120]. Роль TLR2 в регуляции апоптоза подтвердилась позднее в работах других исследователей [46].

Нормальное развитие плаценты обеспечивается за счет баланса между процессами пролиферации и программируемой клеточной гибели [129]. При физиологическом течении беременности с увеличением ее срока наблюдается усиление апоптоза в плаценте, что связано с изменением активности генетических факторов [150]. Как известно, при задержке роста плода может наблюдаться патологическое усиление апоптоза клеток трофобласта, однако, причины его активации остаются не до конца выясненными [156; 158; 169]. Нами получены данные о том, что при задержке роста плода наблюдается снижение уровня метилирования гена *TLR2*, которое может приводить к усилению экспрессии белка TLR2 и, как

следствие, повышенному апоптозу в плаценте. Патологическое усиление процессов апоптоза с ранних сроков беременности может приводить к нарушению формирования плаценты и, как следствие, развитию задержки роста плода.

Исследование уровня метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* в плазме материнской крови 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), ($p=0,03$). 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 %. Измерение относительного уровня метилирования ICR *IGF2/H19* при поздней форме задержки роста плода не показало статистически значимых различий по сравнению с ранней формой и физиологической беременностью.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на изучении оси «соматотропный гормон – инсулиноподобный фактор роста 1». При этом большое значение имеют эпигенетические модификации, которые регулируют ее функционирование. IGF 1 и 2 являются регуляторными пептидами, которые, находясь в тесной взаимосвязи друг с другом, с ранних сроков беременности участвуют в процессах формирования плаценты и роста плода. I. Martin-Estal et al. показали, что, несмотря на преобладание IGF-2 на внутриутробном этапе, делеция любого гена *IGF* приводит к развитию задержки роста плода [240]. Оба гормона опосредуют стимулирующее действие инсулина и тиреоидных гормонов [95; 105; 127]. В исследовании P. Rotwein была выявлена взаимосвязь между дефицитом инсулина и развитием задержки роста плода, что связано с ролью данного гормона в регуляции обмена глюкозы и аминокислот [246]. За последние десятилетия были изучены биологические эффекты IGF1, которые заключаются в регуляции анаболических, антиоксидантных и противовоспалительных процессов [267]. В связи с наличием нескольких физиологических ролей, активность IGF1

строго контролируется белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста. Данные белки обладают высоким сродством к IGF1 и определяют физиологические концентрации IGF1, путем регуляции его транспорта и распределения в тканях [59]. При этом роль IGF1 преимущественно связана с регуляцией плацентарного транспорта питательных веществ [59; 196; 245], в то время как IGF2 является регуляторным белком процессов пролиферации и дифференцировки [124;152;163]. Большое значение имеет экспрессия IGF2 клетками трофобласта с ранних сроков беременности и его участие в регуляции процессов инвазии вневорсинчатого трофобласта в спиральные артерии [164; 165; 191; 192]. Изменения концентрации IGF2 на любом сроке беременности могут вносить существенный вклад в нарушение нормального формирования плаценты и, как следствие, развитие задержки роста плода. Следовательно, данное осложнение беременности можно рассматривать как состояние дефицита инсулиноподобного фактора роста 2. Одним из механизмов, вовлеченных в нарушение экспрессии IGF2, может быть развитие эпигенетических модификаций.

Геномный импринтинг как один из эпигенетических процессов выражается экспрессией одного из двух аллельных генов, расположенных на отцовской или материнской хромосоме. Молекулярной основой такой моноаллельной экспрессии генов является метилирование их регуляторных областей. Одним из наиболее изученных механизмов, лежащих в основе фетального программирования, является метилирование локуса *IGF2/H19*. Ген *IGF2* и соседняя некодирующая РНК H19 располагаются на коротком плече хромосомы 11. Данный кластер регулируется импринтинг-контролирующей областью, который содержит несколько сайтов связывания для инсуляторного белка CTCF – транскрипционного фактора, связывающего белок цинковых пальцев 11 [109; 110]. На материнской аллели экспрессия гена *IGF2* не представляется возможной в связи с тем, что импринтинг-контролирующая область *IGF2/H19* на материнской копии неметилирована, вследствие чего происходит ее связывание с CTCF и блокирование энхансера

[113; 124]. На отцовской аллели данный регион находится в метилированном состоянии, что приводит к активации энхансера и транскрипции *IGF2* [125]. Полученные нами результаты о снижении уровня метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* при ранней форме задержки роста плода могут быть причиной соответствующего снижения экспрессии *IGF2*, что согласуется с результатами других исследований [245; 249]. Так, D.K. Bourque et al. провели анализ уровня метилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* и показали снижение ее уровня при задержке роста плода [113]. В работе O. Koukoura и et al. были получены аналогичные результаты потери импринтинга *IGF2* в плацентах после родов, осложнившихся рождением малых к сроку гестации детей [191]. Снижение уровня экспрессии *IGF2* в плацентах при задержке роста плода наблюдали и в других исследованиях [254].

В исследовании J. St-Pierre et al. была обнаружена отрицательная корреляция между уровнем метилирования *IGF2* и массой новорожденных, что послужило основой для следующего этапа нашего исследования [164]. Для оценки влияния внутриутробно сформированных эпигенетических механизмов на новорожденного было проведено определение уровня метилирования ICR *IGF2/H19* в пуповинной крови с помощью пиросеквенирования, который составил 42 (38,5;45) % при задержке роста плода, что было ниже значений в группе сравнения (45,5 (41,75;48,5) %, ($p=0,02$). Снижение уровня метилирования импринтинг-контролирующей области *IGF2/H19* вероятно приводит к снижению экспрессии гена *IGF2* и, как следствие, уменьшению концентрации циркулирующего белка *IGF2*. Данные изменения могут быть причиной торможения регулируемых *IGF2* многочисленных метаболических путей, имеющих первостепенное значение для роста плода [39]. Важность *IGF2* в антенатальном периоде неоспорима, что подтверждается многочисленными исследованиями, демонстрирующими снижение его уровня при задержке роста плода [113; 124; 191; 25]. Большое интерес представляет исследование Y. Xing et al, в котором была показана

взаимосвязь между уровнем IGF-2 в плаценте и развитием опережающих скачков роста у маловесных к сроку гестации детей на первом, третьем и шестом месяце жизни и подтверждена. авторы подтвердили высокое прогностическое значение определения данного белка не только в отношении задержки роста плода, но и ее отдаленных последствий [47].

Полученные результаты согласуются с многочисленными исследованиями, согласно которым дети, рожденные с ограничением внутриутробного роста, входят в группу риска по развитию кардиометаболических заболеваний в зрелом возрасте. Кроме того, были получены данные о связи эпигенетических изменений, а именно гипометилирования импринтинг контролирующей области *IGF2/H19* на отцовской аллели хромосомы 11, с развитием наследственных заболеваний, которые характеризуются выраженной задержкой роста в постнатальном периоде. 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.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования были уточнены новые звенья патогенеза задержки роста плода, а именно роль нарушений эпигенетической регуляции процессов апоптоза и пролиферации в формировании задержки роста плода, а также выделены 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.

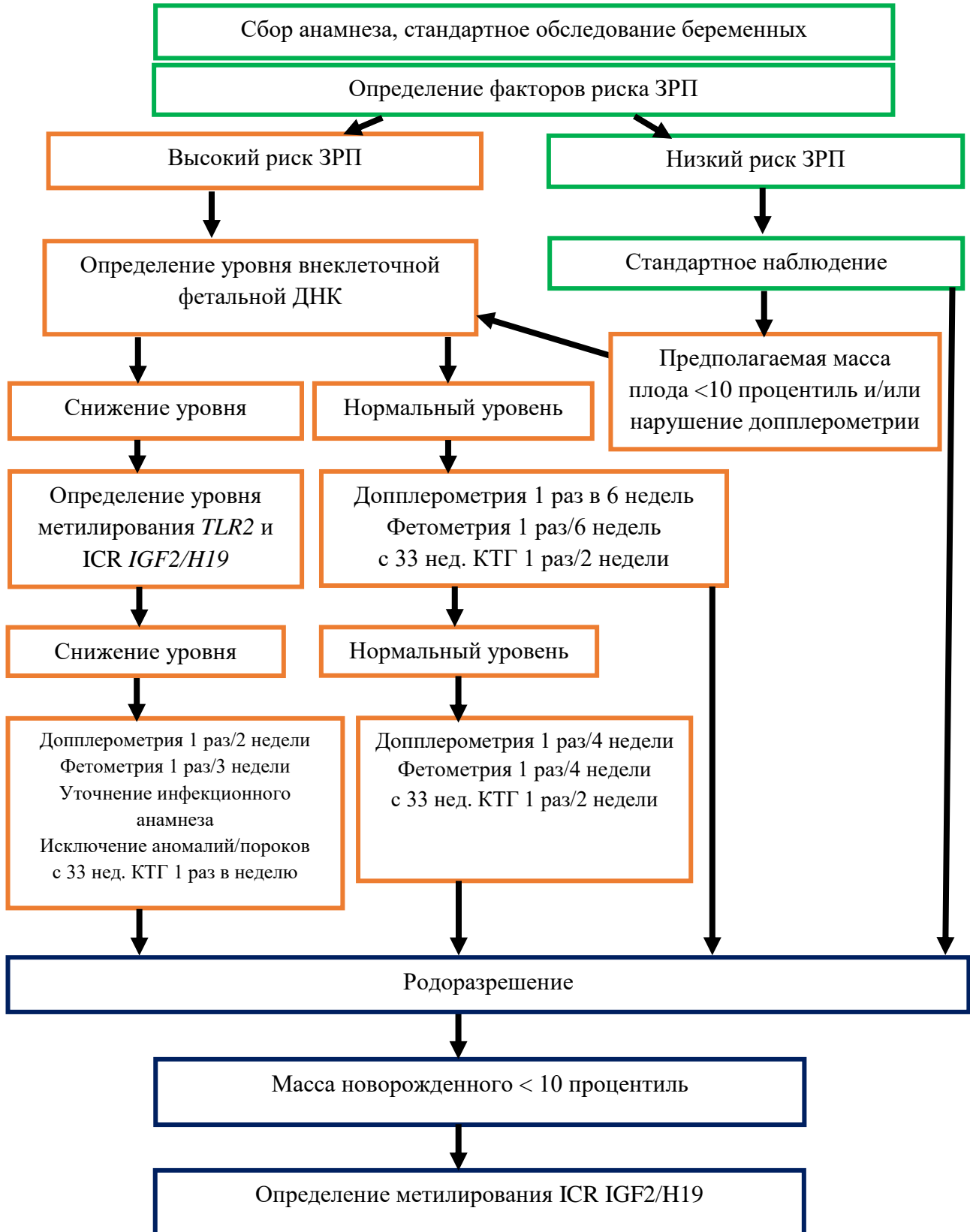
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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, что определяет выбор акушерской тактики.

