

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н. И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**АВETИCОВА Кристина Григорьевна**

**ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК У БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И  
ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
**Клименко Петр Афанасьевич**

Москва – 2019

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>3</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: преэклампсия, плацентарная недостаточность (современное состояние вопроса, молекулярно-биологическая основа преэклампсии) .....</b>	<b>11</b>
<b>Глава 2. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Клиническая характеристика наблюдений.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2. Методики исследования .....</b>	<b>47</b>
<b>2.3. Определение молекулярно-биологических факторов .....</b>	<b>48</b>
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при нормальной беременности.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при преэклампсии .....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при плацентарной недостаточности и задержке роста плода .....</b>	<b>69</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>81</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>99</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>102</b>
<b>Приложение А.....</b>	<b>120</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Плацентарная недостаточность и ассоциированные с ней осложнения, такие как преэклампсия, задержка роста плода (ЗРП), антенатальная гибель плода, преждевременная отслойка плаценты обусловлены патологией формирования плаценты. Данные осложнения являются основными причинами перинатальной заболеваемости и смертности [Сухих Г. Т., Серов В. Н., Адамян Л. В., 2018; Стрижаков А. Н., Мирющенко М. М., Игнатко И. В. и др., 2017; Айламазян Э. К., 2014; Samantha E. P., 2014]. Преэклампсия и плацентарная недостаточность в любом проявлении могут приводить к серьёзным изменениям как в организме матери, вплоть до полиорганной недостаточности, так и плода, приводя к гипоксии.

В настоящее время, по данным ВОЗ преэклампсия осложняет 2,2% беременностей, и имеется тенденция роста частоты ее встречаемости. В структуре материнской смертности преэклампсия занимает 2-е место после кровотечений, в Российской Федерации согласно данным статистики – 3-е место. Плацентарная недостаточность приводит к росту перинатальной смертности до 10% среди доношенных новорожденных и до 49% среди недоношенных, а также к задержке роста плода, частота которой варьирует в широком диапазоне: от 5 до 22%.

Преэклампсию не всегда сопровождает единообразная клиническая картина. По данным Савельевой Г. М. и соавт. (2010), артериальная гипертензия выше 160/100 мм рт. ст. определяется лишь в 25,5% эклампсии, а в остальных находилась в пределах 130/90–150/100 мм рт. ст. и ниже. Протеинурия не была подтверждена в 25% при эклампсии. Выявлены большие различия в тяжести отечного синдрома в характере субъективных симптомов. Наличие всех трех симптомов отмечено только в 58,8% наблюдений [Савельева Г. М., Шалина Р. И., Курцер М. А. и др., 2010]. Проспективное исследование [Douglas K. A., Redman C. W., 1994] при эклампсии показало, что у 38% беременных приступы развились до того, как появились и были диагностированы протеинурия и артериальная

гипертензия. К «атипической преэклампсии» относят наблюдения с отсутствием одного или более симптомов [Sibai B. M., Stella C. L., 2009].

В последние годы, с целью диагностики хронических полиорганных нарушений, стали использовать в качестве дополнительных признаков повреждения тканей исследование протеом, ДНК и других нуклеотидов. Обнаружено повышение вкДНК при аутоиммунных заболеваниях [Козлов В. А., 2013; Galeazzi M., Morozzi G., Piccini M. et al., 2003; Leon S. A., Revach M., Ehrlich G. E. et al., 1981], остром инфаркте миокарда [Destouni A., Vrettou C., Antonatos D. et al., 2009], у больных, перенесших острый инсульт [Rainer T. H., Wong L. K. S., Lam W. et al., 2003; Lam N Y., Rainer T. H., Wong L. K. et al., 2006, N 68, p. 71–78], в онкологии при наличии характерных для канцерогенеза мутаций, таких как онкогены KRAS, HER2, BRCA1, APC, PIK3CA, BRAF и др. [Васильева И. Н., Беспалов В. Г., 2013; Dorval P., Laurent, 2010].

В акушерстве имеется небольшое количество работ, в которых показано, что вкДНК полезна в диагностике преэклампсии и плацентарной недостаточности [Логутова Л. С., Радьков О. В., Калинин М. Н. и др., 2012; Баев О. Р., Карапетян А. О. и др., 2018]. В этом случае необходимо определять не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК в материнской крови. Основным источником вкДНК плода в крови матери считают гибнущие в результате некроза или апоптоза клеток плаценты [Smid M., 2011]. Обнаружена высокая корреляция между концентрацией в плазме матери последовательностей материнского генома и вкДНК плода [Lo Y. M., 1999]. В акушерской практике роль вкДНК и ее характеристик в диагностике полиорганных системных заболеваний, до настоящего времени мало изучена, а результаты исследований противоречивы.

#### **Степень разработанности темы исследования.**

Своевременная и ранняя диагностика, грамотная оценка степени тяжести преэклампсии и плацентарной недостаточности, их лечение или родоразрешение позволят снизить частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Существует целый комплекс субъективных причин, затрудняющих оценку степени тяжести этих осложнений беременности: отсутствие точных

знаний об этиологии и патогенезе, высокая частота встречаемости атипично протекающих преэклампсии и плацентарной недостаточности, узкий диапазон характеристик, ориентированных на небольшое количество критериев, не принадлежащих к специфическим из доказательной медицины: АД, протеинурия, тесты функциональной диагностики, антропометрия, доплерометрия и др. Изменения концентрации внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови беременных при преэклампсии и плацентарной недостаточности мало изучены и до сих пор не являются признаками болезни.

### **Цель исследования**

Повысить качество диагностики тяжелых форм преэклампсии и плацентарной недостаточности во время беременности с помощью определения параметров внеклеточной ДНК.

### **Задачи исследования**

1. Определить концентрацию вкДНК, уровень активности ДНКазы 1, соотношение вкДНК/ДНКазы 1, количества мтДНК в составе вкДНК у здоровых беременных во 2-м и 3-м триместрах беременности.

2. Выявить корреляцию между концентрацией вкДНК в материнской крови и общепринятыми клинико-лабораторными маркерами преэклампсии и ЗРП (САД, ДАД, отеки, белок в моче, вес плода, степень ЗРП, ультразвуковое и доплерометрическое исследование кровотока в маточном и плодово-плацентарном бассейнах).

3. Исследовать концентрацию вкДНК, уровень активности ДНКазы 1, соотношение вкДНК/ДНКазы 1 количества мтДНК в составе вкДНК у пациенток с преэклампсией различной степени тяжести.

4. Выявить диагностическую значимость показателей концентрации вкДНК, уровня активности ДНКазы 1, количества мтДНК в составе вкДНК, при критической форме ПЭ.

5. Определить концентрацию вкДНК, уровень активности ДНКазы 1 при ЗРП различной степени тяжести.

6. Оценить значимость показателей концентрации вкДНК и уровня активности ДНКазы I в диагностике плацентарной недостаточности, ЗРП, хронической гипоксии плода.

### **Научная новизна результатов исследования**

Полученные нами результаты показывают, что высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Видимо, поэтому литературные данные об изменении концентрации вкДНК при патологии беременности столь противоречивы. Обнаружено, что при преэклампсии существенно изменяется как вкДНК, так и ее характеристики. Они коррелируют с клиническими признаками болезни.

Показано, что если учитывать три показателя – концентрация вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I, то можно определять уровень гибели клеток в организме беременной. Эти показатели дают информацию об эффективности работы системы элиминации, которая включает ДНКазу I и другие значимые при беременности компоненты. Например, если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы I на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при повышенной активности ДНКазы I говорят о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма. При этом данные ультразвукового исследования могут зафиксировать ЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время для накопления признаков ЗРП, тестируемых ультразвуком.

Установлено, что увеличение в крови количества копий (повторов) вкДНК в составе вкДНК свидетельствует о тяжелом течении преэклампсии и прогрессировании плацентарной недостаточности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В работе разработана оптимальная комплексная диагностика (особенности анамнеза, современная многофункциональная сонография, концентрация вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I вк мтДНК, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК молекулярно-биологических маркеров) у беременных при преэклампсии и плацентарной недостаточности. В результате исследования разработан эффективный алгоритм обследования беременных, предоставляющий возможность дифференцированного выбора акушерской тактики в зависимости от тяжести преэклампсии, степени тяжести ЗРП и сроков гестации. Определены пороговые значения вкДНК и ее характеристик для диагностики тяжелых форм преэклампсии таких как концентрация вкДНК, нуклеазная активность, вк мтДНК, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК, свидетельствующие о выраженной плацентарной недостаточности и критической форме преэклампсии, состояния при котором пролонгирование беременности является опасным для здоровья матери и плода.

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования включала анализ характера течения беременности и родов у пациенток с тяжелой преэклампсией и плацентарной недостаточностью. Исследование выполнено с соблюдением принципов доказательной медицины (отбор больных и статистическая обработка результатов). Работа выполнена в дизайне сплошного двухэтапного (ретроспективный и проспективный) исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных методов исследования и статистических методик обработки полученного массива данных.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Концентрация вкДНК при физиологической беременности существенно не отличается от таковой у здоровых небеременных и достоверно не меняется в последний триместр у беременных,

2. Концентрация вкДНК и ее характеристики коррелируют с клиническими признаками преэклампсии и плацентарной недостаточности и могут являться дополнительными критериями развития тяжелых форм этих осложнений.

3. Если при мониторинге в последнем триместре беременности имеет место усиление активности ДНКазы 1 на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, появление большого количества копий мт ДНК в составе внеклеточной, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при увеличенной активности ДНКазы 1 говорят о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Работа проведена на большом количестве клинического материала, 207 беременных с преэклампсией и плацентарной недостаточностью с использованием современных методов ультразвуковой диагностики и молекулярно - биологических факторов. Для статистической обработки данных применяли прикладной пакет программ SPSS 15.0. Использовали описательную статистику и корреляционный анализ по методу Спирмена. Для поиска достоверных различий между выборками использовали критерии Вилкоксона и Манна-Уитни. Кроме того, данные подвергали частотному анализу путем построения кросс-таблиц. Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

### **Апробация работы**

Результаты собственных исследований и материалы диссертации доложены и обсуждены на XIV Международной (XXIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых – 2019.

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова, кафедры акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, врачей ГБУЗ ЦПСИР ДЗМ (протокол №2 от 20 декабря 2019).



### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора в диссертацию составляет более 70%. Автор непосредственно участвовал в проведении анализа литературы, составления анкет и электронных баз данных, анализе медицинской документации всех пациенток. Автором лично проведен отбор, ультразвуковое и клиническое обследование беременных, анализ полученных результатов с применением статистических методов исследования. Автор принимал непосредственное участие в подготовке публикаций и докладов по выполненной работе.

### **Соответствие диссертации паспорту полученной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – «Акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3, 4, 5 паспорта специальности «Акушерство и гинекология».

### **Реализация и внедрение результатов в практику**

Разработанная система диагностики тяжести преэклампсии и плацентарной недостаточности у беременных внедрена в практическую деятельность врачей гинекологического отделения ЦПСиР и Перинатального медицинского центра «Мать и дитя» г. Москвы. Результаты работы используются в учебном процессе кафедры акушерства, гинекологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### **Публикации по теме диссертации**

Основные положения диссертационной работы отражены в 6 работах, из них 2 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, а также 1- в англоязычном журнале, входящих в Scopus.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 120 страницах печатного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, списка сокращений. Библиографический указатель включает в себя 165

источников литературы, в том числе 12 отечественных и 153 зарубежных. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 20 рисунками.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: преэклампсия, плацентарная недостаточность (современное состояние вопроса, молекулярно-биологическая основа преэклампсии)**

**Преэклампсия** представляет собой осложнение беременности, характеризующееся глубоким расстройством функции жизненно важных органов и систем, развивающееся после 20-й недели беременности. Классической триадой симптомов при этом является: повышение АД, протеинурия, отеки. Преэклампсии у пациентов с высоким кровяным давлением могут приводить к HELLP-синдрому. Гемолиз с повышенными ферментами печени и низкими тромбоцитами и дальнейшее начало неврологических симптомов приводят к эклампсии. Эклампсия характеризуется следующим участием нескольких органов: печеночной, почечной недостаточностью, диссеминированной внутрисосудистой коагуляцией, отеком легких, нарушением мозгового кровообращения, кровоизлияниями. Осложнения при преэклампсии возникают и у плода. У новорожденных [Backes С. Н. et al., 2011] регистрировали повышение числа респираторных заболеваний, внутриутробное ограничение роста (IUGR). Факторами риска преэклампсии являются: возраст матери старше 40 лет, ожирение, почечные или аутоиммунные расстройства и многоплодная беременность. Диагностика преэклампсии обычно проводится путем определения артериального давления и протеинурии. Однако для выявления преэклампсии на этапах пред симптоматики и правильной оценки состояния плода этого бывает недостаточно [Sibai В. М., 2003]. По общему признанию, бессимптомные наблюдения могут закончиться эклампсией [Sibai В., Dekker G., Kupferminc M., 2005]. Нередко, по данным [Polsani S., Phipps E., Jim В. et al., 2013], возникают ложные симптомы болезни и ошибки в диагностике. Работа [Polsani S. et al., 2013] свидетельствует о том, что своевременное выявление преэклампсии с помощью молекулярно-биологических факторов крови и оценка здоровья плода улучшают результаты дородового ведения беременности. В основе патогенеза преэклампсии отмечают генерализованный спазм сосудов, гиповолемию, изменение

реологических и коагуляционных свойств крови, нарушения микроциркуляции и водно-солевого обмена. Эти изменения вызывают гипоперфузию тканей и развитие в них дистрофии вплоть до некроза. По мере прогрессирования преэклампсии в тканях жизненно важных органов развиваются некрозы, обусловленные гипоксическими изменениями. Преэклампсия, особенно тяжелой степени, почти всегда сопровождается тяжелым нарушением функций почек. Патологические изменения, связанные с преэклампсией приводят к гибели клеток – апоптозу.

По клиническому течению преэклампсию разделяют на:

- преэклампсию умеренную и тяжелую;
- преэклампсию/эклампсию на фоне хронической артериальной гипертензии (ХАГ);
- эклампсию, проявляющуюся судорогами, во время беременности и в родах;
- эклампсию в послеродовом периоде (раннюю в течение 48 часов и позднюю в течение 28 суток после родов);
- HELLP-синдром.

Преэклампсия представляет мультисистемное нарушение беременности, которое характеризуется исходной артериальной гипертензией (систолическое и диастолическое кровяное давление  $\geq 140$ - и  $90$ -мм рт. ст., соответственно), на протяжении по крайней мере 6 часов, протеинурией (белковая экскреция  $\geq 300$  мг в моче за 24 часа), которые развиваются после 20 недель беременности у ранее здоровых пациенток [Abalos E., 2013; Sebastian T., 2015].

Тяжесть преэклампсии зависит от системного участия, несколько других симптомов, таких как отек, нарушение гемостаза, почечного или печеночная недостаточность, и HELLP-синдрома (гемолиз с повышением уровня ферментов печени и низким количеством тромбоцитов). Преэклампсия имеет раннее (до 34 недель беременности) или позднее (после 34 недель беременности) начало, умеренные или тяжелые (систолическое кровяное давление  $\geq 160$  мм рт. ст., диастолическое кровяное давление  $\geq 110$  мм рт. ст.) клинические проявления,

HELLP-синдром. Одновременно могут наблюдаться: протеинурия (5 г / 24 часа), олигурия, неврологические симптомы, нарушения функции печени, тромбоцитопения (менее 100 000 в 1 куб. мм).

**Эпидемиология:** частота преэклампсии варьирует в широких пределах (3–21%) [Айламазян Э. К., Кулаков В. И., Савельева Г. М. и др., 2011; Gupta H. P., 2011] в международном исследовании выявили общую распространенность преэклампсии в среднем 2,2% в диапазоне от 1,4% в странах Ближнего Востока и до 3,9% в африканском регионе. В других исследованиях [Daskalopoulou S., 2012; Head G. A., 2012] эта патология встречалась в пределах от 1,2% до 8,4%.

В материалах ВОЗ, состоящих из 129 исследований, охватывающих около 39 миллионов беременных из 40 стран мира (2002–2010 годы), общая частота заболеваемости преэклампсии составила 2,3%. В 4,6% она встречалась при пересчете на основе модели с учетом неполных данных из некоторых регионов. По данным [Rey E., 2009] в пределах 1,2% преэклампсия регистрировалась на Ближнем Востоке, до 4,2% – наблюдалась в Западной части Тихого океана. Тем не менее, существуют значительные межрегиональные различия: от 0,7% в Марокко до 15,6% в исследовании в Турции. Если ограничить оценки только общенациональными исследованиями, данные были получены [Abalos E., 2013] 1–7 из семи стран, в общей сложности распространенность преэклампсии составляет 1,4–4,0%.

В «Norwegian National Birth Registry» (в Норвежском Национальном реестре рождения) с 1967–2008 гг. частота преэклампсии составила 2,8% [Ananth S. V., Keyes K. M., Warner R. J., 2013]. В 2,2% – по данным из Южной Кореи [Cho G. Y., 2015]. Региональные популяционные данные Канады, США и Австралии свидетельствуют о том, что преэклампсия обнаруживалась в этих странах от 1,3 до 3,4% [Denolle T., 2001; Whilton A., 2007; Rey E., 2009].

Среди нерожавших, более взрослых беременных с аутоиммунными нарушениями наблюдается более высокий уровень преэклампсии [Adane A., 2014; Baragou S., 2014]. Помимо этого, у пациенток с ранее регистрируемыми метаболическими, сосудистыми или почечными заболеваниями, особенно во

время беременности, наблюдался повышенный риск развития преэклампсии [Olusanya B. O., 2011].

Несмотря на обширные исследования в области профилактики и лечения преэклампсии, современные терапевтические подходы до настоящего времени не приводят к решению этой важной проблемы. Препараты против гипертонии, кортикостероиды для созревания легких, сульфат магния не способны предотвратить ухудшение синдрома и приступы эклампсии. Симптомы могут быть замедлены на короткий срок, чтобы имелась возможность пролонгировать беременность и завершить роды более зрелым плодом. Однако материнские риски должны быть тщательно взвешены и не входить в конфликт возможных эмбриональных преимуществ, поскольку риск фатального ухудшения материнского и/или эмбрионального состояния здоровья достаточно высок. Профилактические методы лечения – витамины, антиоксиданты, кальций с дополнением фолиевой кислоты, аспирин – до сих пор не оказались эффективными в профилактике преэклампсии в группах высокого риска [Verburg P. E., 2015; Morikawa M., 2014; Hayes D. K., 2014; Mehrabadi A., 2014; Nerenberg A., 2013].

Единственным радикальным решением проблемы преэклампсии является родоразрешение, удаление плаценты с негативным последствием рождения недоношенного ребенка. До настоящего времени преэклампсия остается основной причиной материнской и перинатальной смертности и заболеваемости во всем мире.

**Плацентарная недостаточность** – это синдром, возникающий в результате сложной реакции плаценты и плода. Он обусловлен морфофункциональными изменениями в плаценте и нарушениями компенсаторно-приспособительных механизмов.

Плацентарная недостаточность является одной из наиболее распространенных осложнений беременности, встречающаяся при невынашивании в 50–77%, при ПЭ – в 48–55%, у беременных с воспалительными заболеваниями мочевыделительной системы 34%, с анемией – 32%, с сердечно-

сосудистыми заболеваниями – 37–45%, с эндокринной патологией – у 24%, у беременных, перенесших вирусную и бактериальную инфекцию, более чем в 50–60% наблюдений. ПН приводит к задержке роста плода, частота которой варьирует в широком диапазоне: от 5 до 22%. Плацентарная недостаточность не приводит к материнской смертности, однако перинатальная смертность у пациенток, перенесших плацентарную недостаточность, составляет среди доношенных новорожденных 10%, среди недоношенных – до 49%. Плацентарная недостаточность приводит к задержке роста плода, частота которой варьирует в широком диапазоне: от 5 до 22%.

Классификация: различают первичную и вторичную плацентарную недостаточность.

Первичная недостаточность плаценты возникает в период имплантации, раннего эмбриогенеза и плацентации. Вызывают ее разнообразные вредные факторы (генетические, эндокринные, инфекционные и т.д.), действующие на гаметы родителей, зиготу и бластоцисту, формирующуюся плаценту и половой аппарат. Она характеризуется анатомическими нарушениями, строением, созреванием плаценты и распространенными нарушениями кровообращения с материнских и плодовых ее частей.

Вторичная плацентарная недостаточность также характеризуется распространенными нарушениями кровообращения с материнской и плодовой частей плаценты и неспецифическими морфологическими повреждениями, такими как преждевременное созревание стромы и инволютивно-деструктивное изменение структурных элементов ворсинчатого хориона и децидуальной ткани.

По характеру возникновения различают три формы плацентарной недостаточности:

- 1) гемодинамическую, проявляющуюся в маточно-плацентарном и плодово-плацентарном кровообращениях;
- 2) плацентарно-мембранную, характеризующуюся снижением способности плацентарной мембраны к транспорту метаболитов;

3) клеточно-паренхиматозную, связанную с нарушением клеточной активности трофобласта и плаценты.

В клинике редко удается выявить изолированное нарушение одной из указанных выше структур плаценты, поскольку они тесно связаны между собой, и нарушение одной из них неизбежно влечет за собой изменения в других звеньях. Причиной плацентарной недостаточности могут быть эндогенные и экзогенные факторы. К первым относятся нарушение формирования плаценты. При этом первично может развиваться сосудистая и ферментативная недостаточность, обусловленная нарушениями гормональной функции яичников, изменениями в миометрии и эндометрии, влиянием курения и других генетических и вредных факторов окружающей среды.

#### **Роль плацентарной недостаточности в возникновении преэклампсии.**

Точное происхождение преэклампсии остается до настоящего времени невыясненным. Как полагают [Smid M., 2001, Zhong X. Y., 2001, Levine R. J., 2004], главная роль в ее возникновении принадлежит плаценте и ее патологии. Плацентарная недостаточность регистрируется при многих заболеваниях беременных и связана с чрезмерным плацентарным трофобласт апоптозом. Недавние достижения в этой области представляют собой диагностический потенциал конкретных молекулярных биомаркеров и их возможное внедрение для прогнозирования в диагностических алгоритмах плацентарной недостаточности. Данная гипотеза свидетельствовала о том, что преэклампсия развивается в результате некоторой недостаточной иммунной адаптацией между матерью и плодом в течение самых первых недель беременности, приводя к развитию бессимптомных нарушений и местным, отклонением от физиологических, плодово-материнским иммунным взаимодействиям в стенке матки, которые приводят к артериальной инвазии трофобластными клетками. Это вызывает преобразование спиральных артерий и впоследствии ухудшает плацентарную перфузию. Хроническая гипоксия или периоды гипоксия/реоксигенация в межворсинчатом пространстве, вызывают оксидантный стресс ткани и увеличивают уровень плацентарного апоптоза и некроза [Sekizawa



А., 2004; Leung T. N., 2001]. Клинические нарушения возникают тогда, когда материнские сосудистые и иммунные системы не могут больше взаимодействовать с увеличенной потерей плацентарным образом абберантных провоспалительных, антиангиогенных факторов, приводя к системной дисфункции эндотелиальной клетки и высокой воспалительной реакции [Zhong X. Y., 2002; Farina A., 2004]. Недавно эта гипотеза нашла свое подтверждение [Lo Y. M., 1998].

Однако происхождение преэклампсии не могло бы быть ограничено альтерацией трофобласт дифференцирования, и в некоторых случаях зависело от основных материнских конституционных факторов, таких как генетические, ожирение, дисфункциональный материнский клиренс или воспаление [Gonzalez-Gonzalez C., 2005].

При преэклампсии и плацентарной недостаточности, прежде всего, происходит нарушение кровообращения. Нарушения кровообращения в акушерской практике возникают так же, как и в других областях медицины: за счет функционального расширения или сужения сосудов и закупорки их просвета в виде атеросклероза, тромбоза или эмболии. При этом если страдают материнские сосуды, то повреждается маточно-плацентарное кровообращение, при патологических процессах в плаценте – фето-плацентарное кровообращение. Чаще всего эти процессы происходят одновременно.

Как известно, все живое состоит из множества клеток, поддерживающих упорядоченность своей организации за счет содержащейся в ядре генетической информации. Она сохраняется, реализуется и передается сложными высокомолекулярными соединениями – нуклеиновыми кислотами, состоящими из моно мерных звеньев – нуклеотидов. Роль нуклеиновых кислот невозможно переоценить. Стабильностью их структуры определяется нормальная жизнедеятельность организма, а любые отклонения в строении неминуемо приводят к изменению клеточной организации, активности физиологических процессов и жизнеспособности клеток в целом.

вкДНК поэтому может являться маркером мониторинга осложнений, связанных с беременностью, таких как преэклампсия и плацентарная недостаточность. В этом случае определяют не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК материнской крови или вкДНК плода. В составе вкДНК плазмы крови матери вкДНК плода не превышает 10% от общего количества вкДНК. Основным источником вкДНК плода в крови матери считают гибнущие в результате некроза или апоптоза клеток плаценты [Smid M., 2011]. Обнаружена высокая корреляция между концентрацией в плазме матери последовательностей материнского генома и вкДНК плода [Lo Y. M., 1999].

**Молекулярно-биологическая основа преэклампсии.** Как известно, преэклампсия является материнской реакцией на патологическую плацентацию. Так как плацента непрерывно реконструируется во время беременности, внеклеточные нуклеиновые кислоты эмбрионального и плацентарного происхождения могут быть обнаружены в материнском кровообращении в ходе нормальной беременности.

Плацента представляет собой сосудистую структуру с первичным ворсистым слоем цитотрофобластных (недифференцированных) и синцитиотрофобластных (дифференцированных) клеток. Внутренние вторичные ворсинки образованы мезенхимными клетками, макрофагами, фибробластами и клетками крови плода. Синхронной васкуляризации плаценты принадлежит центральная роль в трансплацентарном обмене между матерью и плодом. Это достигается посредством нескольких этапов, васкулогенеза (образования новых кровеносных сосудов) и ангиогенеза (роста новых кровеносных сосудов). Фенотип цитотрофобласта изменяется от эпителиального до эндотелиального типа и называется псевдо васкулогенезом [Mutter W. P., Karumanch S. A., 2008]. Спиральные артерии матки подвергаются модификациям для облегчения притока крови к плаценте [Whitley G. S., Cartwright J. E., 2010]. С этой целью клетки цитотрофобласта плаценты последовательно дифференцируются в ворсистый трофобласт (EVT) и вторгаются в децидуа спиральных артерий, а затем миометрий. Этот процесс связан с экспрессией молекул, находящихся на

поверхности, таких как: хемокиновый рецептор (CCR10), адгезии сосудистых клеток ( $\alpha\beta 4$ ,  $\alpha V\beta 6$ , E-cadherin, CD324 в  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 1\beta 1$ , VE-cadherin, CD 144, VCAM-1, CD106, ECAM-1, адгезии тромбоцитов CD31, протеолитических ферментов MMP, матричных металлопротеиназ 1, 2, 3, 9 и 14 и катепсинов. Все это приводит к деградации внеклеточного матрикса. По данным [Laresgoiti-Servitje E., Gomez-Lopez N., Olson D. M., 2010; Cartwright J. E., Fraser R., Leslie K., 2010], активатор урокиназного плазминогена (сериновая протеаза) активирует MMP и вызывает миграцию трофобластов. [Laresgoiti-Servitje E., Gomez-Lopez N., Olson D. M., 2010; Cartwright J. E., Fraser R., Leslie K., 2010] установили, что в процессе миграции трофобласт взаимодействует с несколькими типами клеток, такими как естественные киллерные клетки матки (uNK), стромальные клетки, лимфоциты, иммунные клетки и др. Физиологический процесс модификации артерий зависит от сбалансированного взаимодействия между несколькими цитокинами и сопутствующей экспрессией рецепторов, активаторов и ингибиторов трофобласта. uNK-клетки выделяют цитокины, такие как IL10, IL8, гранулоцитарный макрофагальный колонии стимулирующий фактор (G-CSF1 и 2) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF) [Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y. et al., 2006]. Кроме того, клетки uNK активируют «про» и «анти» ангиогенные факторы, трансформируют: фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста плаценты (PGF). uNK-клетки также способствуют инвазии путем взаимодействия со следующими рецепторами: киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR), рецепторы гетеродимералектина С-типа (CD94 иNKG), рецепторы цитотоксичности естественного киллера (NCR) и транскрипты, подобные иммуноглобулину (ILT) с молекулами класса IHLA (человеческого лейкоцитарного антигена), выраженными на EVT как HLA-G, HLA-C и HLA-E. Патологические нарушения во всех этих взаимодействиях приводят к изменению продукции цитокинов, снижению секреции MMP и сохранению пролиферативного трофобласта вместо инвазивного фенотипа. Ремоделирование спиральных артерий бывает настолько изменено, что в конечном итоге нарушенная плацентация приводит к преэклампсии.