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

Алгоритм диагностики задержки роста плода



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФС	антифосфолипидный синдром
β -ХГЧ	бета-хорионический гонадотропин человека
вфДНК	внеклеточная фетальная ДНК
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗРП	задержка роста плода
ИМТ	индекс массы тела
ОЖ	окружность живота
ПИ	пульсационный индекс
ПМП	предполагаемая масса плода
РДС	респираторный дистресс-синдром
УЗИ	ультразвуковое исследование
ЦПО	церебро-плацентарное отношение
ACOG	Американский колледж акушеров и гинекологов
ADAM-12	металлопротеаза 12
ADMA	асимметричный диметиларгинин

AUC	площадь под кривой
CTCF	фактор, связывающийся с последовательностью CCCTC
DAMP	молекулярные фрагменты ассоциированные с повреждением
DYS14	специфичный для Y-хромосомы ген, кодирующий белок TSPY1
DYZ3	специфичный для Y-хромосомы ген
FADD	Fas-белок, ассоциированный с доменом смерти
ICR	импринтинг контролирующая область
IGF	инсулиноподобный фактор роста
miRNA	малые некодирующие РНК
MLKL	псевдокиназа смешанного происхождения
MS-HRM	анализ кривых плавления с высоким разрешением
MyD88	белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа
NFkB	ядерный фактор каппа-B
NGS	секвенирования второго поколения
PAPP-A	ассоциированный с беременностью протеин А плазмы
PlGF	плацентарный фактор роста

PP-13	плацентарный белок 13
RASSF1A	Ras - ассоциированный домен семейства 1 изоформа A
RIPK 1 и 3	протеинкиназы 1 и 3, взаимодействующие с белком
sFLt-1	растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1
sICAM-1	растворимая межклеточная молекула адгезии
SIRT 2	NAD-зависимая деацетилаза сиртуин 2
SOGC	Канадское общество акушеров и гинекологов
TIR-домен	Toll-IL1 рецепторный домен толл-интерлейкин 1 рецепторный домен
TLR	Толл-подобный рецептор
	TRAF6 - фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
XIAP	X-сцепленный ингибитор апоптоза

Список литературы

1. Ажибеков С.А. Роль генетически детерминированных особенностей энергетического обмена в формировании плацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки роста плода / Ажибеков С.А., Путилова Н.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А. // *Акушерство и гинекология* – 2016. – Т. 11 – С.11–15.
2. Акушерство. Национальное руководство. (Серия «Национальные руководства») / Под редакцией Э.К. Айламазяна, В.И. Кулакова, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014
3. Антенатальное метаболическое и эндокринное программирование при беременности высокого риска / А. Н. Стрижаков, И. В. Игнатко, Ш. Ш. Байбулатова, И. И. Богомазова // *Акушерство и гинекология*. – 2016. – Т. 10. – С. 39-47.
4. Гугушвили, Н.А. Клинико-патогенетическое обоснование тактики ведения беременности и родов при задержке роста плода / Н.А. Гугушвили – 2014. – С. 24.
5. Игнатко, И. В. Дифференциальная диагностика ранней и поздней форм синдрома задержки развития плода / И. В. Игнатко, Ю. В. Денисова, Ю. А. Филиппова, А. О. Дубинин, А. О. // *Уральский медицинский журнал*. – 2020. – №. 12. – С. 91-97.
6. Изменение концентрации внеклеточной ДНК во время беременности / А. О. Карапетян, А. М. Красный, А. А. Садекова [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2018. – №. 3. – С. 44-50.
7. Исследование уровня метилирования гена RASSF1 в плазме и опухоли при раке эндометрия / А. М. Красный, А. А. Садекова, Н. Е. Волгина [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019. – Т. 167. – №. 2. – С. 223-227.
8. Дегтярева Е.А. Эффективность прогнозирования и ранней диагностики задержки роста плода / Дегтярева Е.А., Захарова О.А., Куфа

М.А., Кантемирова, М.Г. Радзинский В.Е. // Российский вестник перинатологии и педиатрии – 2018. – Т. 63 – No 6 – С.37–45.

9. Долгушина Н.В. Роль детоксикационной терапии в профилактике задержки роста плода / Долгушина Н.В., Казанцева Е.В., Терешков П.П., Пивоварова Л.В. // Гинекология – 2016. – Т. 18 – No 2 – С.19–23.

10. Долгушина В.Ф. Особенности анамнеза, течения беременности и исходы родов при задержке роста плода в сочетании с преэклампсией / Долгушина В.Ф., Фартунина Ю.В., Вереина Н.К., Надвикова Т.В., Коляда Е.В., Филиппова Н.А. // Уральский медицинский журнал – 2020. – Т. 3 – No 186 – С.164–168.

11. Забанова Е.А. МикроРНК регуляция в генезе задержки роста плода / Забанова Е.А., Кузнецова Н.Б., Шкурят Т.П., Бутенко Е.В. // Акушерство и гинекология – 2019. – No 12 – С.5–11.

12. Замалеева Р.С. Состояние проблемы лечения и прогнозирования задержки развития плода / Замалеева Р.С., Мальцева, Л.И. Черепанова Н.А., Фризина А.В., Лазарева В.К., Юпатов Е.Ю., Коган Я.Э., Фаттахова Ф.А. // Практическая медицина – 2016. – No 1 – С.41–44.

13. Задержка роста плода: современные подходы к диагностике и ведению беременности / М. Е. Железова, Т. А. Зефирова, С. С. Канюков // Практическая медицина. – 2019. – Т. 17. – №. 4.

14. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели / Э.К. Айламазян [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук.-2013.- No 11.- С.12-21.

15. Ковалев, В. В. Большие акушерские синдромы: "гордиев узел" генных сетей / В. В. Ковалев, Е. В. Кудрявцева, Н. М. Миляева, С. Р. Беломестнов // Уральский медицинский журнал. – 2018. – №. 13. – С. 40-47.

16. Краснопольский, В.И. Клиническая, ультразвуковая и морфологическая характеристика хронической плацентарной

недостаточности / В.И. Краснопольский, Л.С. Логутова, В.А. Туманова // *Акушерство и гинекология.* – 2006. – № 1. – С. 13-16.

17. Макаров, И. О. Задержка роста плода. Врачебная тактика / И. О. Макаров, Е. В. Юдина, Е. И. Боровкова // М.: МЕДпрессинформ. – 2012.

18. Макацария, А. Д. Плацентарная недостаточность при осложненной беременности и возможности применения дипиридамола / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе, Д. Х. Хизроева, Н. М. Хамани // *Акушерство, гинекология и репродукция.* – 2016. – Т. 10. – №. 4.

19. Малая масса тела новорожденных: сочетанное влияние полиморфизмов генов глутатион-S-трансферазы (GST) и пренатальной экспозиции к кадмию и свинцу / Е. В. Казанцева, Н. В. Долгушина, А. Е. Донников [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2014. – №. 10. – С. 72-80.

20. Мглинец В.А., Левина Л.Я., Константинова Л.М. Геномный импринтинг и синдромы Прадера-Вилли и Энджельмена // *Генетика.* 1996. Т.32. № 12. С. 1605-1615.

21. Метаболомный профиль беременных при задержке роста плода / Н. Е. Кан, З. В. Хачатрян, Э. Ю. Амирасланов [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2019. – №. 12. – С. 57-63

22. Милованов, А. П. Депортированный синцитиотрофобласт и плацентарные микрочастицы в организме матери при нормальной беременности и преэклампсии (28 лет спустя) / А. П. Милованов, И. Н. Волощук // *Архив патологии.* – 2017. – Т. 79. – №. 1. – С. 61-67.