Недостаточное кровоснабжение плаценты вызывает хроническую гипоксию в межворсинчатом пространстве, генерирует окислительный стресс, приводящий к плацентарному клеточному апоптозу с преувеличенными воспалительными реакциями.

**Ангиогенные факторы.** Ангиогенез – это образование кровеносных сосудов из ранее существовавших. Он является важным шагом плацентарной васкуляризации, и опосредуется синергическим действием про- и антиангиогенных факторов. Факторы роста VEGF и плаценты (PlGF) являются первыми, тогда как рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 относятся к последним. VEGF взаимодействуют с антиангиогенными рецепторами, тогда как PlGF связывается только с VEGFR-1. Они помогают в образовании кровеносных сосудов и регулируют функции трофобластов. VEGFR-2 является киназным доменным рецептором (KDR), Flk-1 – фетальной киназой печени-1, VEGFR-1 – fms-подобный рецептор тирозинкиназы 1 (Flt-1). Растворимый эндоглин (sEng), еще один антиангиогенный фактор – усеченная форма эндоглина. sEng обнаруживается в синцитиотрофобласте и эндотелиальных клетках и образует корецептор в трансформирующем факторе роста (TGF)  $\beta$ 1 и  $\beta$ 3. Он регулирует производство NO, сосудорасширяющего средства. Растворимая форма Flt-1 (sFlt-1), секретированная из плаценты, связывается с VEGF и PlGF и является вариантом сращивания Flt-1. Результаты [Polsani S., Phipps E., Jim B., 2013; Staff A.C., 2011; Carty D. M., Delles C., Dominiczak A. F., 2008] свидетельствуют о том, что плацентарные антиангиогенные факторы в материнском кровообращении вызывают нарушения в эндотелии сосудов матки и гипертонию. При беременности с преэклампсией наблюдаются низкие значения VEGF и PlGF и повышенные уровни sFlt-1 и sEng в материнской циркуляции. Эти антиангиогенные белки в плаценте связывают и нейтрализуют VEGF и PlGF, которые влияют на гомеостаз эндотелиальных клеток и вызывают клинические симптомы преэклампсии. Изменение этих белков было замечено и до появления клинических симптомов. Несколько отчетов поддерживают PlGF в качестве раннего предсказателя, тогда как многие исследования не могут доказать эти

отношения. Низкие значения PlGF наблюдались на 15–19-й и 17–21-й неделях у беременных, которые позже развивали преэклампсию. [Polsani S., Phipps E., Jim B., 2013] были опубликованы разнородные отчеты о VEGF в прогнозировании преэклампсии. В исследованиях сообщалось о 2-м триместре предсказания заболевания, тогда как другие исследования могли прогнозировать правильно только в течение 5 недель развития болезни. Тем не менее, другие группы не смогли обнаружить концентрации VEGF ниже  $< 30$  пг / мл. sFlt-1 и sEng – два антиангиогенных фактора, которые показали высокий уровень циркуляции до появления клинических симптомов. Повышение sFlt-1 обнаруживалось даже до 5-6 недель клинической фазы, тогда как sEng всплывал от 2 до 3 месяцев и далее. Изменение обоих пептидов коррелировали с тяжестью заболевания. Levine et al. предположили, что отношение sFlt1: PlGF и (sFlt 1 + sEng): PlGF может быть лучшим предиктором преэклампсии [Staff C., 2011; Grill S., Rusterholz C., Zanetti-Dallenbach R. et al., 2009]. Развитие маточно-плацентарного кровообращения требует сложного взаимодействия между pro-angiogenic сосудистым фактором эндотелиального роста (VEGF) и плацентарным фактором роста (PlGF) с их родственными рецепторами VEGF 1 (VEGFR-1, и VEGFR-2) [Pare E., 2006]. Известно, плацента – богатый источник этих факторов [Bodnar L. M., 2000; Feig D.S., 2006; Bigelow C.A., 2013]. В дополнение к регулированию гомеостаза кровеносного сосуда VEGF, PlGF и flt-1 рецепторы являются ключевыми компонентами в регулировании выживания трофобласта и сохранения его функции [Lecarpentier E., 2013; Bramham K., 2012].

Плацентарные клетки также секретируют изоформу flt-1, которая производится посредством альтернативного соединения РНК посредника и действует как антиангиогенный фактор, взаимодействуя и нейтрализуя PlGF и VEGF [Hirose N., 2014]. Есть убедительные доказательства [Goodwin A. A., 2005; Combs C. A., 1993; Bramham K., 2011, Spracklen C. N., 2014; Lin J., 2005], что более высокий уровень sflt-1 снижает уровень PlGF и VEGF при повторенных исследованиях у пациентов с преэклампсией. На основании этого делается предположение, что часть избытка циркулирующего sflt-1 происходит от

плаценты [Cohen D., 2010]. Уровни sflt-1 в материнской крови возрастают с нарастанием симптомов преэклампсии, тогда как VEGF и PlGF были уменьшены у больных с тяжелыми симптомами по сравнению с нормальными беременными или у пациентов со слабо выраженными симптомами преэклампсии [Goodwin A. A., 2005; Combs C. A., 1993; Abou-Nassar K., 2011]. Изменения в sflt-1 и PlGF были более явными в начале заболевания по сравнению с поздними проявлениями преэклампсии [Abou-Nassar K., 2010]. У беременных крыс внешнее введение sflt-1 инициировало гипертонию и протеинурию, сходны признакам преэклампсии [Goodwin A. A., 2005]. На основании этого было сделано заключение о том, что материнская эндотелиальная дисфункция при преэклампсии вызывается неустойчивостью уровней, циркулирующих ангиогенных факторов. Отклоняющиеся уровни плазмы или сыворотки sflt-1, VEGF и PlGF действительно могут свидетельствовать о скрытом течении преэклампсии [Lisonkova S., 2013; Skjaerven R., 2002; Mostello D., 2008; Trogstad L., 2009; Xiong X., 2002; Trogstad L., 2004].

Во время беременностей с нормальным давлением уровни sflt-1 остаются относительно стабильными до 8 недели беременности, затем они постоянно увеличиваются. Было зарегистрировано более явное увеличение sflt-1 во время беременностей, заканчивающихся преэклампсией, которое может являться скринингом приблизительно за 5–8 недель до того, как возникнут признаки преэклампсии [Xiong X., 2002; Trogstad L., 2004].

**Разрешимый Эндо-Глин.** Эндо-Глин (Инженер) является корцептором для преобразования фактора роста (TGF)- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3, которые находятся на сотовых мембранах сосудистого эндотелия и синцитиотрофобласта [Andersgaard A. B., 2012; Magee L. A., 2014]. Он функционирует как модулятор сигнализации TGF- $\beta$  и включается в развитие кровеносных сосудов и регулирование сосудистого тонуса [Magee L., 2015; Sibai B., 2000]. Циркулирующая форма эндоглина состоит из дополнительной сотовой части молекулы, которая образуется путем протео-разламывания плацентарной ограниченной мембраной формы, определяется во время нормальной беременности и при преэклампсии [Bdolah Y.,

2008]. В пробирке sEng действует как отрицательный регулятор развития кровеносных сосудов в конкурентном взаимодействии с TGF- $\beta$ , повреждая капиллярное формирование эндотелиальными клетками. Кроме того, это вызывает высокое артериальное давление и сосудистую проницаемость у беременных крыс, у которых наблюдалась протеинурия. Введение sEng и sflt-1 беременным животным вызвало почечные, плацентарные и печеночные изменения, напоминающие HELLP-синдром [Bdolah Y., 2008].

Эндо-Глин (Инженер) наблюдается в избытке у пациентов с преэклампсией по сравнению с таковыми с нормальным давлением, и его концентрации увеличиваются с появлением признаков преэклампсии, HELLP-синдрома [Bdolah Y., 2008; Vatten L. J., 2004].

Предварительное исследование [Aliyu M.H., 2012] позволило выдвинуть гипотезу о том, что sEng может оказаться полезным в дифференциальной диагностике преэклампсии от других гипертонических болезней беременности, таких как гестационная или хроническая гипертензия. Повышение концентрации в крови sflt-1, sEng наблюдаются в течение первых 2 месяцев нормальной беременности. При беременности с преэклампсией увеличение sflt-1 sEng происходит ранее и более выраженное [Thomopoulos C., 2013; Opdahl S., 2015; Minassian C., 2013; Conde-Agudelo A., 2008]. Различие становится значительным за 9–11 недель до клинических признаков преэклампсии.

**Р-селектин.** При преэклампсии преобладают воспалительные реакции и нарушения эндотелия. Пентаксин-3 (PTX3) представляет собой белок, обнаруживаемый в амниотическом эпителии, хорионической мезодерме, периваскулярной строме, децидуальных клетках и концевых ворсинах плаценты [Akolekar R., Casagrandi D., Livanos P. et al., 2009]. Повышенные уровни PTX3 при преэклампсии объясняются воспалительными реакциями на болезнь. PTX3 связывается с апоптозными клетками и уменьшает иммунные реакции матери на беременность. Высокие значения PTX3 на 11–14-й неделях были указаны в ранних стадиях преэклампсии, но не для групп позднего начала – гестационной гипертензии и ограничения роста плода (FGR). Такое предположение, по данным

[Grill S., Rusterholz C., Zanetti-Dallenbach R. et al., 2009; Akolekar R., Casagrandi D., Livanos P. et al., 2009], не соответствовало нарушениям перфузии плаценты, определенным с помощью доплерометрии. P-селектин представляет собой молекулу клеточной адгезии, экспрессируемую в эндотелиальных клетках и тромбоцитах, которая модулирует воспалительные реакции. Он действует как рецептор связывания лейкоцитов с активированными тромбоцитами и эндотелием. Высокая концентрация этого белка обнаружена [Bosio P. M., Cannon S., Mc Kenna P. J. et al., 2001] в течение 10–14 недель беременности, осложнившейся преэклампсией. Это объясняется увеличением активации тромбоцитов и адгезией нейтрофил – эндотелия, возникшей в первые недели преэклампсии. Однако вместе с актином-A и сосудистым эндотелиальным рецептором фактора роста (VEGFR) частота обнаружения составляла всего 59%. Гармоничное действие вазодилататоров и вазоконстрикторов нарушается при патологиях плаценты. Оксид азота (NO) является основным вазодилататором плаценты. Ассиметричный диметиларгинин (ADMA) обратимо ингибирует синтез закиси азота, и высвобождение NO вызывает эндотелиальную дисфункцию. Следовательно, нормальная беременность демонстрирует снижение уровня циркулирующей ADMA в плазме матери. Симптомы преэклампсии [Braekke K., Ueland P. M., Harsem N. K. et al., 2009] обнаружили при нарушениях сосудистых компонентов плаценты и высоком уровне селектина – молекул адгезии поверхностных клеток. Процесс адгезии осуществляется тромбоцитами и эндотелиальными клетками при возникновении воспалительных реакций, поддерживая активацию циркулирующих лейкоцитов, играющих важную роль в коагуляции как фактора ткани – тканевого тромбопластина. В образовании преэклампсии большая роль принадлежит обширной активации тромбоцитов [Robillard P., 1994; Olayemi O., 2010; Rigo J., 2006]. Эти микрочастицы с прокоагулянтной активностью, образующиеся из активированных тромбоцитов, были также обнаружены в периферической крови пациентов с преэклампсией [Myklestad K., 2011; England L., 2007]. Кроме того, P-селектин наблюдается в более высоких концентрациях в сыворотке или плазме этих пациентов [Perni



U. C., 2012; England L. J., 2013; Wikstrom A., 2012]. Недавно было показано, что изменение уровней растворимого Р-селектина перед 20 неделями беременности предшествуют симптомы преэклампсии [Aune D., 2014; Shand A., 2010; Vodnar L. M., 2007]. Повышенная концентрация растворимого Р-селектина предшествовала ранним и еще бессимптомным нарушениям материнской сосудистой системы.

**Внеклеточная ДНК.** Обычно плацентация включает апоптоз клеток трофобласта. Во время этого процесса фетальная ДНК высвобождается в кровообращение матери. Внеклеточный фетальный (cffDNA) предложен [Lo Y. M., Corbetta N., Chamberlain P. F. et al., 1997] в качестве маркера в пренатальном диагнозе. После этого было проведено множество исследований, чтобы определить его источник, персонажи, диагностический и прогностический потенциал. [Lo Y. M., Corbetta N., Chamberlain P. F. et al., 1997] было доказано, что CffDNA обнаруживается с 9 недель беременности и увеличивается с ее развитием. cffDNA в плазме беременных пациенток составляет около 3–6% от общей бесклеточной ДНК в материнской циркуляции. Концентрация cffDNA быстро снижается в процессе беременности и не обнаруживается через 2 часа после родов. Следовательно, предыдущие осложнения беременности не влияют на результаты. На сегодняшний день cffDNA оценивается по максимуму для пренатального скрининга анеуплоидии, одиночных генных расстройств, хромосомных aberrаций, связанных с плацентами расстройств и резус-фактора. Немногие исследования также продемонстрировали увеличение эмбриональной ДНК у беременных с симптоматической преэклампсией. Прогностический статус cffDNA в преэклампсии теперь с энтузиазмом изучается. Эксперименты по количественному определению и детектированию cffDNA были первоначально сделаны Y-хромосомными маркерами. По этой причине исследования были ограничены только беременными с мужским плодом. Открытие эпигенетических маркеров, специфичных для плода, улучшило его осуществимость в неинвазивной пренатальной диагностике. Промотор гена RASSF1A может быть гиперметилирован в плаценте и гипометилирован в материнских клетках крови,

является перспективным маркером для анализа cffDNA. По данным [Chan K. C., Ding C., Gerovassili A. et al., 2006], метил-чувствительное рестрикционное ферментативное расщепление можно использовать для обнаружения гиперметилированных RASSF1A-рецепторов плаценты в материнской плазме. В исследовании [Seema S., Sahai K., Aroga D. et al., 2016] с использованием гиперметилированного RASSF1A наблюдалось одновременное увеличение гестационного возраста и гиперметилированного RASSF1A в плазме крови здоровых беременных. Последовательные значения cffDNA были получены с раннего второго триместра до развития преэклампсии. Количественное определение cffDNA с маркером, специфичным для плода, является многообещающим подходом к ранней диагностике преэклампсии.