23. Мурашко, А.В. Гемостазиологические показатели у беременных женщин с артериальной гипертензией и синдромом задержки развития плода / А. В. Мурашко, М. С. Симонова, А. Г. Горюнова // *Архив акушерства и гинекологии им. ВФ Снегирева.* – 2018. – Т. 5. – №. 1.

24. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг методом высокопроизводительного секвенирования у беременных с акушерской патологией / Г. Т. Сухих, Н. К. Тетрашвили, Д. Ю. Трофимов, Д. [и др.] // *Доктор. Ру. Гинекология эндокринология.* – 2017. – №. 3. – С. 11-15.

25. Красный, А. М. Роль метилирование ДНК в развитии и заболеваниях человека / А. М. Красный // *Medica mente. Лечим с умом.* – 2016. – №. 2. – С. 9-10.
26. Орлов А.В. Этиопатогенетические аспекты развития плацентарной недостаточности и задержки роста плода / Орлов А.В., Кудинова Е.И. // *Журнал фундаментальной медицины и биологии* – 2016. – No 4 – С.4–8.
27. Охупкин, М.Б. Внутриутробная задержка роста плода / М.В. Охупкин, М.Б., Хитров // *АГ-Инфо (Журнал российской ассоциации акушеров-гинекологов.* – 2008. – С. 29-33.
28. Прогнозирование преждевременных родов путем комбинированного определения цитокинов и внеклеточной ДНК / А. И. Красный, Н. Е. Кан, В. Л. Тютюнник [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2019. – №. 1. – С. 86-91.
29. Прогнозирование синдрома задержки роста плода у беременных высокого риска / А. Н. Стрижаков, М. И. Мирющенко, И. В. Игнатко [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2017. – №. 7. – С. 34-44
30. Прогнозирование задержки роста плода у беременных с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / Н. Е. Кан, Э. Ю. Амирасланов, В. Л. Тютюнник [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2014. – №. 10. – С. 22-26.
31. Пролапс митрального клапана у беременных: акушерские риски и тактика ведения / И. В. Игнатко, Л. А. Стрижаков, А. Л. Мартиросова [и др.] // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2017. – Т. 16. – №. 1. – С. 55-63.
32. Роль Toll-like рецепторов 2, 4, 9-го типов в эндометрии при хроническом эндометрите / Е. А. Коган, Н. А. Гомболевская, Т. А. Демура [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2015. – №. 12. – С. 81-88.

33. Роль импринтинга генов при внутриутробной задержке роста плода / Е. И. Дегтярева, О. И. Григорян, Н. Н. Волеводз [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2015. – №. 12. – С. 5-10.
34. Роль полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в формировании задержки роста плода / В. Л. Тютюнник, Н. Е. Кан, Д. А. Мантрова [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2018. – №. 12. – С. 23-28.
35. Синдром задержки роста плода: клинико-морфологические аспекты / П.Г. Ларина, Е.Б., Мамедов, Н.Н., Нефедова [и др.] // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2013. – С. 22-27.
36. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом секвенирования внеклеточной ДНК. Современный взгляд на проблему / Н. К. Тетрашвили, Н. Г. Парсаданян, Н. И. Федорова [и др.] // *Научно-практический журнал.* – 2014.
37. Малая масса тела новорожденных: сочетанное влияние полиморфизмов генов глутатион-S-трансферазы (GST) и пренатальной экспозиции к кадмию и свинцу / Е. В. Казанцева, Н. В. Долгушина, А. Е. Донников [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2014. – №. 10. – С. 72-80.
38. Сидорова, И. С. *Акушерство: руководство для практикующих врачей* / И. С. Сидорова. - М. : МИА, 2013. - 1048 с. (618.2(035) С 34).
39. Синдром задержки роста плода / А. Н. Стрижаков, И. В. Игнатко, Е. В. Тимохина // – ГЭОТАР-Медиа, 2013.
40. Стрижаков, А. Н. и др. Антенатальное метаболическое и эндокринное программирование при беременности высокого риска / А. Н. Стрижаков, И. В. Игнатко, Ш. Ш. Байбулатова, И. М. Богомазова // *Акушерство и гинекология.* – 2016. – Т. 10. – С. 39-47.
41. Ультраструктурные и иммуногистохимические особенности плаценты при преэклампсии в сочетании с задержкой роста плода. Низяева Н.В., Амирасланов Э.Ю., Ломова Н.А., Павлович С.В., Савельева Н.А., Наговицына М.Н., Сухачёва Т.В., Серов Р.А., Щеголев А.И., Кан Н.Е.

42. Ходжаева, З. С. Ацетилсалициловая кислота в профилактике преэклампсии и ассоциированных акушерских и перинатальных осложнений / З. С. Ходжаева, А. С. Холин, В. С. Чулков, К. Т. Муминова, К // Акушерство и гинекология. – 2018. – Т. 8. – С. 12-8.

43. Холин, А. М. Патологическая плацентация и прогнозирование преэклампсии и задержки роста плода в первом триместре / А. М. Холин, З. С. Ходжаева, А. И. Гус // Акушерство и гинекология. – 2018. – №. 5. – С. 12-19.

44. Щеголев, А. И. Клиническая значимость поражений плаценты / А. И. Щеголев, В. Н. Серов // Акушерство и гинекология. – 2019. – №. 3. – Р. 54-62.

45. Ярыгина, Т. А. Повышение эффективности ультразвуковой диагностики в прогнозировании рождения маловесного для гестационного возраста доношенного ребенка / Т. А. Ярыгина, Р. С. Батаева, А. И. Гус // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2020. – Т. 2. – С. 34.

46. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells / V. M. Abrahams, I. Visintin, P. B. Aldo [et al.] // The Journal of Immunology. – 2005. – Vol. 175. – №. 12. – P. 8096-8104.

47. Abundances of placental imprinted genes CDKN1C, PHLDA2 and IGF-2 are related to low birth weight and early catch-up growth in full-term infants born small for gestational age / Y. Xing, H. Liu, Y. Cui [et al.] // PloS one. – 2019. – Vol. 14. – №. 6. – P. e0218278.

48. Adverse perinatal outcomes are more frequent in pregnancies with a low fetal fraction result on noninvasive prenatal testing / I. Krishna, M. Badell, T. L. Loucks [et al.] // Prenatal diagnosis. – 2016. – Vol. 36. – №. 3. – P. 210-215.

49. Alexander, B. T. Fetal programming and cardiovascular pathology / B. T. Alexander, J. H. Dasinger, S. Intapad // Comprehensive Physiology. – 2011. – Vol. 5. – №. 2. – P. 997-1025.

50. Alfirevic, Z. Fetal and umbilical Doppler ultrasound in high-risk pregnancies / Z. Alfirevic, T. Stampalija, T. Dowswell // Cochrane database of systematic reviews. – 2017. – №. 6.
51. Alfirevic, Z. Fetal and umbilical Doppler ultrasound in highrisk pregnancies. / Z. Alfirevic, T. Stampalija, G. M. Gyte // cochrane Database Syst Rev 2010. – 2013.
52. Alteration of the Bcl-2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds / M. D. L. L. De Falco, L. De Luca, F. Acanfora [et al.] // The Histochemical Journal. – 2001. – Vol. 33. – №. 7. – P. 421-425.
53. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae / L. Guo, S. Choufani, J. Ferreira [et al.] // Developmental biology. – 2008. – Vol. 320. – №. 1. – P. 79-91.
54. American College of Obstetricians and Gynecologists et al. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction //Obstetrics and gynecology. – 2013. – Vol. 121. – №. 5. – P. 1122.
55. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing / H. C. Fan, Y. J. Blumenfeld, U. Chitkara [et al.] // Clinical chemistry. – 2010. – Vol. 56. – №. 8. – P. 1279-1286.
56. Ananth, C. V. Distinguishing pathological from constitutional small for gestational age births in population-based studies / C. V. Ananth, A. M. Vintzileos // Early human development. – 2009. – Vol. 85. – №. 10. – P. 653-658.
57. Andraweera, P. H. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes / P. H. Andraweera, G. A. Dekker, C. T. Roberts // Human reproduction update. – 2012. – Vol. 18. – №. 4. – P. 436-457.
58. Aouache, R. Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases / R. Aouache, L. Biquard, D. Vaiman, F. Miralles // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – №. 5. – P. 1496.