С момента обнаружения ДНК в материнской плазме были проверены атравматичные диагностические способы. Они включали качественные исследования при определении эмбрионального статуса Резуса [Achkar M., 2014; Poston L., 2006; Villar J., 2009], эмбриональных точечных мутаций [Kurki T., 2000]; эмбриональных аномалий, например, эмбрионального ограничения [Yu Y., 2013], роста, полигидрамниона [Endeshaw M., 2015]; трисомии [Bilano V., 2014; Gillon T. E., 2014; Park F. J. et al., 2013] или преждевременных родов [Conde-Agudelo A., 2004]. О ценности cffDNA в материнской плазме как индикатора для преэклампсии сначала сообщил Ло и др. в мелкомасштабном исследовании. В плазме 20 беременных с преэклампсией против 20 пациентов из группы здоровых в третьем триместре концентрация cffDNA была увеличена приблизительно в 5 раз [Leslie K., 2011]. Тот же самый эффект наблюдался во второй триместр в исследовании Чжуна и др. у 10 беременных с преэклампсией против 40 в группе здоровых [Thangaratinam S., 2011].

До сих пор самое большое исследование в той области проводилось Левином и др. Было обследовано 120 с преэклампсией и 120 нормальных беременных. В результате проведенных исследований было обнаружено пятикратное увеличение cffDNA, начиная с 17-й недели примерно за три недели до начала преэклампсии [Payne B. et al., 2011]. Поскольку количество

эмбриональной ДНК обычно определяется по количеству Y-хромосом, определенные последовательности, например, SRY (область определения пола Y) и DYS [Carvajal D., Rowe P., 2010], альтернативные подходы были проверены, чтобы преодолеть это ограничение. Увеличение свободной ДНК наблюдалось у пациенток с преэклампсией в течении беременности [Cnossen J. S., 2008] и перед началом преэклампсии [Kuc S., 2013; Gallo D., 2014].

В настоящее время выполняются несколько многофокусных исследований, чтобы подтвердить прогнозирующую ценность cfDNA для предсказания преэклампсии в сочетании с другими потенциальными маркерами, например, P-селектин, PAPP-A, PP 13, sflt-1, sEng, PlGF.

**Плацентарные белки.** Роль протеаз очень важна в процессе ремоделирования развития плаценты. Две цинкзависимые металлопротеазы, связанные с беременностью, плацентарный белок А (PAPP-A) и ADAM12 (дезинтегрин и металлопротеаза 12) расщепляют инсулиноподобный фактор роста (IGF), связанный с его связывающим белком (IGFBP), и увеличивают его биодоступность. IGF регулирует перенос аминокислот и глюкозы в плаценту и вызывает вторжение трофобластов. PAPP-A секретируется синцитиотрофобластом и, концентрация его увеличивается по мере развития беременности [Christians J. K., Beristain A. G., 2016]. В настоящее время он используется как маркер скрининга первого триместра для синдрома Дауна. Были отмечены низкие значения как PAPP-A, так и ADAM12 в течение 11–14 недель беременности в процессе развития преэклампсии. В литературе имеются отчеты [Staff A. C., 2011; Goetzinger K. R., Zhong Y. et al., 2013], не подтверждающие этот феномен. С другой стороны, в сочетании с другими плацентарными белками, такими как pp-13 и PlGF и Допплера маточной артерии, показали лучшее предсказание. Низкие значения PAPP-A в ранних триместрах также связаны с осложнениями беременности, такими как спонтанный выкидыш, отслойка плаценты, хромосомные аномалии и IUGR. Для ADAM12 изменения были замечены [Staff A. C., 2011] при IUGR и анеуплоидии. Синхронный акт цистеиновых протеаз и его ингибиторов имеет важное значение для деградации

матриц, что является решающим этапом в трофобластной инвазии. Цистатин С ингибитор цистеиновых протеаз (катепсины В и L), экспрессируется в трофобластах и децидуальных макрофагах. Значения сыворотки цистатина С, как известно, являются высокими в преэклампсии, по-видимому, из-за основных эндотелиальных изменений. Наряду с  $\beta$ 2-макроглобулином цистатин С мог достоверно прогнозировать преэклампсию в группе из 30 пациентов. Высокие значения цистатина С наблюдались в течение 15–20 недель беременности у пациентов, впоследствии у которых развивалась преэклампсия [Kristensen K., Larsson I., Hansson S. R., 2007; Carty D. M., Delles C., Dominiczak A. F., 2008]. Плацентарный белок, pp-13, из семейства галектинов, широко изучается для прогнозирования преэклампсии. pp-13 присутствует в синцитиотрофобласт фето материнского вмешательства. Из-за углеводов связывающего домена и аффинности  $\beta$ -галактозидов pp-13 опосредует иммунологические функции и поддерживает развитие плаценты / ремоделирование сосудов [Carty D. M., Delles C., Dominiczak A. F., 2008]. Поэтому pp-13 обнаруживается при преэклампсии даже на 9–12-й неделе беременности. В сочетании с показателями доплерометрии в маточной артерии pp-13 имел 90%-й уровень обнаружения. Те же показатели с PAPP-A, по результатам [Carty D. M., Delles C., Dominiczak A. F., 2008; Grill S., Rusterholz C., Zanetti-Dallenbach R. et al., 2009], демонстрировали чувствительность и специфичность в 91% случаях в первом и втором триместрах при преэклампсии.

**Плацентарные гормоны** являются еще одним вероятным набором предикторов преэклампсии. Гормональная роль при осложнениях беременности была хорошо рассмотрена Reiset al. Недостаточность кровообращения в спиральных артериях, по результатам [Reis F. M., D'Antona D., Petraglia F., 2002], приводила к гипоксии и последующей гиперплазии трофобласта. Это высвобождало плацентарные гормоны в материнскую циркуляцию. Человеческий хорионический гонадотропин (ХГЧ) является основным гликопротеиновым гормоном, секретлируемым синцитиотрофобластом. Он помогает в поддержании желтого тела, способствует продуцированию прогестерона, индуцирует ангиогенез, выявляет дифференциацию цитотрофобласта, а также помогает в

защите мигрирующего трофобласта. Высокая концентрация ХГЧ ( $> 2,0$  ммоль) в материнской плазме была зарегистрирована во втором триместре случаев преэклампсии. Однако эта ассоциация рассматривалась только у многодетных пациенток в другом исследовании. Увеличение ХГЧ может быть вызвано аномалиями развития плаценты и последующей реактивной гиперплазией синцитиотрофобласта. Это также может быть связано с гиперсекреторным состоянием трофобласта в ответ на гипоксию при преэклампсии [Reis F. M., D'Antona D., Petraglia F., 2002].

**Ингибин-А и активин-А** представляют собой два трансформирующих члена семейства факторов роста, высвобождающихся из плаценты, децидуа и эмбриональных мембран. Они участвуют в развитии дифференцировки клеток плаценты и трофобласта, а также продукции гонадотропинов [Reis F. M., D'Antona D., Petraglia F., 2002; Staff A. C., 2011]. Оба одновременно увеличиваются в кровообращении. Активин стимулирует синтез ХГЧ, что, в свою очередь, вызывает секрецию ингибина. Повышенные уровни ингибина-А и активина-А обнаружены и во втором триместре беременности, которая впоследствии закончилась преэклампсией. В течение 15–19 недель ингибин оказался более чувствительным, чем активин А, тогда как в 21–25 недель чувствительность была больше для активина А. Имеются другие сообщения, которые предполагают прогностическую способность этих белков в первом и втором триместрах. Другой нейропептид, кортикотропин-релизинг-гормон (CRH), синтезируется плацентой, которая стимулирует выделение адренкортикотропин гормона (АКТГ). 27 CRH, обладающего эндокринными, паракринными и аутокринными функциями. Он действует как сосудорасширяющее средство и регулирует функции гипофиза у матери и плода. Увеличение CRH было обнаружено во втором триместре в случаях преэклампсии. CRH вместе с CRH-связывающим белком (CRH-ВР) улучшили прогноз преэклампсии.

**Роль дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) в превращениях вкДНК.** Дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I) – нуклеаза, катализирующая деградацию ДНК

в гиперчувствительных к нуклеазе сайтах генома, когда гены находятся в активной форме [Rieger R. et al., 1991]. ДНКаза I обнаруживается в моче и сыворотке человека [Ito K., 1984; Yasuda T., 1989]. В первую очередь, это пищеварительный фермент, который, однако, также обнаруживается в органах, не относящихся к пищеварительной системе, что указывает на плеiotропную биологическую роль фермента [Nadano D. et al., 1993]. Исследования с участием взрослых добровольцев показали, что изоформы ДНКазы I илиминируют ДНК из крови при апоптозе и могут выступать в качестве диагностических маркеров при некоторых заболеваниях, в т. ч. инфекционных и злокачественных [Yasuda T. et al., 1993]. Недавно было предложено применение рекомбинантной человеческой ДНКазы I при лечении муковисцидоза. ДНКаза I снижает вязкость мокроты, которая в течение нескольких минут превращается из нетекучего вязкого геля в текучую жидкость. При этом снижение вязкости мокроты ассоциировано с уменьшением размера ДНК [Shak S. et al., 1990; Aitken L. M., 1992]. ДНКаза I, обнаруживаемая в околоплодных водах, еще не изучена. Обнаружение активности ДНКазы I во втором и третьем триместрах беременности говорит о физиологической роли фермента при беременности. Во время родов при светлых околоплодных водах происходит небольшое статистически значимое снижение активности фермента по сравнению со вторым триместром. Были изучены также случаи, когда при светлых водах во время родов были зарегистрированы КТГ-признаки дистресса плода, однако это состояние, судя по всему, никак не влияло на активность ДНКазы I.

Вероятность того, что снижение активности ДНКазы I во время родов объясняется действием ее ингибиторов, содержащихся во влагалищных выделениях, мала, поскольку при мекониальных водах регистрировалось значительное повышение активности ДНКазы.

По сравнению со светлыми в мекониальных околоплодных водах содержится значительно больше ДНК. [Shak S. et al., 1990] считает, что увеличение активности ДНКазы I при мекониальном окрашивании околоплодных вод может играть защитную роль. Возможно, она заключается в профилактике

осложнений аспирации меконием за счет уменьшения длины ДНК, что приводит к уменьшению вязкости мекония, предотвращая закупоривание просвета мелких бронхов. Соответственно, ДНКазы I при аспирации мекониальными околоплодными водами оказывает действие, аналогичное эффекту рекомбинантной человеческой ДНКазы I при муковисцидозе [Shak S. et al., 1990; Aitken L. M. et al., 1992].

При этом рекомбинантную ДНКазу I можно использовать с лечебной и/или профилактической целью у новорожденных с аспирационным синдромом. Мекониальное окрашивание околоплодных вод – одна из наиболее распространенных и значимых проблем акушерской практики. Зеленые воды – признак хронического или острого дистресса плода, в том числе на фоне инфицирования околоплодных вод.

Околоплодные воды во втором и третьем триместре беременности в основном продуцируются почками плода. Точное происхождение амниотической ДНКазы I неизвестно, однако у взрослых этот фермент синтезируется поджелудочной железой и в наиболее высокой концентрации обнаруживается в моче [Love J. D., Hewitt R. R., 1979].

Полное отсутствие активности ДНКазы I в экстрактах послеродовой плаценты является свидетельством инактивации ДНКазы I в плацентарной ткани или отсутствием синтеза фермента плацентой.

ДНКазы I в акушерской практике практически не изучена. Также изучали щелочную ДНКазу сыворотки крови здоровых беременных. Щелочная ДНКазы в тканях человека представлена как минимум пятью изоферментами, основным из которых является ДНКазы I. Активность щелочной ДНКазы у беременных пациенток по сравнению с небеременными того же возраста была значительно снижена, что говорит о наличии ингибитора, либо о развитии регуляторных изменений на фоне беременности. Увеличение активности щелочной ДНКазы в сыворотке крови было зарегистрировано относительно второго в третьем триместре беременности. [Lundqvist-Avall E. et al., 1989; Poon L. C. Y. et al., 2013],

напротив, обнаружили значительное снижение активности ДНКазы I во время самопроизвольных своевременных родов при светлых околоплодных водах.

В околоплодных водах и плацентарной ткани человека изучалась также щелочная РНКаза. Ее повышенная активность была обнаружена в плацентарной ткани пациенток с низким социально-экономическим статусом, у которых впоследствии были небольшие дети [Velasco E. G. et al., 1975].

Кроме того, значительное повышение щелочной активности РНКазы наблюдалось у плодов с дефектами нервной трубки, по сравнению со здоровыми плодами во втором триместре беременности [Buamah P. K. et al., 1984]. Кроме того, было показано, что активность амниотической РНКазы снижается ближе к предполагаемой дате родов [Bissenden J. G. et al., 1979].