59. Arroba, A. I. IGF-1, inflammation and retinal degeneration: a close network / A. I. Arroba, A. Campos-Caro, M. Aguilar-Diosdado, A. M. Valverde // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2018. – Vol. 10. – P. 203.
60. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia / D. L Rolnik, F. da Silva Costa, T. J. Lee [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2018. – Vol. 52. – №. 6. – P. 722-727.
61. Association of fetal-derived hypermethylated RASSF1A concentration in placenta-mediated pregnancy complications / M. J. Kim, S. Y. Kim, S. Y. Park [et al.] // *Placenta*. – 2013. – Vol. 34. – №. 1. – P. 57-61.
62. Association of low CD4 cell count and intrauterine growth retardation in Thailand / J. Cailhol, G. Jourdain, S. Le Coeur [et al.] // *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2009. – Vol. 50. – №. 4. – P. 409-413.
63. Athapathu, H. A study of the incidence of apoptosis in the human placental cells in the last weeks of pregnancy / H. Athapathu, M. A. J. Jayawardana, L. Senanayaka // *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2003. – Vol. 23. – №. 5. – P. 515-517.
64. Barker, D. J. P. Adult consequences of fetal growth restriction / D. J. P. Barker // *Clinical obstetrics and gynecology*. – 2006. – Vol. 49. – №. 2. – P. 270-283.
65. Barker, D. J. P. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales / D. J. P. Barker, C. Osmond // *The Lancet*. – 1986. – Vol. 327. – №. 8489. – P. 1077-1081.
66. Barker, D. J. P. Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review / D. J. P. Barker, K. L. Thornburg // *Placenta*. – 2013. – Vol. 34. – №. 10. – P. 841-845.
67. Baschat, A. A. Doppler application in the delivery timing of the preterm growth-restricted fetus: another step in the right direction / A. A. Baschat // *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the*

International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2004. – Vol. 23. – №. 2. – P. 111-118.

68. Bianchi, D. W. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential—a review / D. W. Bianchi // *Placenta*. – 2004. – Vol. 25. – P. S93-S101.

69. Bianchi, D. W. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid / D. W. Bianchi, E. S. LeShane, J. M. Cowan // *Clinical chemistry*. – 2001. – Vol. 47. – №. 10. – P. 1867-1869.

70. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976 / J. W. Rich-Edwards, M. J. Stampfer, J. E. Manson [et al.] // *Bmj*. – 1997. – Vol. 315. – №. 7105. – P. 396-400.

71. Bischoff, F. Z. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure / F. Z. Bischoff, D. E. Lewis, J. L. Simpson // *Human reproduction update*. – 2005. – Vol. 11. – №. 1. – P. 59-67.

72. Boghossian, N. S. Morbidity and mortality in small for gestational age infants at 22 to 29 weeks' gestation / N. S. Boghossian, M. Geraci, E. M. Edwards, J. D. Horbar // *Pediatrics*. – 2018. – Vol. 141. – №. 2.

73. Boyd J. D. The human placenta / J. D. Boyd, W. J. Hamilton // – Heffer, 1970. – Vol. 212.

74. Breveglieri, G. Non-invasive prenatal testing using fetal DNA / G. Breveglieri, E. D'Aversa, A. Finotti, M. Borgatti // *Molecular Diagnosis & Therapy*. – 2019. – Vol. 23. – №. 2. – P. 291-299.

75. Burton, G. J. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction / G. J. Burton, E. Jauniaux // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2018. – Vol. 218. – №. 2. – P. S745-S761.

76. Burton, G. J. Placental origins of chronic disease / G. J. Burton, A. L. Fowden, K. L. Thornburg // *Physiological reviews*. – 2016. – Vol. 96. – №. 4. – P. 1509-1565.

77. Burton, G. J. Placental origins of chronic disease / G. J. Burton, A. L. Fowden, K. L. Thornburg // *Physiological reviews*. – 2016. – Vol. 96. – №. 4. – P. 1509-1565.

78. Burton, G. J. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta / G. J. Burton, C. J. P. Jones // *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2009. – Vol. 48. – №. 1. – P. 28-37.

79. Cell free DNA: revolution in molecular diagnostics—the journey so far / K. Nandi, R. Verma, R. Dawar [et al.] // *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 41. – №. 1.

80. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection / Y. Ma, G. Krikun, V. M. Abrahams [et al.] // *Placenta*. – 2007. – Vol. 28. – №. 10. – P. 1024-1031.

81. Cell-free DNA (cfDNA) fetal fraction in early-and late-onset fetal growth restriction / D. Morano, S. Ross, C. Lapucci [et al.] // *Molecular diagnosis & therapy*. – 2018. – Vol. 22. – №. 5. – P. 613-619.

82. Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies / W. Stein, S. Müller, K. Gutensohn [et al.] // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2013. – Vol. 166. – №. 1. – P. 10-13.

83. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction / A. Sekizawa, M. Jimbo, H. Saito [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2003. – Vol. 188. – №. 2. – P. 480-484.

84. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum / A. Sekizawa, Y. Sugito, M. Iwasaki [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2001. – Vol. 47. – №. 12. – P. 2164-2165.

85. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia / S. Hahn, C. Rusterholz, I. Hösli [et al.] // *Placenta*. – 2011. – Vol. 32. – P. S17-S20.

86. Cetin, I. Maternal predictors of intrauterine growth restriction / I. Cetin, C. Mandò, S. Calabrese // *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2013. – Vol. 16. – №. 3. – P. 310-319.

87. Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy / T. Wataganara, A. Y. Chen, E. S. LeShane [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2005. – Vol. 51. – №. 1. – P. 217-219.

88. Cheng, S. B. Maternal-fetal cross talk through cell-free fetal DNA, telomere shortening, microchimerism, and inflammation / S. B. Cheng, S. Davis, S. Sharma // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2018. – Vol. 79. – №. 5. – P. e12851.
89. Chitty, L. S. Noninvasive prenatal screening for genetic diseases using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA / Y. M. D. Lo, L. S. Chitty // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2015. – Vol. 5. – №. 9. – P. a023085.
90. Choi, J. J. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells / J. J. Choi, C. F. Reich III, D. S. Pisetsky // *Immunology*. – 2005. – Vol. 115. – №. 1. – P. 55-62.
91. Christians, J. K. Associations between imprinted gene expression in the placenta, human fetal growth and preeclampsia / J. K. Christians, K. Leavey, B. J. Cox // *Biology letters*. – 2017. – Vol. 13. – №. 11. – P. 20170643.
92. Chronic hypertension in pregnancy / A. N. Battarbee, R. G. Sinkey, L. M. Harper [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2019.
93. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto-and syncytio-trophoblastic cells. Case report / E. Flori, B. Doray, E. Gautier [et al.] // *Human reproduction*. – 2004. – Vol. 19. – №. 3. – P. 723-724.
94. Circulating maternal total cell-free DNA, cell-free fetal DNA and soluble endoglin levels in preeclampsia: predictors of adverse fetal outcome? A cohort study / R. M. AbdelHalim, D. I. Ramadan, R. Zeyada [et al.] // *Molecular diagnosis & therapy*. – 2016. – Vol. 20. – №. 2. – P. 135-149.
95. Clinical impact of Doppler reference charts on management of small-for-gestational-age fetuses: need for standardization / S. Ruiz-Martinez, A. T. Papageorghiou, E. Staines-Urias [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: the Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 56. – №. 2. – P. 166-172.
96. Conde-Agudelo, A. Novel biomarkers for predicting intrauterine growth restriction: a systematic review and meta-analysis / A. Conde-Agudelo, A.

T. Papageorghiou, S. H. Kennedy, J. Villar // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. – 2013. – Vol. 120. – №. 6. – P. 681-694.

97. Conrad, M. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities / M. Conrad, J. P. F. Angeli, P. Vandenabeele, B. R. Stockwell // *Nature reviews Drug discovery*. – 2016. – Vol. 15. – №. 5. – P. 348.

98. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure / S. J. Gordijn, I. M. Beune, B. Thilaganathan [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2016. – Vol. 48. – №. 3. – P. 333-339.

99. Contro, E. Cell-free fetal DNA for the prediction of pre-eclampsia at the first and second trimesters: a systematic review and meta-analysis / E. Contro, D. Bernabini, A. Farina // *Molecular diagnosis & therapy*. – 2017. – Vol. 21. – №. 2. – P. 125-135.

100. Corneal higher-order aberrations in infectious keratitis / E. Shimizu, T. Yamaguchi, Y. Yagi-Yaguchi [et al.] // *American journal of ophthalmology*. – 2017. – Vol. 175. – P. 148-158.

101. Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum / Y. Ohashi, N. Miharu, H. Honda [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2002. – Vol. 48. – №. 2. – P. 386-388.

102. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies / M. Smid, S. Galbiati, A. Lojacono [et al.] // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. – 2006. – Vol. 26. – №. 9. – P. 785-790.

103. Costa, J. M. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders / J. M. Costa, A. Benachi, E. Gautier // *New England Journal of Medicine*. – 2002. – Vol. 346. – №. 19. – P. 1502-1502.

104. Costello, M. J. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells / M. J. Costello, S. K. Joyce, V. M. Abrahams // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2007. – Vol. 57. – №. 1. – P. 67-80.

105. Cotter, A. M. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia / A. M. Cotter, C.

M. Martin, J. J. O'Leary, S. F. Daly // American journal of obstetrics and gynecology. – 2004. – Vol. 191. – №. 2. – P. 515-520.

106. Craven, C. M. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts / C. M. Craven, T. Morgan, K. Ward // Placenta. – 1998. – Vol. 19. – №. 4. – P. 241-252.

107. Crispi, F. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease / F. Crispi, J. Miranda, E. Gratacós // American journal of obstetrics and gynecology. – 2018. – Vol. 218. – №. 2. – P. S869-S879.

108. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2 / S. Kurukuti, V. K. Tiwari, G. Tavoosidana [et al.] // Proceedings of the national academy of sciences. – 2006. – Vol. 103. – №. 28. – P. 10684-10689.