Обнаружение взаимосвязи между нуклеазами и цитокинами важно для понимания плеiotропной активности ДНКазы I. В частности, отсутствие интерлейкина-2 приводит к увеличению активности нуклеазы [Duke R. C., Cohen J. J., 1986], тогда как ДНКаза I ингибирует интерлейкин-1 [Svenson M., Bendtzen K., 1989; Rosenstreich D. L. et al., 1988]. С другой стороны, уровень интерлейкина-1 снижается в третьем триместре беременности по сравнению со вторым, а затем увеличивается с началом родов [Tsunoda H. et al., 1990; Romero R. et al., 1990; Opsjon S. L. et al., 1993].

### **Применение вкДНК в качестве маркера в пренатальной диагностике.**

Рутинные исследования, применяемые в пренатальной диагностике, включая хориоцентез, амниоцентез и кордоцентез, связаны с риском потери плода [Chiuand Lo, 2013]. В 1997 году впервые было показано наличие циркулирующей вкДНК эмбриона в плазме у беременной, когда обнаружили последовательность ДНК Y-хромосомы в материнской плазме [Urbanova M. et al., 2010]. Обнаружение внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме и сыворотке привело к созданию нетравматичных методов пренатальной диагностики, направленных на обнаружение патологии эмбриона и связанных с беременностью осложнений [Lo Y. M., 2013; El Messaoudi et al., 2013; Chiuand Lo, 2013; Barrett et al., 2011; Pinzani et al., 2010; Chan et al., 2005]. При усовершенствовании чувствительности и



специфичности методов детекции и анализа, вкДНК материнской плазмы оказалась маркером многих процессов, связанных с патологией беременности [El Messaoudi et al., 2013; Chiuand Lo, 2013; Tsuian Lo, 2012].

Анализ вкДНК позволяет проводить диагностику Резус-фактора D, состояния пола у плода, анеуплоидии, трисомии 21, 18, 13, эндокринных и неврологических нарушений плода [Gahan, 2013; Chiuand Lo, 2013; Yu Y. et al., 2013; Tsui et al., 2012; Hill et al., 2012]. Изменения концентрации вкРНК в материнской плазме связано с рядом осложнений беременности, таких как преэклампсия, геморрагия и многоводие [Tsui et al., 2012; Hill et al., 2012].

Успешная пренатальная диагностика заболеваний с менделеевским наследованием включает определение унаследованных родительских аллелей или мутаций в материнской плазме [Lo Y. M., 2013; Hahn et al., 2009]. Успешно диагностируются по вкДНК материнской плазмы такие аутосомно-доминантные заболевания, как ахондроплазия, миодистрофия и болезнь Хантингтона [Lo Y. M., 2013; Lo Y. M., Chiu R. W. et al., 2012; Tsui et al., 2012; Hahn et al., 2009]. В случае диагностики наследования аутосомно-рецессивных заболеваний анализ вкДНК позволяет исключить наследование врожденной гиперплазии надпочечников, муковисцидоза и бета-талассемии [Tsui et al., 2012]. В настоящее время проведен полногеномный сиквенс ДНК плода по вкДНК плазмы матери [Bianchiand Wilkins-Haug, 2014].

Плацентарная вкРНК, выделяемая из материнской плазмы, увеличивает количество маркеров патологии беременности и открывает новые горизонты для пренатальной диагностики, позволяя пренебрегать полом плода и разницей в полиморфизмах матери и плода [El Messaoudi et al., 2013]. Однако исследования вкРНК плаценты проводились на небольших выборках, для надежного определения анеуплоидии и заболеваний с менделеевским наследованием необходимы исследования широкого масштаба на больших когортах [El Messaoudi et al., 2013; Fox et al., 2012; Fernando et al., 2010].

[Gonzalez-Gonzalez C., 2005; Bauer M. et al., 2006] обнаружили высокую корреляцию между уровнем фетальной вкДНК, общим уровнем вкДНК и сроком беременности.

В предыдущих работах [El Messaoudi et al., 2013] сообщалось о повышении общего уровня внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови беременных с ЗРП. В настоящем исследовании был выше общий уровень вкДНК как у пациентов с ФПН, так и у пациентов с ЗРП другой этиологии по сравнению с контрольной группой. Это первое исследование, в котором проводилось сравнение групп пациенток с ЗРП различной этиологии.

При ФПН существенных различий общего уровня вкДНК между пациентками с преэклампсией (ПЭ) и без нее зарегистрировано не было. Следовательно, ПЭ не вызывает изменений общей концентрации вкДНК при ФПН.

В группе ФПН значимого повышения уровня фетальной вкДНК по сравнению с группами пациенток с ЗРП другой этиологии и контрольной группой (за исключением подгруппы пациенток в третьем триместре беременности) зарегистрировано не было. В исследовании [Alberry M. S. et al., 2009] гена DYS14 при ЗРП по сравнению с контрольной группой отмечается более высокий уровень фетальной вкДНК. Предполагалось, что за счет большего количества копий DYS14 в Y-хромосоме, в отличие от SRY (ген на Y-хромосоме, отвечающий за формирование организма по мужскому типу), будет получена более высокая чувствительность и точность. В [Caramelli E. et al., 2003] показано, что дискриминационный потенциал количественного определения вкДНК имеет значение только после 28 недель гестации. Концентрации фетальной вкДНК возрастают по мере увеличения срока беременности [Lo Y. M., 1998]. При беременности с ЗРП, которая не вызвана ФПН, на плаценту могут влиять такие факторы как инфекция [La Torre R. et al., 2006] или анеуплоидия [Wright A. et al., 2004], чем объясняется более высокий уровень фетальной вкДНК по сравнению с группой здоровых и сопоставимый уровень фетальной вкДНК по сравнению с группой пациенток с ФПН.

Почти 95% общего уровня вкДНК приходится на материнскую и только 5% – на фетальную вкДНК [Zdravkovic T. et al., 2005]. Увеличение общего уровня вкДНК можно объяснить только увеличением материнской вкДНК. ВкДНК может иметь эндотелиальное [Farina A. et al., 2003] или клеточное происхождение (из клеток крови) [Gupta A. et al., 2006].

Возможный механизм высвобождения вкДНК – апоптоз ворсин [Tjoa M. L. et al., 2006], в результате которого образуются микрочастицы трофобласта [Schneider H., Hahn S., 2004], которые приводят к нарушению функции эндотелия [Goswami D., Mercer B. M., 2006] и активации нейтрофилов с последующим высвобождением «нейтрофильных внеклеточных ловушек» [Gupta A. et al., 2006].

Активация эндотелиальных клеток была зарегистрирована при ЗРП [Johnson M. R., 2002] с изменением концентрации специфических эндотелиальных маркеров [Bretelle F. et al., 2001]. У пациенток с осложненной ЗРП беременностью существует также повышенный риск развития артериальной гипертензии или ишемической кардиомиопатии [Smith G. C. et al., 2001], что указывает на наличие повреждений эндотелия матери при изолированной ЗРП.

В настоящее время вкДНК плода в диагностических целях определяется при беременности мужским полом. Если суммарная вкДНК регистрируется во время беременности с пороговым значением 1,613 с/мл, то ставится диагноз ФПН, при этом чувствительность при диагностике составляет 78,95%, специфичность – 61,29% [Ferrazzi E. et al., 1999]. При беременности плодами женского пола такой закономерности не выявлено.

**Заключение по данным литературного обзора.** На основании данных литературы следует, что клиника преэклампсии в настоящее время не может описываться классической триадой симптомов (наличие гипертензии, отеков и протеинурии). Часто преэклампсия имеет скрытое течение, а тяжелое ее проявление наступает в 3-й триместр беременности или в родах. В последнее десятилетие диагностика преэклампсии разрабатывается на основании исследования в материнской крови молекулярно-биологических факторов, свидетельствующих о наличии патологического ангиогенеза и апоптоза. Однако

до настоящего времени не существуют маркеров, которые бы указывали на критическое состояние беременных, когда необходимо прерывать беременность. Материнские риски должны быть тщательно взвешены и не входить в конфликт возможных эмбриональных преимуществ при пролонгировании беременности, поскольку риск фатального ухудшения материнского состояния здоровья достаточно высок при тяжелой преэклампсии. Необходимы дальнейшие исследования для определения полезности количественной оценки вкДНК при преэклампсии, плацентарной недостаточности и ЗРП в качестве прогностического фактора или диагностического инструмента при пролонгировании или прерывании беременности.

## Глава 2. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Клиническая характеристика наблюдений

Настоящая работа выполнена в ЦПС и Р г. Москвы (главный врач – канд. мед. наук О. А. Латышкевич) и на кафедре акушерства и гинекологии педиатрического факультета (зав. кафедрой – академик РАН, профессор М. А. Курцер) ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

За период с 2017 по 2019 гг. нами в ЦПС и Р обследовано 207 пациенток из них 40 небеременных, 70 с нормальной беременностью, 57 с преэклампсией и 40 с ЗРП. Дефицит массы тела наблюдался у 11% пациенток, ожирение – у 12%.

**Таблица 1** – Этапы исследования

<i>Этапы исследования</i>	<i>Определение свойств в/ДНК</i>	<i>Количество наблюдений</i>
1-й этап – нормальная беременность	вкДНК/ДНКза1	– 40 небеременных волонтеров и – 40 беременных с физиологической беременностью
2-й этап – преэклампсия	вкДНК/ДНКза1, вк мт ДНК. отношение мтДНК/клет. мт ДНК	70 – здоровый контроль из них 34 обследованных в 24-36 нед. и 36 после 37 нед., 57 беременных с преэклампсией (35 – умеренная, 22 – тяжелая, 6 – критическая формы)
3-й этап – ЗРП	вкДНК/ДНКза1	Пациентки плацентарной недостаточностью, ЗРП, хронической гипоксией плода, несостоятельным рубцом на матке (срок гестации более 30 недель (N = 35–40)

Все пациентки были в возрасте 22–40 лет, проживающие в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. Группа 1 – небеременные, здоровые (N = 40), представляла студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров); группа 2 – пациентки (N = 70 – здоровый контроль) с нормально протекающей беременностью, которые обследовались минимум 2 раза: при сроке беременности от 24 до 36 недель (N = 34) и при сроке беременности более 37 недель (N = 15), у которых имелись полноценные данные вкДНК, пригодные для анализа, родившие здоровых детей без признаков гипоксии и ЗРП; 3-ю группу составили (N = 57) беременных с преэклампсией, у которых в 35 наблюдениях была умеренная и в 22 наблюдениях преэклампсия тяжелой формы (в 6 наблюдениях – критическая

форма). У пациенток с преэклампсией срок беременности при исследовании составлял до 36 недель у 23, больше 37 недель – у 34. У пациенток при умеренной ПЭ родилось 8 детей, при тяжелой ПЭ – 8 детей с ЗРП. В группу 4 объединены пациентки с проблемной беременностью с клиническими диагнозами: плацентарная недостаточность, ЗРП, хроническая гипоксия плода, несостоятельный рубец на матке (срок гестации более 30 недель, N = 40).

**Критерии включения в исследование:**

- 1) возраст пациенток 22–40 лет;
- 2) одноплодная беременность;
- 3) информированное согласие на участие в исследовании.

**Критерии исключения из исследования:**

- 1) хромосомные аномалии и пороки развития у плода и плаценты;
- 2) аномалии прикрепления и расположения плаценты;
- 3) многоплодная беременность;
- 4) онкологические заболевания;
- 5) острая фаза и обострение хронических инфекционных заболеваний;
- 6) аутоиммунные заболевания.

## **2.2. Клиническая характеристика наблюдений**

Изучение анамнестических данных проводилось на основании анализа преморбидного фона, характера перенесенных экстрагенитальных и гинекологических заболеваний, сопутствующей патологии, наследственной предрасположенности к ним.

У всех обследованных пациенток выявлен женский тип телосложения, вторичные половые признаки были развиты правильно. Детально характеризовался менструальный цикл (наступление менархе, продолжительность и объем кровопотери, наличие и выраженность болевых ощущений). Состояние репродуктивной функции оценивалось по паритету, особенностям течения беременностей, родов и послеродового периода, применению методов ВРТ.

Клиническое обследование и оценку гинекологического статуса проводили по общепринятой схеме.

Возраст наступления менархе у обследованных пациенток колебался от 10 до 15 лет. У каждой второй наблюдаемой появление первой менструации отмечено в 13–14 лет, у каждой четвертой беременной выявлено раннее появление первой менструации. Менструальный цикл установился сразу у каждой третьей беременной. Менструации были регулярными у подавляющего числа обследованных пациенток. У 39 беременных менструальная функция до беременности была нарушена в виде дисменореи. При этом альгоменореей страдали 19 пациенток, полименореей – 20. Средняя продолжительность менструального цикла и средняя длительность менструации были сопоставимы у всех пациенток.

При анализе структуры и частоты экстрагенитальных заболеваний, представленных в Таблице 2, было выявлено, что наиболее частой патологией обследованных пациенток явилось нарушение зрения – у 48 беременных.

**Таблица 2** – Структура и частота экстрагенитальных заболеваний

<i>Заболевание</i>	<i>Частота встречаемости, абс. число</i>
Орган зрения (миопия)	48
Дыхательная система (ринит, тонзиллит, бронхит, гайморит)	12
Сердечно-сосудистая система (ХАГ, вегетососудистая дистония, пролапсмитрального клапана, варикозная болезнь)	20
Кроветворная система (анемия)	35
Пищеварительная система (гастрит, панкреатит, холецистит, желчекаменная, язвенная болезнь)	8
Мочевыделительная система (цистит, пиелонефрит, мочекаменная болезнь)	3
Эндокринная система (сахарный диабет, гипотиреоз, гипертиреоз)	15
Кожные покровы (экзема, нейродермит)	2

Заболевания сердечно-сосудистой системы наблюдались у 20 беременных, при этом частота встречаемости ХАГ составила 6 из 207. Среди эндокринных заболеваний у подавляющего количества беременных выявлен гипотиреоз – у 5 из

15 пациенток. Хронические заболевания органов дыхания (хронический бронхит, бронхиальная астма) выявлены у 12 беременных. Заболевания желудочно-кишечного тракта наблюдались у 4, в то время как заболевания мочевыделительной системы наблюдались у 3 пациенток соответственно. Заболевания эндокринной системы, представленные патологией щитовидной железы (аутоимунный тиреоидит) в фазе медикаментозной компенсации, выявлялись у 9 беременных. Во всех наблюдениях соматические заболевания имели начальные проявления или находились на стадии компенсации.

Частота и структура гинекологических заболеваний представлена в Таблице 3.

**Таблица 3** – Структура и частота гинекологических заболеваний

<i>Заболевание</i>	<i>Частота встречаемости, абс. число</i>
Воспалительные заболевания органов малого таза	42
Вирусные инфекции (цитомегаловирус, вирус папилломы человека, простого герпеса 2-го типа)	6
Эрозия шейки матки	12
Порок развития матки	4
Синдром поликистозных яичников	4
Миома матки	10
Полип эндометрия	4
Эндометриоз	9
Бесплодие в анамнезе	3

Из перенесенных гинекологических заболеваний наибольшую частоту имели воспалительные заболевания и патология шейки матки. Эрозия шейки матки имела место у 12 пациенток. Хронический сальпингоофорит был выявлен у 6 пациенток во всех группах. Лечение по поводу инфекций, передаваемых половым путем, получали 42 пациентки соответственно. Следует отметить достаточно низкий уровень сопутствующей миомы матки (10), что может быть объяснено молодым и средним репродуктивным возрастом большинства пациенток.



Изучение данных акушерского анамнеза показало, что количество первородящих и повторнородящих было практически одинаковым, составило 98 и 109 пациенток, соответственно. Из анализа данных о предыдущих беременностях, представленных в Таблице 4, выявлено, что у 20 пациенток анамнез был отягощен невынашиванием беременности: неразвивающаяся беременность – 8, самопроизвольный выкидыш – 12.

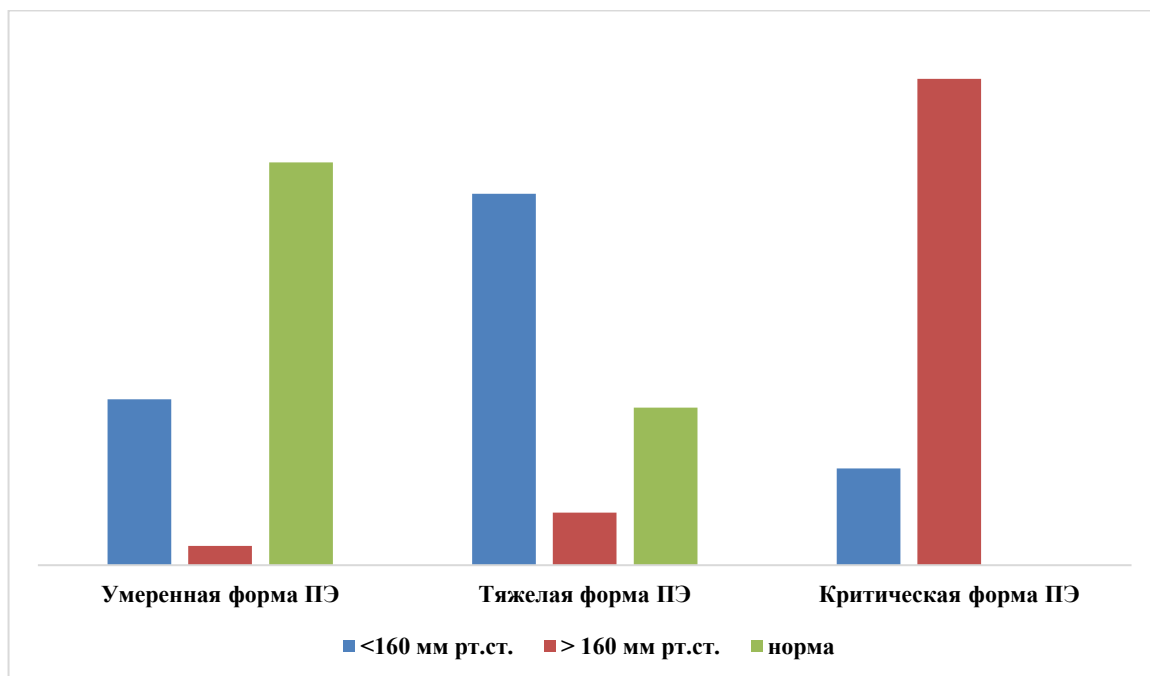
Изучение семейного анамнеза показало, преэклампсию имели ближайшие родственницы 44 пациенток. Достаточную распространенность среди родственниц 1-й линии имели эндокринопатии: сахарный диабет, ожирение, тиреотоксикоз, аутоиммунный тиреоидит.

**Таблица 4** – Исходы предыдущих беременностей

<i>Осложнения</i>	<i>Частота встречаемости (абс. число)</i>
Самопроизвольный выкидыш	20
Неразвивающаяся беременность	8
Внематочной беременность (трубная)	3
Искусственный аборт	126
Трофобластическая болезнь	1

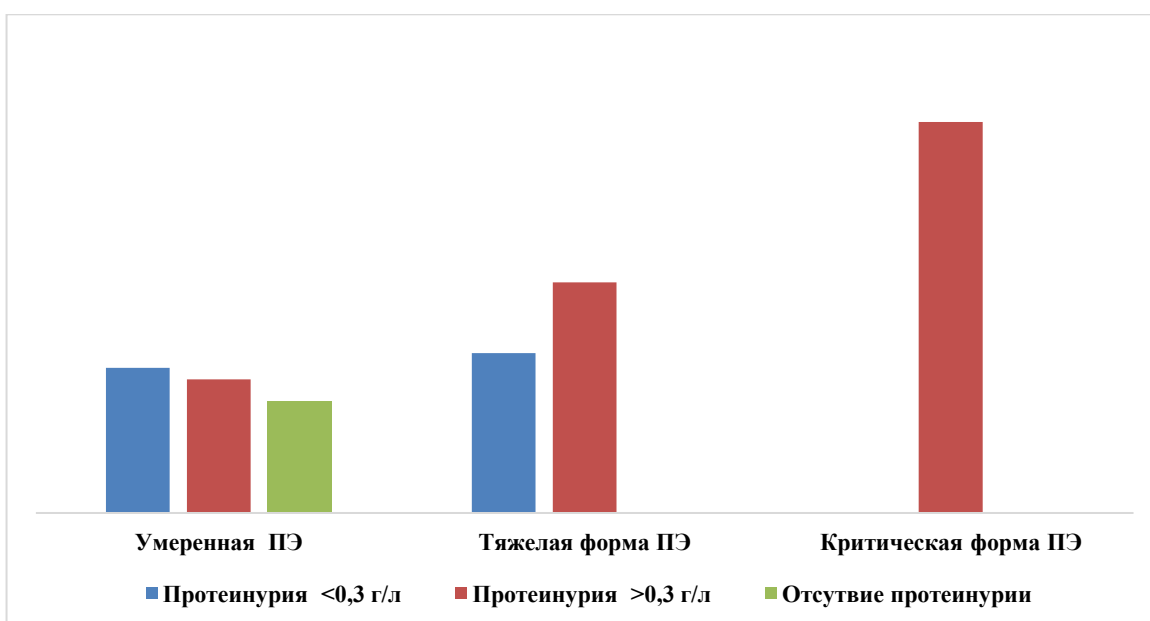
Количество предшествующих беременностей было разным и колебалось от 1 до 6 по счету. Течение беременности носило описательный характер и анализировалось в каждой группе. При этом оценивались как клинические, так лабораторные и ультразвуковые данные, перинатальные исходы. Сравнительная оценка проводилась между группой здоровых и группой с преэклампсией и ЗРП. Наиболее частым осложнением данной беременности являлась фетоплацентарная недостаточность и хроническая гипоксия плода, выявленные в разные сроки гестации. При этом частота выявления данных осложнений была достоверно выше в исследуемых группах по сравнению с группой здоровых. Следует отметить, что в наш анализ были включены все случаи выявления фетоплацентарной недостаточности и преэклампсии в различные сроки гестации, независимо от эффективности терапии.

Клинические проявления заболевания во всех группах были скудными. Нами зарегистрировано 2 признака триады Цангеместейра в 49 из 57 наблюдений при ПЭ.



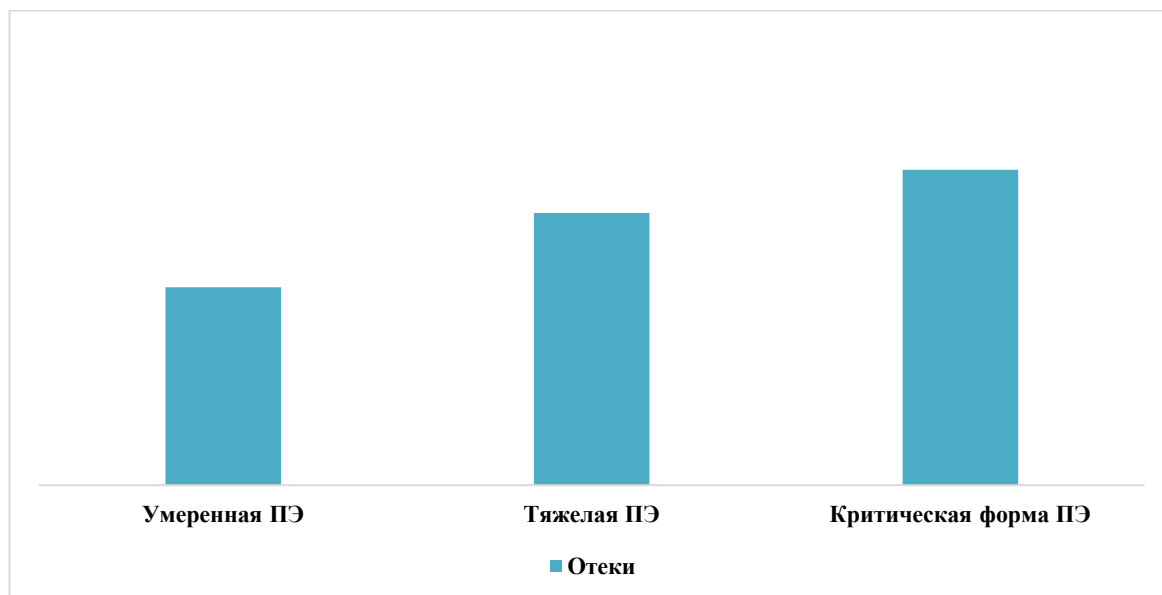
**Рисунок 1 – САД при ПЭ**

Повышение артериального давления выше 130 до 160 и от 85 до 90 мм рт. ст. выявлено у 10 из 35 беременных при умеренной ПЭ. При тяжелой ПЭ САД выше 160 мм. рт. ст. зарегистрировано у 14 из 22 беременных.



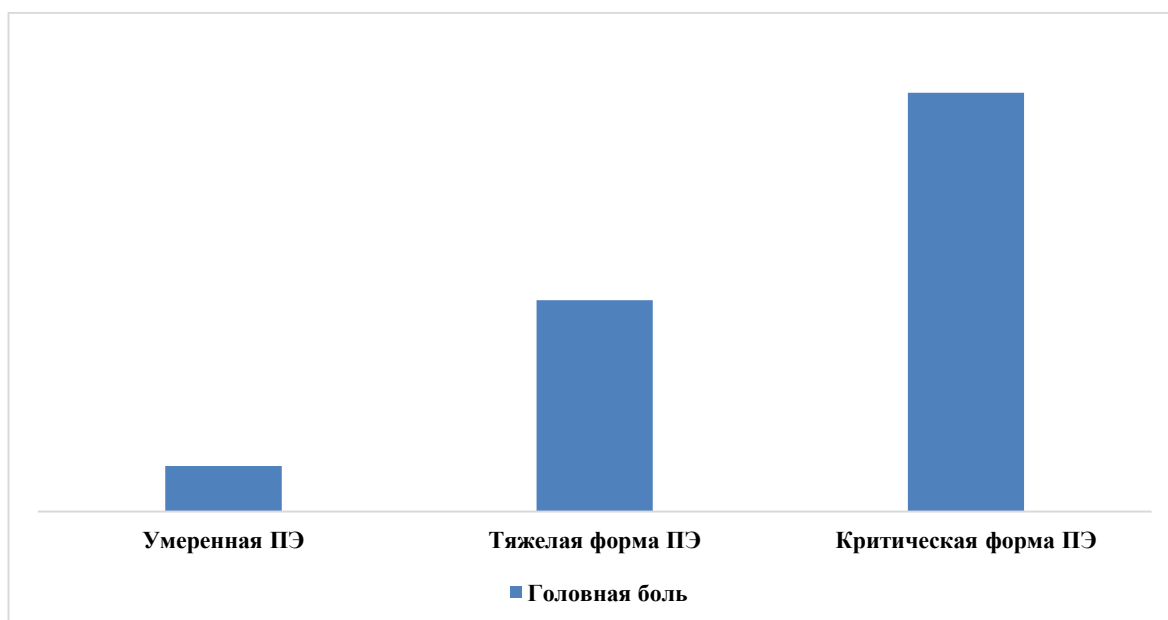
**Рисунок 2 – Частота протеинурии при ПЭ**

Количество белка в моче выше нормативных показателей зарегистрировано у 35 из 57 беременных с преэклампсией. При этом при умеренной ПЭ таких наблюдений было 19 из 35, а при тяжелой ПЭ 16 из 22.