109. CTCF binding at the insulin-like growth factor-II (IGF2)/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues / G. A. Ulaner, Y. Yang, J. F. Hu [et.al.] // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144. – №. 10. – P. 4420-4426.

110. CTCF modulates allele-specific sub-TAD organization and imprinted gene activity at the mouse Dlk1-Dio3 and Igf2-H19 domains / D. Llères, B. Moindrot, R. Pathak [et al.] // Genome biology. – 2019. – Vol. 20. – №. 1. – P. 1-17.

111. Current use and performance of the different fetal growth charts in the Italian population / T. Stampalija, T. Ghi, V. Rosolen [et al.] // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2020. – Vol. 252. – P. 323-329.

112. DeChiara, T. M. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting / T. M. DeChiara, A. Efstratiadis, E. J. Robertsen // Nature. – 1990. – Vol. 345. – №. 6270. – P. 78-80.

113. Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia / D. K. Bourque, L. Avila, M. Penaherrera [et al.] // *Placenta*. – 2010. – Vol. 31. – №. 3. – P. 197-202.
114. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro / A. K. Gupta, W. Holzgreve, B. Huppertz [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2004. – Vol. 50. – №. 11. – P. 2187-2190.
115. Detection of fetal DNA in the peritoneal cavity during pregnancy / R. Cioni, C. Bussani, B. Scarselli [et al.] // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2003. – Vol. 107. – №. 2. – P. 210-211.
116. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction / M. K. Al-Yatama, A. S. Mustafa, S. Ali [et al.] // *Prenatal diagnosis*. – 2001. – Vol. 21. – №. 5. – P. 399-402.
117. Diagnosis and surveillance of late-onset fetal growth restriction / F. Figueras, J. Caradeux, F. Crispi [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2018. – Vol. 218. – №. 2. – P. S790-S802. e1.
118. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas / A. I. Diplas, L. Lambertini, M. J. Lee [et al.] // *Epigenetics*. – 2009. – Vol. 4. – №. 4. – P. 235-240.
119. Disproportionate intrauterine growth intervention trial at term: DIGITAT / K. E. Boers, D. Bijlenga, B. W. Mol [et al.] // *BMC Pregnancy and Childbirth*. – 2007. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-6.
120. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs / V. M. Abrahams, P. Bole-Aldo, Y. M. Kim [et al.] // *The journal of immunology*. – 2004. – Vol. 173. – №. 7. – P. 4286-4296.
121. DNA methylation profiles of genes associated with angiogenesis in the samples of placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth

restriction / F. Selcen Cebe, E. Nur Tola, P. Aslan Koşar, B. Oral // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2019. – P. 1-9.

122. Early asymmetric IUGR and aneuploidy / C. Anandakumar, S. Chew, Y. C. Wong [et al.] // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 1996. – Vol. 22. – №. 4. – P. 365-370.

123. Early prediction of hypertensive disorders of pregnancy using cell-free fetal DNA, cell-free total DNA, and biochemical markers / S. Y. Kim, H. J. Kim, S. Y. Park [et al.] // *Fetal diagnosis and therapy*. – 2016. – Vol. 40. – №. 4. – P. 255-262.

124. Epigenetic modulation of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction / S. Tabano, P. Colapietro, I. Cetin [et al.] // *Epigenetics*. – 2010. – Vol. 5. – №. 4. – P. 313-324.

125. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver–Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes / D. Bartholdi, M. Krajewska-Walasek, K. Öunap [et al.] // *Journal of medical genetics*. – 2009. – Vol. 46. – №. 3. – P. 192-197.

126. Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference / V. Januar, G. Desoye, B. Novakovic [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2015. – Vol. 213. – №. 4. – P. S182-S196.

127. Epigenetics and cardiovascular risk in childhood / F. Martino, A. Magenta, G. Pannarale [et al.] // *Journal of Cardiovascular Medicine*. – 2016. – Vol. 17. – №. 8. – P. 539-546.

128. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome / C. Gicquel, S. Rossignol, S. Cabrol [et al.] // *Nature genetics*. – 2005. – Vol. 37. – №. 9. – P. 1003-1007.

129. Erboga, M. Trophoblast cell proliferation and apoptosis in placental development during early gestation period in rats / M. Erboga, M. Kanter //

Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. – 2015. – Vol. 37. – №. 5. – P. 286-294.

130. Estimates of burden and consequences of infants born small for gestational age in low and middle income countries with INTERGROWTH-21st standard: analysis of CHERG datasets / A. C. Lee, N. Kozuki, S. Cousens [et al.] // *bmj*. – 2017. – Vol. 358.

131. Evaluation of an optimal gestational age cut-off for the definition of early-and late-onset fetal growth restriction / S. Savchev, F. Figueras, M. Sanz-Cortes [et al.] // *Fetal Diagnosis and Therapy*. – 2014. – Vol. 36. – №. 2. – P. 99-105.

132. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta / U. Holmlund, G. Cebers, A. R. Dahlfors [et al.] // *Immunology*. – 2002. – Vol. 107. – №. 1. – P. 145-151.

133. Farag, A. K. Death-associated protein kinase (DAPK) family modulators: current and future therapeutic outcomes / A. K. Farag, E. J. Roh // *Medicinal Research Reviews*. – 2019. – Vol. 39. – №. 1. – P. 349-385.

134. Farag, K. Prediction of preeclampsia: can it be achieved? / K, Farag, I. Hassan, W. L. Ledger // *Obstetrical & gynecological survey*. – 2004. – Vol. 59. – №. 6. – P. 464-482.

135. Fenton, T. R. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants / T. R. Fenton, J. H. Kim // *BMC pediatrics*. – 2013. – Vol. 13. – №. 1. – P. 59.

136. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64 / C. N. Hales, D. J. Barker, P. M. Clark [et al.] // *British medical journal*. – 1991. – Vol. 303. – №. 6809. – P. 1019-1022.

137. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia / T. W. Lau, T. N. Leung, L. Y. Chan [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2002. – Vol. 48. – №. 12. – P. 2141-2146.

138. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics / G. Ashoor, A. Syngelaki, L. C. Y. Poon [et al.] // *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. – 2013. – Vol. 41. – №. 1. – P. 26-32.

139. Fetal growth restriction and methylation of growth-related genes in the placenta / X. Xiao, Y. Zhao, R. Jin [et.al.] // *Epigenomics*. – 2016. – Vol. 8. – №. 1. – P. 33-42.

140. Fetal Medicine Foundation reference ranges for umbilical artery and middle cerebral artery pulsatility index and cerebroplacental ratio / A. Ciobanu, A. Wright, A. Syngelaki [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2019. – Vol. 53. – №. 4. – P. 465-472.

141. Fetal programming of neuropsychiatric disorders / G. Faa, M. Manchia, R. Pintus [et al.] // *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. – 2016. – Vol. 108. – №. 3. – P. 207-223.

142. Fetal programming of the metabolic syndrome / A. Marciniak, J. Patro-Małyśza, Z. Kimber-Trojnar [et al.] // *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2017. – Vol. 56. – №. 2. – P. 133-138.

143. Figueras, F. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management / F. Figueras, J. Gardosi // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2011. – Vol. 204. – №. 4. – P. 288-300.

144. Figueras, F. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol / F. Figueras, E. Gratacos // *Fetal diagnosis and therapy*. – 2014. – Vol. 36. – №. 2. – P. 86-98.

145. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum—a marker of early-onset preeclampsia / E. Keikkala, P. Vuorela, H. Laivuori [et al.] // *Placenta*. – 2013. – Vol. 34. – №. 11. – P. 1059-1065.

146. First trimester maternal serum free β human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications / C. Y. Ong, A. W. Liao, K. Spencer [et al.] // *BJOG: An*

International Journal of Obstetrics & Gynaecology. – 2000. – Vol. 107. – №. 10. – P. 1265-1270.

147. First-trimester maternal serum a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) and adverse pregnancy outcome / L. C. Poon, T. Chelemen, O. Granvillano [et al.] // *Obstetrics & Gynecology*. – 2008. – Vol. 112. – №. 5. – P. 1082-1090.

148. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction / I. Chafetz, I. Kuhnreich, M. Sammar [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2007. – Vol. 197. – №. 1. – P. 35. e1-35. e7.

149. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast / M. Alberry, D. Maddocks, M. Jones [et al.] // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. – 2007. – Vol. 27. – №. 5. – P. 415-418.

150. Frequent apoptosis in placental villi from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and without maternal symptoms / H. Endo, A. Okamoto, K. Yamada [et al.] // *International journal of molecular medicine*. – 2005. – Vol. 16. – №. 1. – P. 79-84.

151. Jang H. S. et al. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function // *Genes*. – 2017. – T. 8. – №. 6. – C. 148.

152. Gong, L. Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation / L. Gong, Y. X. Pan, H. Chen // *Epigenetics*. – 2010. – Vol. 5. – №. 7. – P. 619-626.

153. Goyal, D. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease / D. Goyal, S. W. Limesand, R. Goyal // *Journal of Endocrinology*. – 2019. – Vol. 242. – №. 1. – P. T105-T119.

154. Guideline, R. G. T. 31: The Investigation and Management of the Small-for-Gestational Ages Fetus / R. G. T. Guideline // *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*. – 2013.

155. Hales, C. N. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis / C. N. Hales, D. J. P. Barker // *Diabetologia*. – 1992. – Vol. 35. – №. 7. – P. 595-601.
156. Halicka, H. D. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis / H. D. Halicka, E. Bedner, Z. Darzynkiewicz // *Experimental cell research*. – 2000. – Vol. 260. – №. 2. – P. 248-256.
157. Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF)- α , but not to IL-6 / K. Shimoya, A. Moriyama, N. Matsuzaki [et al.] // *Molecular human reproduction*. – 1999. – Vol. 5. – №. 9. – P. 885-885.
158. Huppertz, B. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis / B. Huppertz // *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*. – 2004. – Vol. 11. – №. 6. – P. 353-362.
159. Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta / B. Huppertz // *Journal of clinical pathology*. – 2008. – Vol. 61. – №. 12. – P. 1296-1302.
160. Huppertz, B. Trophoblast Invasion: Remodelling of Spiral Arteries and Beyond / B. Huppertz // *Preeclampsia*. – Springer, Singapore, 2018. – P. 47-62.
161. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis / K. A. Chan, C. Ding, A. Gerovassili [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2006. – Vol. 52. – №. 12. – P. 2211-2218.
162. Identifying mild and severe preeclampsia in asymptomatic pregnant women by levels of cell-free fetal DNA / T. R. Jakobsen, F. B. Clausen, L. Rode [et al.] // *Transfusion*. – 2013. – Vol. 53. – №. 9. – P. 1956-1964.
163. IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor / L. K. Harris, I. P. Crocker, P. N. Baker [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2011. – Vol. 84. – №. 3. – P. 440-446.

164. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development / J. St-Pierre, M.F. Hivert, P. Perron [et al.] // *Epigenetics*. – 2012. – Vol. 7. – №. 10. – P. 1125-1132.

165. IGF-II expression and methylation in small for gestational age infants / S. Zhang, G. Zhai, J. Wang [et al.] // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. – 2015. – Vol. 28. – №. 5-6. – P. 613-618.

166. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis / K. Kumazaki, M. Nakayama, I. Yanagihara [et al.] // *Human pathology*. – 2004. – Vol. 35. – №. 1. – P. 47-54.

167. Impact of fetal growth on pregnancy outcomes in women with severe preeclampsia / E. B. Carter, S. N. Conner, A. G. Cahill [et al.] // *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. – 2017. – Vol. 8. – P. 21-25.

168. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort / J. Zeitlin, M. El Ayoubi, P. H. Jarreau [et al.] // *The Journal of pediatrics*. – 2010. – Vol. 157. – №. 5. – P. 733-739. e1.

169. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation / N. Ishihara, H. Matsuo, H. Murakoshi [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2002. – Vol. 186. – №. 1. – P. 158-166.

170. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction / S. Illanes, M. Parra, R. Serra [et al.] // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. – 2009. – Vol. 29. – №. 12. – P. 1118-1122.

171. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas / C. E. Banister, D. C. Koestler, M. A. Maccani [et al.] // *Epigenetics*. – 2011. – Vol. 6. – №. 7. – P. 920-927.

172. Innate Immune Cells and Toll-like Receptor–Dependent Responses at the Maternal–Fetal Interface / A. Olmos-Ortiz, P. Flores-Espinosa, I. Mancilla-Herrera [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – №. 15. – P. 3654.

173. International gestational age-specific centiles for umbilical artery Doppler indices: a longitudinal prospective cohort study of the INTERGROWTH-21st Project / L. Drukker, E. Staines-Urias, J. Villar [et al.] // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2020.

174. Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis, and management / A. Lausman, J. Kingdom, R. Gagnon [et al.] // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. – 2013. – Vol. 35. – №. 8. – P. 741-748.

175. Intrauterine growth in the offspring of epileptic mothers / D. Battino, T. Granata, S. Binelli [et al.] // *Acta neurologica scandinavica*. – 1992. – Vol. 86. – №. 6. – P. 555-557.

176. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells / S. Kato, K. Nakashima, T. Nagasawa [et al.] // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2013. – Vol. 46. – №. 3. – P. 164-170.

177. Kaufmann, P. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance / P. Kaufmann, B. Huppertz, H. G. Frank // *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. – 1996. – Vol. 178. – №. 6. – P. 485-501.

178. Key players of the necroptosis pathway RIPK1 and SIRT2 are altered in placenta from preeclampsia and fetal growth restriction / N. J. Hannan, S. Beard, N. K. Binder [et al.] // *Placenta*. – 2017. – Vol. 51. – P. 1-9.

179. Kirkegaard, I. Early fetal growth, PAPP-A and free β -hCG in relation to risk of delivering a small-for-gestational age infant / I. Kirkegaard, T. B. N. Henriksen // *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. – 2011. – Vol. 37. – №. 3. – P. 341-347.

180. Kitsiou-Tzeli, S. Maternal epigenetics and fetal and neonatal growth / S. Kitsiou-Tzeli, M. Tzetis // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. – 2017. – Vol. 24. – №. 1. – P. 43-46.

181. Koga, K. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response / K. Koga, P. B. Aldo, G. Mor // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2009. – Vol. 35. – №. 2. – P. 191-202.

182. Korpysz, A. What's new in IUGR from the endocrinological point of view? / A. Korpysz, M. Szalecki // *Pediatric Endocrinology, Diabetes, and Metabolism*. – 2019. – Vol. 25. – №. 4. – P. 188-193.

183. Ksp-cadherin is a functional cell–cell adhesion molecule related to LI-cadherin / M. W. Wendeler, M. Praus, R. Jung [et al.] // *Experimental cell research*. – 2004. – Vol. 294. – №. 2. – P. 345-355.

184. Kwon, E. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health / E. J. Kwon, Y. J. Kim // *Obstetrics & gynecology science*. – 2017. – Vol. 60. – №. 6. – P. 506-519.

185. L'ADN fœtal libre circulant: un outil d'évaluation du risque de survenue de complications obstétricales? / C. Duvillier, T. Quibel, C. Felsenheld [et al.] // *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*. – 2019. – Vol. 47. – №. 11. – P. 790-796.

186. Lash, G. E. Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 31 / G. E. Lash, S. C. Robson, J. N. Bulmer J. N // S87–S92. doi. – 2010. – Vol. 10.

187. Lees, C. The Trial of Randomized Umbilical and Fetal Flow in Europe (TRUFFLE) study: two year neurodevelopmental and intermediate perinatal outcomes / C. Lees, N. Marlow, A. van Wassenaer-Leemhuis // *Lancet*. – 2015. – Vol. 385. – №. 2162. – P. e72.

188. Lillycrop K. A., Burdge G. C. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals // *Epigenomics*. – 2014. – T. 6. – №. 6. – C. 623-636.

189. Litton, C. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future / C. Litton, J. Stone, K. Eddleman, M.J. Lee // *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. – 2009. – Vol. 76. – №. 6. – P. 521-528.
190. Lo, Y. M. D. Noninvasive prenatal diagnosis in 2020 / Y. M. D. Lo // *Prenatal diagnosis*. – 2010. – Vol. 30. – №. 7. – P. 702-703.
191. Loss of imprinting and aberrant methylation of IGF2 in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction / O. Koukoura, S. Sifakis, G. Soufla [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 28. – №. 4. – P. 481-487.
192. Low circulating IGF-II concentrations predict weight gain and obesity in humans / M. S. Sandhu, J. M. Gibson, A. H. Heald [et al.] // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – №. 6. – P. 1403-1408.
193. Low Fetal Fraction and Birth Weight in Women with Negative First-Trimester Cell-Free DNA Screening / M. A. Clapp, M. Berry, L.L. Shook [et al.] // *American journal of perinatology*. – 2020. – Vol. 37. – №. 01. – P. 086-091.
194. Low fetal fraction of cell-free DNA predicts placental dysfunction and hypertensive disease in pregnancy / K. D. Gerson, S. Truong, M.J. Haviland [et al.] // *Pregnancy hypertension*. – 2019. – Vol. 16. – P. 148-153.
195. Lui, J. C. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs / J. C. Lui, G. P. Finkelstein, K. M. Barnes, J. Baron // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2008. – Vol. 295. – №. 1. – P. R189-R196.
196. Martín-Estal, I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency / I. Martín-Estal, R. G. De La Garza, I. Castilla-Cortazar // *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Vol. 170. – Springer, Cham, 2016. – P. 1-35.
197. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation

/ T. Rafaeli-Yehudai, M. Imterat, A. Douvdevani [et al.] // PloS one. – 2018. – Vol. 13. – №. 7. – P. e0200360.

198. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia with and without intrauterine growth restriction / D. W. Kwak, S. Y. Kim, H. J. Kim [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-8.

199. McCowan, L. M. Evidence-based national guidelines for the management of suspected fetal growth restriction: comparison, consensus, and controversy / L. M. McCowan, F. Figueras, N. H. Anderson // American journal of obstetrics and gynecology. – 2018. – Vol. 218. – №. 2. – P. S855-S868.