**Рисунок 3** – Частота отеков при преэклампсии

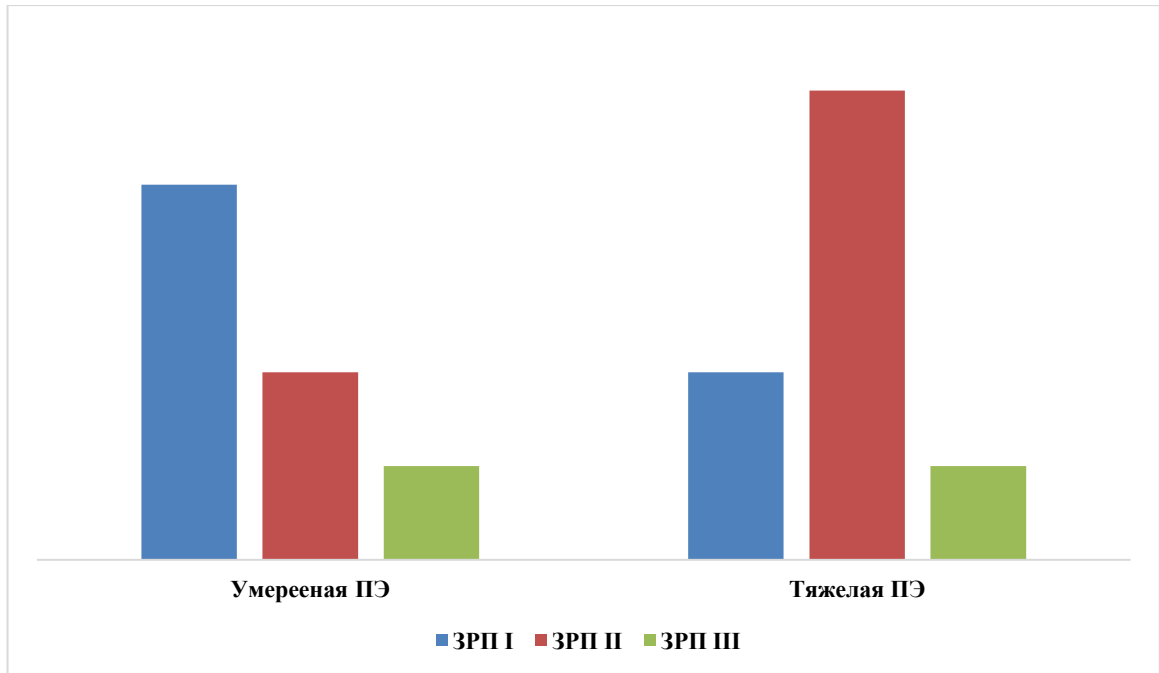
Отеки беременных были выявлены у 22 из 35 пациенток с преэклампсией умеренной и у 19 из 22 тяжелой формы.



**Рисунок 4** – Частота встречаемости головной боли при ПЭ

У 14 из 57 пациенток с преэклампсией были выявлены головная боль и у 9 расстройство зрения. У 5 беременных головная боль наблюдалась при умеренной

и у 9 при тяжелой преэклампсии. При этом эти жалобы беременные предъявляли в 58% при высоком и в 41% при низком артериальном давлении.



**Рисунок 5 – Выраженность ЗРП при ПЭ**

Задержка роста плода была диагностирована у 56 новорожденных при массе тела менее 10 центилей для данного срока гестации. При этом у беременных с преэклампсией ЗРП зарегистрирована в 16 наблюдениях. Из них при умеренной ПЭ ЗРП 1 степени выявлена у 4, 2 степени у 3, 3 степени у 1 пациентки. При тяжелой ПЭ ЗРП 1 степени наблюдалась уже у 2, 2 степени у 5, 3 степени у 1 беременной. При беременности, не связанной с ПЭ, ЗРП 1 степени зарегистрирована у 16, 2 степени у 13 и 3 степени у 11 новорожденных.

В Таблице 5 представлены показания к операции кесарева сечения в группе пациенток с диагнозом преэклампсия.

**Таблица 5** – Показания к операции кесарева сечения в группе пациенток с диагнозом преэклампсия

<i>Показания</i>	<i>Число</i>
Тазовое предлежание	1
Несостоятельный рубец на матке	5
Аномалии прикрепления плаценты	2
Экстрагенитальные заболевания	2
Нарастание тяжести преэклампсии	15
Критическое состояние плода	2
Острая гипоксия плода	2
Аномалии родовой деятельности	2
<b>Всего</b>	<b>31</b>

Общее количество преждевременных родов составило 33. Перенашивание беременности имела место у 3 беременных. Методы индукции родов использовали у 83 пациенток.

ЗРП была диагностирована у всех беременных с субкомпенсированной и декомпенсированной ПН. Субкомпенсированная форма ПН сопровождалась первой и второй степенью синдрома задержки роста плода. Декомпенсированная ПН сопровождалась ЗРП 2-й и 3-й степеней. Впервые ЗРП выявлена у 12 пациенток в 25–30 недель, у 26 беременных в 31–35 недель, у остальных – после 35 недель беременности. Хроническая внутриутробная гипоксия была установлена у 24 (58%) пациенток с субкомпенсированной ПН, что в 2 раза чаще, чем при компенсированной ПН. При данной степени тяжести ПН характерно не только увеличение частоты выявления хронической внутриутробной гипоксии плода, но и возрастание степени ее тяжести. Так, при первом обнаружении ЗРП начальные признаки гипоксии по данным кардиотокографии были нами выявлены у 16 беременных, умеренно выраженная гипоксия – у 24 пациенток.

Диагностику плацентарной недостаточности проводили на основании изучения роста и развития плода, функционального состояния плода, оценки состояния плаценты и плацентарного кровообращения и показателей гемостаза и

метаболизма. При I степени регистрировали нарушение маточно-плацентарного или плодово-плацентарного кровотока. При II степени выявляли нарушение маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока и при III степени – централизацию плодово-плацентарного кровотока, нарушение маточного кровотока. Критические нарушения плодово-плацентарного кровотока проявлялись нулевым или реверсивным диастолическим кровотоком в артерии пуповины или аорте, нарушением маточного кровотока.

Лечение ПН проводили под контролем функционального состояния плода и маточно-плацентарного кровотока, темпов роста плода. При этом назначали периферические вазодилататоры, антикоагулянты и вспомогательные средства, усиливающие действия основных. При назначении периферических вазодилататоров, во избежание синдрома обкрадывания, лечение проводили с учетом индивидуальной чувствительности и переносимости, с использованием холтеров ЭКГ и давления. Длительность лечения ПН составила от 2 до 10 недель.

Критериями эффективности терапии ПН служили: функциональное состояние и рост плода, а также уровни маточно-плацентарного кровообращения. При положительном эффекте под действием терапии увеличивалось плацентарное кровообращение, улучшалось функциональное состояние плода – характерно для компенсированной ПН. При сомнительном эффекте – увеличивалось плацентарное кровообращение, а функциональное состояние плода не изменялось. При отрицательном эффекте – под влиянием терапии не происходило улучшения исследуемых показателей, они прогрессивно снижались – характерно для декомпенсированной ПН.

Для профилактики РДС применяли дексаметазон по схеме, указанной в клинических рекомендациях.

В группе беременных с ПН показанием к кесареву сечению в 5 наблюдениях служили критическое состояние плодов и в 10 ЗРП 2-3-й степени.

Обезболивание родов было проведено у всех беременных с помощью эпидуральной анестезии. Кесарево сечение – у 18 с помощью спинальной и у 29 – эпидуральной аналгезии.

В 167 наблюдениях родились живые дети. Оценка по шкале Апгар на 1 минуте колебалась от 3 до 5 баллов в 4 наблюдениях, от 4 до 7 баллов у 11 новорожденных. Масса тела новорожденных составила от 880 до 4528 граммов), длина тела от 33 до 59 см). Крупные плоды родились у 5 родильниц. Из общего количества детей 35 поступили в отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) из-за незрелости легочной ткани и респираторных проблем.

Подробная клиническая характеристика наблюдений будет представлена в соответствующих главах.

### **2.3. Методики исследования**

**Диагностика развития плода.** Развитие плода во время беременности определяли с помощью ультразвуковой антропометрии. При этом измеряли бипариетальный размер головки, диаметры груди и живота и длину бедренной кости плода. При отставании этих размеров от средне популяционных, имеющих во всех справочниках и ультразвуковых аппаратах, на 2 недели ставили диагноз ЗРП 1-й степени, от 2 до 4 недель – ЗРП 2-й степени и более 4 недель – ЗРП 3-й степени. Окончательный диагноз ЗРП устанавливался после родов на основании данных массы плода. Нормативные параметры находились между 75-й и 25-й перцентильными кривыми, 1-я степень ЗРП 25-10 кривая, 2-я степень 10-3 кривая, 3-я степень – ниже 3 кривой. Использовали также массоростовой коэффициент: норма – выше 60, ЗРП 1-й степени – 55–60, 2-й степени – 50–55, 3-й степени – ниже 50. Функциональное состояние плода во время беременности и родов оценивалось с помощью методов функциональной диагностики: КТГ и доплерометрии сосудов матки, пуповины и плода. УЗ исследования проводили на аппарате Voluson 530 МТ фирмы Kretztechnik, Voluson E8, фирмы General Electric, с использованием датчиков: RIC 5-9 D (4–9 МГц), C1-5D (2–5 МГц), RAB 4-8 D (2–8 МГц), КТГ – фетального монитора GE (General Electric) Corometrics (250CX), США.

## 2.4. Определение молекулярно-биологических факторов

**Сбор образцов.** Пробы свежезятой (с антикоагулянтом) периферической крови пациентов центрифугировали при 400 g 10 мин, плазму отбирали в чистые сухие пробирки, далее плазму и красные осадки замораживали и хранили при -80 °С.

**Внеклеточную и клеточную ДНК** выделяли методом экстракции органическими растворителями, соответственно, из плазм и красных осадков.

**Концентрацию клеточной ДНК** определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм с учетом светорассеяния (320 нм) в кварцевой кювете при длине хода луча 1 см.

**Концентрацию внеклеточной ДНК** определяли флуориметрически с использованием интерколирующего красителя Pico Green (Invitrogen).

**Содержание исследуемых повторов в составе ДНК** определяли методом нерадиоактивной количественной дот-гибридизации. Для этого пробы ДНК известной концентрации и набор калибровочных образцов с известным содержанием повторов генома наносили в нескольких повторах на нитроцеллюлозные фильтры и, после температурной иммобилизации, инкубировали с набором биотинилированных олигонуклеотидных зондов, сигнал визуализировали при помощи конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (Merck) и колориметрического субстрата.

**Содержание копий** рассчитывали по калибровочной зависимости при помощи компьютерного анализа изображений, вычисляя интегральную интенсивность каждого окрашенного пятна.

**Нуклеазную активность плазм (ДНКаза 1)** исследовали при помощи метода радиальной диффузии в агарозном геле.

**Методы статистического анализа.** Для статистической обработки данных применяли прикладной пакет программ SPSS 15.0. Использовали описательную статистику и корреляционный анализ по методу Спирмена. Для поиска достоверных различий между выборками использовали критерии Вилкоксона и



Манна – Уитни. Кроме того, данные подвергали частотному анализу путем построения кросс-таблиц. Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при нормальной беременности

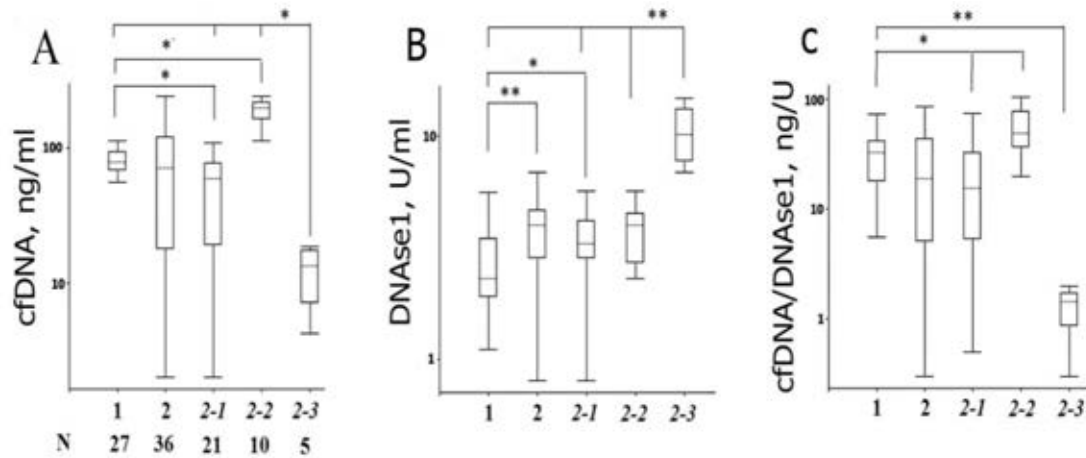
Как известно, внеклеточная циркулирующая ДНК (вкДНК) поступает в кровотоки преимущественно из погибших клеток, и ее концентрация может отражать интенсивность гибели клеток в организме. Нами были обследованы 80 здоровых пациенток для выявления нормативных параметров вкДНК. 1-ю группу составили 40 небеременных в возрасте 22–40 лет из студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров). Во 2-ю группу объединены пациентки с нормально протекающей беременностью сроком более 37 недель (N = 40), которые родили здоровых детей без признаков гипоксии и ЗРП.

Проведенные исследования показали, что в 1-й группе (небеременных) концентрация вкДНК варьирует от 11 до 113 нг/мл (среднее:  $74 \pm 30$ ; медиана 79 нг/мл). Во 2-й группе (пациенток при физиологической беременности) перед родами концентрации вкДНК варьируют от 2 до 241 нг/мл (среднее:  $84 \pm 72$ ; медиана 71 нг/мл). На Рисунке 6А приводятся значения концентраций вкДНК в плазме крови небеременных (группа 1) и беременных пациенток (группа 2). В группе 2 отмечается больший разброс значений концентраций вкДНК по сравнению с группой 1: коэффициент вариации этого параметра беременных значительно выше (0,9), чем небеременных (0,4). При этом в этой группе было зарегистрировано 3 подгруппы пациенток:

- 1-я – у которых вкДНК была ниже уровня,
- 2-я – на уровне средних значений,
- 3-я – выше значений небеременных.

Известно, что нормальная беременность сопровождается увеличением уровня апоптоза клеток организма матери и плода (в основном, клеток плаценты) [Al Nakib M., Desbrière R., Bonello N. et al., 2009], при этом ДНК погибших клеток увеличивает пул вкДНК. Апоптоз усиливается по мере увеличения срока

беременности. В крови матери присутствует циркулирующая вкДНК двух геномов – материнского и плода.