200. Meher, S. Antiplatelet therapy before or after 16 weeks' gestation for preventing preeclampsia: an individual participant data meta-analysis / S. Meher, L. Duley, K. Hunter, L. Askie // American journal of obstetrics and gynecology. – 2017. – Vol. 216. – №. 2. – P. 121-128. e2.

201. Menendez-Castro, C. Intrauterine growth restriction-impact on cardiovascular diseases later in life / C. Menendez-Castro, W. Rascher, A. Hartner // Molecular and cellular pediatrics. – 2018. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-3.

202. Metabolic outcomes in adults born preterm with very low birthweight or small for gestational age at term: a cohort study / C. N. Balasuriya, A. K. Stunes, M. P. Mosti [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2018. – Vol. 103. – №. 12. – P. 4437-4446.

203. Mifsud, W. Placental pathology in early-onset and late-onset fetal growth restriction / W. Mifsud, N. J. Sebire // Fetal diagnosis and therapy. – 2014. – Vol. 36. – №. 2. – P. 117-128.

204. Mitchell, S. Signaling via the NFκB system / S. Mitchell, J. Vargas, A. Hoffmann // Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 8. – №. 3. – P. 227-241.

205. Monk, D. Genomic imprinting in the human placenta / D. Monk // American journal of obstetrics and gynecology. – 2015. – Vol. 213. – №. 4. – P. S152-S162.

206. Moore, L. D. DNA methylation and its basic function / L. D. Moore, T. Le, G. Fan // *Neuropsychopharmacology*. – 2013. – Vol. 38. – №. 1. – P. 23-38.
207. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction / I. M. Bernstein, J. D. Horbar, G. J. Badger [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2000. – Vol. 182. – №. 1. – P. 198-206.
208. Morgan, J. A. Chronic hypertension in pregnancy: are outcomes the same in patients on antihypertensives? / J. A. Morgan, M. S. McDaniel, M. E. Hankins, C. M. Cormier // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2020. – P. 1-6.
209. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma / E. K. Ng, N. B. Tsui, T. K. Lau [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – №. 8. – P. 4748-4753.
210. Neilson, J. P. Symphysis-fundal height measurement in pregnancy / J. P. Neilson // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 1998. – №. 1.
211. Nelissen, E. C. Epigenetics and the placenta / E. C. Nelissen, A. P. van Montfoort, J. C. Dumoulin, J. L. Evers // *Human reproduction update*. – 2011. – Vol. 17. – №. 3. – P. 397-417.
212. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma / R. W. Chiu, K. A. Chan, Y. Gao [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – №. 51. – P. 20458-20463.
213. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing / E. Z. Chen, R. W. Chiu, H. Sun [et al.] // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – №. 7. – P. e21791.
214. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future / C. Litton, J. Stone, K. Eddleman [et al.] // *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. – 2009. – Vol. 76. – №. 6. – P. 521-528.

215. Noninvasive prenatal testing for chromosome aneuploidies and subchromosomal microdeletions/microduplications in a cohort of 42,910 single pregnancies with different clinical features / Y. Chen, Q. Yu, X. Mao [et al.] // *Human genomics*. – 2019. – Vol. 13. – №. 1. – P. 60.

216. Ollikainen, M. Epigenetic discordance at imprinting control regions in twins M. Ollikainen, J. M. Craig // *Epigenomics*. – 2011. – Vol. 3. – №. 3. – P. 295-306.

217. Optimizing the definition of intrauterine growth restriction: the multicenter prospective PORTO Study / J. Unterscheider, S. Daly, M. P. Geary [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2013. – Vol. 208. – №. 4. – P. 290. e1-290. e6.

218. Paternally expressed, imprinted insulin-like growth factor-2 in chorionic villi correlates significantly with birth weight / C. Demetriou, S. Abu-Amero, A. C. Thomas [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – №. 1. – P. e85454.

219. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies / D. W. Bianchi, J. M. Williams, L. M. Sullivan [et al.] // *The American Journal of Human Genetics*. – 1997. – Vol. 61. – №. 4. – P. 822-829.

220. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation / B. A. Doctor, M. A. O’Riordan, H. L. Kirchner [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2001. – Vol. 185. – №. 3. – P. 652-659.

221. Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE) / C. Lees, N. Marlow, B. Arabin [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2013. – Vol. 42. – №. 4. – P. 400-408.

222. Peters, J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view / J. Peters // *Nature Reviews Genetics*. – 2014. – Vol. 15. – №. 8. – P. 517-530.

223. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies / R. Halperin, S. Peller, M. Rotschild [et al.] // Gynecologic and obstetric investigation. – 2000. – Vol. 50. – №. 2. – P. 84-87.

224. Placental phenotypes of intrauterine growth / C. P. Sibley, M. A. Turner, I. Cetin [et al.] // Pediatric research. – 2005. – Vol. 58. – №. 5. – P. 827-832.

225. Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA / T. Wataganara, M. Metzenbauer, I. Peter [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2005. – Vol. 193. – №. 2. – P. 496-500.

226. Prediction of birth weight by fetal crown–rump length and maternal serum levels of pregnancy-associated plasma protein-A in the first trimester / T. Y. Leung, D. S. Sahota, L. W. Chan [et al.] // Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – 2008. – Vol. 31. – №. 1. – P. 10-14.

227. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free β -hCG and with second-trimester uterine artery Doppler / K. Spencer, C. K. Yu, N. J. Cowans [et al.] // Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis. – 2005. – Vol. 25. – №. 10. – P. 949-953.

228. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? / J. Villar, G. Carroli, D. Wojdyla [et al.] // American journal of obstetrics and gynecology. – 2006. – Vol. 194. – №. 4. – P. 921-931.

229. Pregnancy outcomes in women with chronic kidney disease: a systematic review / I. F. Nevis, A. Reitsma, A. Dominic [et al.] // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2011. – Vol. 6. – №. 11. – P. 2587-2598.

230. Preliminary analysis of phosphorus flow in Hue Citadel / T. N. Q. Anh, H. Harada, S. Fujii [et al.] // *Water Science and Technology*. – 2016. – Vol. 73. – №. 1. – P. 69-77.
231. Prenatal exclusion of β thalassaemia major by examination of maternal plasma / R. W. Chiu, T. K. Lau, T. N. Leung [et al.] // *The Lancet*. – 2002. – Vol. 360. – №. 9338. – P. 998-1000.
232. RCOG The Investigation and Management of the Small-for-Gestational-Age Fetus / RCOG // RCOG, Green-top Guideline – 2014. – Vol. No. 31.
233. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction / M. S. Alberry, D. G. Maddocks, M. A. Hadi [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2009. – Vol. 200. – №. 1. – P. 98. e1-98. e6.
234. Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia / H. Yu, Y. Shen, Q. Ge [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – Vol. 14. – №. 4. – P. 7571-7582.
235. Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies / Y. Ohashi, N. Miharu, H. Honda [et al.] // *Human genetics*. – 2001. – Vol. 108. – №. 2. – P. 123-127.
236. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis / Y. D. Lo, M. S. Tein, T. K. Lau [et al.] // *The American Journal of Human Genetics*. – 1998. – Vol. 62. – №. 4. – P. 768-775.
237. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma / Y. D. Lo, J. Zhang, T. N. Leung [et al.] // *The American Journal of Human Genetics*. – 1999. – Vol. 64. – №. 1. – P. 218-224.
238. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood / A. Sekizawa, Y. Purwosunu, R. Matsuoka [et al.] // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2007. – Vol. 33. – №. 6. – P. 747-764.

239. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy / J. A. Hyett, G. Gardener, T. Stojilkovic-Mikic [et al.] // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. – 2005. – Vol. 25. – №. 12. – P. 1111-1116.

240. Reference ranges for Doppler indices of umbilical and fetal middle cerebral arteries and cerebroplacental ratio: systematic review / D. Oros, S. Ruiz-Martinez, E. Staines-Urias [et al.] // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2019. – Vol. 53. – №. 4. – P. 454-464.

241. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by insulin-like growth factor I (IGF-I) / M. U. Baumann, H. Schneider, A. Malek [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9. – №. 8. – P. e106037.

242. Respiratory morbidity at follow-up of small-for-gestational-age infants born very prematurely / J. L. Peacock, J. W. Lo, W. D'Costa [et al.] // *Pediatric research*. – 2013. – Vol. 73. – №. 1. – P. 457-463.

243. Riley, J. K. Toll-like receptors in pregnancy disorders and placental dysfunction / J. K. Riley, D. M. Nelson // *Clinical reviews in allergy & immunology*. – 2010. – Vol. 39. – №. 3. – P. 185-193.

244. Risk of placental dysfunction disorders after prior miscarriages: a population-based study / J. Gunnarsdottir, O. Stephansson, S. Chattingius [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2014. – Vol. 211. – №. 1. – P. 34. e1-34. e8.

245. Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region / P. E. Szabó, S. H. E. Tang, F. J. Silva [et al.] // *Molecular and cellular biology*. – 2004. – Vol. 24. – №. 11. – P. 4791-4800.

246. Rotwein, P. Diversification of the insulin-like growth factor 1 gene in mammals / P. Rotwein // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – №. 12. – P. e0189642.

247. Sampling and definitions of placental lesions: Amsterdam placental workshop group consensus statement / T. Y. Khong, E. E. Mooney, I. Ariel [et al.]

// Archives of pathology & laboratory medicine. – 2016. – Vol. 140. – №. 7. – P. 698-713.

248. San Juan-Reyes, S. Oxidative stress in pregnancy complicated by preeclampsia / S. San Juan-Reyes, L. M. Gómez-Oliván, H. Islas-Flores, O. Dublán-García // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2020. – Vol. 681. – P. 108255.

249. Schoenherr, C. J. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus / C. J. Schoenherr, J. M. Levorse, S. M. Tilghman // Nature genetics. – 2003. – Vol. 33. – №. 1. – P. 66-69.

250. Schleithoff, C. On the epigenetics of vascular regulation and disease / C. Schleithoff, S. Voelter-Mahlknecht, I. N. Dahmke, U. Mahlknecht // Clinical epigenetics. – 2012. – Vol. 4. – №. 1. – P. 1-13.

251. Schreiber, K. Pregnancy and antiphospholipid syndrome / K. Schreiber, B. J. Hunt // Seminars in thrombosis and hemostasis. – Thieme Medical Publishers, 2016. – Vol. 42. – №. 07. – P. 780-788.

252. Scifres, C. M. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death / C. M. Scifres, D. M. Nelson // The Journal of physiology. – 2009. – Vol. 587. – №. 14. – P. 3453-3458.

253. Sferruzzi-Perri, A. N. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth / A. N. Sferruzzi-Perri, J. A. Owens, K. G. Pringle, C. T. Roberts // The Journal of physiology. – 2011. – Vol. 589. – №. 1. – P. 7-20.

254. Sifakis, S. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications / S. Sifakis, Z. Koukou, D. A. Spandidos // Molecular medicine reports. – 2015. – Vol. 11. – №. 4. – P. 2367-2372.

255. Silva, J. F. Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration / J. F. Silva, N. M. Ocarino, R. Serakides // Reproduction, Fertility and Development. – 2017. – Vol. 29. – №. 9. – P. 1774-1786.

256. Singh, P. More than insulator: multiple roles of CTCF at the H19-Igf2 imprinted domain / P. Singh, D. H. Lee, P. E. Szabó // *Frontiers in genetics*. – 2012. – Vol. 3. – P. 214.
257. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma / K. A. Chan, J. Zhang, A. B. Hui [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2004. – Vol. 50. – №. 1. – P. 88-92.
258. Smaill, F. M. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy / F. M. Smaill, J. C. Vazquez // *Cochrane database of systematic reviews*. – 2019. – №. 11.
259. Smith, N. C. Preparation of human placental villous surface membrane / N. C. Smith, M. G. Brush, S. LUCKETT // *Nature*. – 1974. – Vol. 252. – №. 5481. – P. 302-303.
260. Smith, S. C. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies / S. C. Smith, P. N. Baker // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. – 1999. – Vol. 106. – №. 8. – P. 861-862.
261. Spontaneous intra-uterine growth restriction modulates the endocrine status and the developmental expression of genes in porcine fetal and neonatal adipose tissue / F. Gondret, M.C. Père, S. Tacher [et al.] // *General and comparative endocrinology*. – 2013. – Vol. 194. – P. 208-216.
262. Stampalija, T. Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome / T. Stampalija, G. M. L. Gyte, Z. Alfircic // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2010. – №. 9.
263. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein (s) and phosphorylation of MAPK / T. McKinnon, C. Chakraborty, L. M. Gleeson [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2001. – Vol. 86. – №. 8. – P. 3665-3674.
264. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum / H. Honda, N. Miharu, Y. Ohashi [et al.] // *Clinical chemistry*. – 2001. – Vol. 47. – №. 1. – P. 41-46.

265. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans / A. J. van der Meer, A. Kroeze, A. J. Hoogendijk [et al.] // *Blood advances*. – 2019. – Vol. 3. – №. 5. – P. 724.

266. Taglauer, E. S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease / E. S. Taglauer, L. Wilkins-Haug, D. W. Bianchi // *Placenta*. – 2014. – Vol. 35. – P. S64-S68.

267. Tahimic, C. G. T. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton / C. G. Tahimic, Y. Wang, D. D. Bikle // *Frontiers in endocrinology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 6.

268. Targeted capture enrichment followed by NGS: development and validation of a single comprehensive NIPT for chromosomal aneuploidies, microdeletion syndromes and monogenic diseases / G. Koumbaris, A. Achilleos, M. Nicolaou [et al.] // *Molecular cytogenetics*. – 2019. – Vol. 12. – №. 1. – P. 48.

269. Taysi, S. Radicals, oxidative/nitrosative stress and preeclampsia / S. Taysi, A. S. Tascan, M. G. Ugur, M. Demir // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2019. – Vol. 19. – №. 3. – P. 178-193.

270. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 / A. O. Aliprantis, R. B. Yang, D. S. Weiss [et al.] // *The EMBO journal*. – 2000. – Vol. 19. – №. 13. – P. 3325-3336.

271. The effect of hypertensive disorders in pregnancy on small for gestational age and stillbirth: a population based study / V. M. Allen, K. S. Joseph, K. E. Murphy [et al.] // *BMC pregnancy and childbirth*. – 2004. – Vol. 4. – №. 1. – P. 17.

272. The INTERGROWTH-21st fetal growth standards: toward the global integration of pregnancy and pediatric care / A. T. Papageorghiou, S. H. Kennedy, L. J. Salomon [et al.] // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2018. – Vol. 218. – №. 2. – P. S630-S640.

273. The promoter methylomes of monochorionic twin placentas reveal intrauterine growth restriction-specific variations in the methylation patterns / Z. He, H. Lu, H. Luo [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 20181.

274. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation / D. V. Krysko, A. Kaczmarek, O. Krysko [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2011. – Vol. 18. – №. 8. – P. 1316-1325.

275. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan / V. M. Abrahams, P. B. Aldo, S. P. Murphy [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – №. 9. – P. 6035-6043.

276. Toll-like Receptor-Mediated Responses by Placental Hofbauer Cells (HBCs): A Potential Pro-Inflammatory Role for Fetal M2 Macrophages / O. M. Young, Z. Tang, T. Niven-Fairchild [et al.] // *American journal of reproductive immunology*. – 2015. – Vol. 73. – №. 1. – P. 22-35.

277. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction / M. Al. Nakib, R. Desbriere, N. Bonello [et al.] // *Fetal diagnosis and therapy*. – 2009. – Vol. 26. – №. 1. – P. 24-28.

278. Total and fetal circulating cell-free DNA, angiogenic, and antiangiogenic factors in preeclampsia and HELLP syndrome / R. Muñoz-Hernández, P. Medrano-Campillo, M. L. Miranda [et al.] // *American Journal of Hypertension*. – 2017. – Vol. 30. – №. 7. – P. 673-682.

279. Trophoblast–endothelium signaling involves angiogenesis and apoptosis in a dynamic bioprinted placenta model / C. Y. Kuo, M. Shevchuk, J. Opfermann [et al.] // *Biotechnology and bioengineering*. – 2019. – Vol. 116. – №. 1. – P. 181-192.

280. Turco, M. Y. Development of the human placenta / M. Y. Turco, A. Moffett // *Development*. – 2019. – Vol. 146. – №. 22.

281. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth / D. J. Barker, C.

N. Hales, C. H. D. Fall [et al.] // *Diabetologia*. – 1993. – Vol. 36. – №. 1. – P. 62-67.

282. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction / J. McMinn, M. Wei, N. Schupf [et al.] // *Placenta*. – 2006. – Vol. 27. – №. 6-7. – P. 540-549.

283. Usefulness and reliability of cell free fetal DNA screening for main trisomies in case of atypical profile on first trimester maternal serum screening / J. Carrara, A. Vivanti, J. C. Jani [et al.] // *Journal of translational medicine*. – 2019. – Vol. 17. – №. 1. – P. 398.

284. Vaiman, D. Genes, epigenetics and miRNA regulation in the placenta / D. Vaiman // *Placenta*. – 2017. – Vol. 52. – P. 127-133.

285. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease / D. J. Barker, C. Osmond, P. D. Winter [et al.] // *The Lancet*. – 1989. – Vol. 334. – №. 8663. – P. 577-580.

286. Werner, H. New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia / H. Werner, D. Le Roith // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2000. – Vol. 57. – №. 6. – P. 932-942.

287. Xu, X. F. Epigenetics in neonatal diseases / X. F. Xu, L. Z. Du // *Chinese medical journal*. – 2010. – Vol. 123. – №. 20. – P. 2948-2954. Selcen Cebe, F.

288. Zeitlin J. et al. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort // *The Journal of pediatrics*. – 2010. – T. 157. – №. 5. – C. 733-739. e1.

289. Zhong, Y. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction / Y. Zhong, M. Tuuli, A. O. Odibo // *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. – 2010. – Vol. 30. – №. 4. – P. 293-308.

290. Zhou Z. et al. Independent manipulation of histone H3 modifications in individual nucleosomes reveals the contributions of sister histones to transcription // *Elife*. – 2017. – T. 6. – C. e30178.

291. Zhu, Z. Epigenetic programming and fetal metabolic programming / Z. Zhu, F. Cao, X. Li // *Frontiers in Endocrinology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 764.