*Примечание:* **А.** Концентрация вкДНК в плазме периферической крови матери в третьем триместре при нормальной беременности. **Б.** Активность ДНКазы 1 в плазме периферической крови матери в третьем триместре при нормальной беременности. **В.** Зависимость концентрации вкДНК от активности ДНКазы 1 (вкДНК/ДНКазы 1) в плазме периферической крови матери в третьем триместре при нормальной беременности. Достоверности отличий: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$

**Рисунок 6** Концентрация вкДНК и активность ДНКазы 1 в плазме периферической крови матери у здоровых небеременных (1) и беременных пациенток (2)

По разным оценкам количество вкДНК плода в крови матери не превышает 10% [Lo Y. M., Chiu R. W., 2012]. вкДНК может изменять гемодинамические свойства крови [Конорова И. Л., Вейко Н. Н., Ершова Е. С. и др., 2009]: низкомолекулярная вкДНК увеличивает гидродинамическое сопротивление и турбулентность потока, длинные фрагменты ДНК, наоборот, снижают сопротивление, повышая ламинарность потока. вкДНК может усиливать окислительный стресс, стимулировать синтез провоспалительных цитокинов и индуцировать стерильное воспаление [Speranskii A. I., Kostyuk S. V., Veiko N. N. et al., 2015]. При действии на клетки эндотелия вкДНК может значительно изменять синтез медиатора окиси азота, повышая артериальное давление [Ефремова Л. В., Алексеева А. Ю., Конькова М. С. и др., 2010]. Поэтому в организме здорового человека устанавливается равновесие процесса увеличения количества циркулирующей ДНК и ее элиминации из кровотока. Защита организма от негативных эффектов избыточной вкДНК осуществляется активацией системы элиминации вкДНК. Фрагменты ДНК выводятся различными

путями: белково-нуклеиновые комплексы захватываются и утилизируются макрофагами. Кроме того, фрагментация ДНК осуществляется в печени и гидролитическими ферментами крови, а затем низкомолекулярные фрагменты выводятся с мочой.

Мы не зафиксировали ожидаемого увеличения концентрации вкДНК в крови беременных пациенток по сравнению с небеременными. Следовательно, при нормальной беременности не происходит заметных изменений в организме матери и плода в виде повышенного распада клеток – апоптоза.

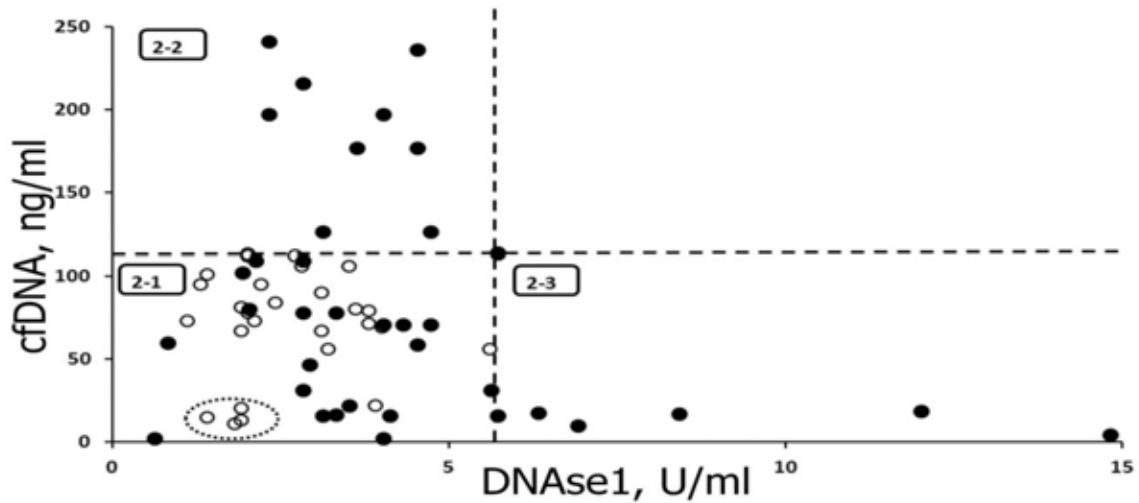
Впервые в данной работе проведено исследование изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока – фермента ДНКазы 1 в плазме крови беременных и небеременных.

Учитывая то, что основной причиной снижения концентрации вкДНК может быть повышение активности компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из факторов, влияющих на элиминацию вкДНК, является активность фермента, отвечающего за гидролиз вкДНК – ДНКазы 1 плазмы крови. Поэтому мы провели сопоставление концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1 в крови небеременных и 3 подгруппах пациенток при физиологической беременности с разными концентрациями вкДНК.

Как видно на Рисунке 6Б, у небеременных пациенток активность ДНКазы 1 варьирует от 1,1 до 5,6 U/мл (среднее:  $3 \pm 1$ ; медиана 2,3 U/мл), а у беременных от 0,8 до 14,8 U/мл (среднее:  $4,4 \pm 2,7$ ; медиана 4 U/мл). У беременных активность ДНКазы 1 достоверно выше ( $p < 0,001$ ) по сравнению с небеременными. Коэффициент вариации этого параметра у беременных выше (0,62), чем у небеременных (0,40).

На Рисунке 7 приводится зависимость концентрации вкДНК плазмы крови от значений активности ДНКазы 1. У небеременных пациенток (прозрачные кружки) значения можно разделить на 2 подгруппы. 4 образца (обведены пунктирной линией) характеризуются низкими значениями концентрации вкДНК (11–20 нг/мл) и активности ДНКазы 1 (1,4–1,9 ед/мл). Для остальных 23 образцов плазмы крови наблюдается отрицательная линейная зависимость концентрации

вкДНК от активности ДНКазы 1 (уравнение линейной регрессии:  $Y = 107 - 9X$ ;  $k = -0,45$ ;  $p < 0,05$ ).



*Примечание:* Группа 1 (небеременные) – прозрачные кружки, группа 2 (беременные) – черные кружки. Показано разделение группы 2 на три подгруппы пунктирными линиями. Объяснения в тексте.

**Рисунок 7** – Зависимость концентрации вкДНК от активности ДНКазы 1

Как видно на Рисунке 7 у 42% беременных наблюдали существенное изменение концентрации вкДНК или активности ДНКазы 1 по сравнению с небеременными. 28% образцов плазмы характеризуются высокими концентрациями вкДНК на фоне малых изменений активности ДНКазы 1, для 14% образцов обнаружили значительное снижение концентрации вкДНК на фоне значительного увеличения активности ДНКазы 1. Исходя из этого, мы разделили группу беременных пациенток на три подгруппы (вертикальные и горизонтальные пунктирные линии на графике отражают диапазон концентраций у небеременных). В подгруппе 2-1 – концентрация вкДНК и активность ДНКазы 1 варьируют в пределах, характерных для небеременных пациенток; в подгруппе 2-2 концентрации вкДНК выше верхней границы нормы, активность ДНКазы 1 варьирует в пределах нормы; в подгруппе 2-3 активность ДНКазы 1 выше верхней границы нормы. Как видно на Рисунках 1А и 1Б у пациенток подгруппы 2-1 концентрации вкДНК оказались достоверно ниже, чем у небеременных ( $p < 0,05$ ), а значения активности ДНКазы 1 – выше, чем у небеременных пациенток ( $p < 0,02$ ). В подгруппе 2-2 концентрация вкДНК оказалась значительно выше,

чем в группе 1 (небеременных) ( $p < 0,00001$ ) и выше значений концентраций в подгруппах 2-1 ( $p < 0,00001$ ) и 2-3 ( $p = 0,002$ ). Активность ДНКазы 1 в этой подгруппе также выше нормы ( $p = 0,007$ ), но не отличается от активности ДНКазы 1 в подгруппе 2-1. В подгруппе 2-3 концентрации вкДНК ниже у группы беременных ( $p = 0,002$ ) и ниже, чем в подгруппах 2-1 ( $p < 0,05$ ) и 2-2 ( $p = 0,002$ ). Активность ДНКазы 1 при этом значительно выше беременных ( $p < 0,001$ ), а также выше активности в подгруппах 2-1 ( $p < 0,001$ ) и 2-2 ( $p = 0,0004$ ).

В группе, составленной из подгрупп 2-2 и 2-3, обнаружена отрицательная линейная корреляция между концентрацией вкДНК и активностью ДНКазы 1 (уравнение линейной регрессии:  $Y = 240 - 19X$ ;  $k = -0,8$ ,  $p < 0,05$ ). Мы ввели показатель, отражающий количество вкДНК, приходящееся на единицу активности ДНКазы 1: вкДНК/ДНКазы 1 (Рисунок 1В). У беременных этот показатель изменяется от 0,3 до 105 нг/ед ( $30 \pm 27$ ; медиана 19 нг/ед). Показатель вкДНК/ДНКазы 1 у беременных пациенток достоверно отличаются от этого показателя подгруппы 2-1 (медиана 15,6 нг/ед. (0,5–75),  $p < 0,05$ ), подгруппы 2-2 (медиана 49,3 нг/ед. (20–105),  $p < 0,05$ ) и подгруппы 2-3 (медиана 1,5 нг/ед. (0,3–2),  $p = 0,0005$ ). Все три подгруппы беременных достоверно различаются между собой по этому показателю ( $p < 0,05$ ), который уменьшается в ряду: 2-2 > 2-1 > 2-3.

В Таблице 7 приведены значения медиан, интервалы варьирования и данные регрессионного анализа зависимости показателя вкДНК/ДНКазы 1 от концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1 для двух выборок.

**Таблица 7** – Данные регрессионного анализа зависимости показателя вкДНК/ДНКазы 1 от концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1 для (1) беременных и (2) беременных при физиологической беременности

Номер группы	Медиана, нг/ед.	Интервал значений, нг/ед.	Сравнение с вкДНК		Сравнение с ДНКазы 1	
			k	p	k	p
1	18	2–102	0,8	< 0,0001	-0,62	< 0,0001
2	25	0,3–112	0,8	< 0,0001	-0,43	0,005

Эти данные указывают на уменьшение значения активности ДНКазы 1, как основного фактора элиминации вкДНК из кровотока при беременности. Низкие значения концентраций вкДНК на фоне умеренного увеличения активности ДНКазы 1 (подгруппы 2б и 3б), по-видимому, также указывают на дополнительные факторы элиминации вкДНК из кровотока.

Важным звеном элиминации вкДНК является активность ДНКазы 1 крови и других ДНКаз [Черепанова А. В., Тамкович С. Н., Власов В. В. и др., 2007]. Она зависит от экспрессии белка ДНКаз1 и наличия природных ингибиторов, например, белка G-актин, который образует с ДНКазой 1 неактивный комплекс. Эндонуклеазную активность имеют некоторые антитела. Наши данные показывают, что активность ДНКазы 1 увеличивается при состояниях, которые сопровождаются увеличением клеточной гибели за счет неизвестного механизма [Вейко Н. Н., Булычева Н. В., Рогинко О. А. и др., 2008]. Обнаружено, что для некоторых людей характерен незначительный уровень повреждения ДНК клеток организма (например, из-за высокой активности антиокислительных и репарационных систем, обусловленной генетически), поэтому следствием этого является низкий уровень апоптоза и низкий уровень вкДНК, из-за чего не происходит индуцирование активности ДНКазы 1. Беременные, входящие в эту малочисленную подгруппу, устойчивы к внешним неблагоприятным факторам. Именно этим мы объясняем низкие значения и концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1, выявленные у 15% здоровых небеременных и у одной беременной (Рисунок 2). Для образцов плазмы крови небеременных была выявлена отрицательная корреляция между активностью ДНКазы 1 и концентрацией вкДНК. Низкий показатель вкДНК/ДНКаз1 указывает на активацию других компонентов системы элиминации вкДНК, помимо активности ДНКазы 1, например, фильтрующей функции почек. Высокие значения показателя вкДНК/ДНКаз1 (медиана 49 нг/ед.) могут свидетельствовать о недостаточно активной элиминации, расщепленной вкДНК из кровотока. Таким образом, только анализируя совместно концентрацию вкДНК, активность

ДНКазы 1 и отношение  $\text{вкДНК/ДНКазы 1}$  можно получить представление об изменении уровня апоптоза клеток в организме матери и плода.

Исследования также показали, что концентрация  $\text{вкДНК}$  и ее характеристики имеют отрицательную корреляционную связь со сроком беременности. Учитывая то, что в последующих наших исследованиях из-за тяжести преэклампсии и плацентарной недостаточности беременность прерывали раньше срока путем кесарева сечения, нам представлялось целесообразным отдельно рассмотреть результаты пациенток, обследованных до и после 37 недель физиологической беременности. Клинические данные беременных по этим группам представлена в Таблице 8. При этом несколько изменились физиологические параметры  $\text{вкДНК}$  и нуклеазной активности.

**Таблица 8** – Клинические параметры пациенток, обследованных до и после 37 нед. беременности

Показатели	Здоровые	$\leq 37$ недель	$> 37$ недель
		$M \pm m$	$M \pm m$
Возраст	$32,0 \pm 0,9$	<b><math>33,7 \pm 1,0</math></b>	<b><math>30,1 \pm 1,4</math></b>
САД	$116,5 \pm 1,3$	$118,2 \pm 2,0$	<u><math>113,7 \pm 2,5</math></u>
ДАД	$73,5 \pm 1,5$	$75,6 \pm 1,6$	$82,3 \pm 2,2$
Вес плода	$3485,4 \pm 88,3$	$2530,8 \pm 186,7$	<b><math>3476,7 \pm 156,7</math></b>
1 ст. гипотр. плода	0	$0,8 \pm 0,2$	<u><b><math>0,4 \pm 0,2</math></b></u>
Срок гестации	$38,7 \pm 0,5$	$34,0 \pm 0,5$	<b><math>38,6 \pm 0,3</math></b>

*Примечание:* \* – при р-значении менее 0,05. Курсивом выделены показатели, отличие которых от группы здоровых – незначимы

Как видно из приведенных данных, некоторые клинические параметры пациенток со сроком гестации менее 37 недель статистически значимо отличались от показателей беременных с доношенной беременностью. В то же время, у пациенток со сроком гестации более 37 недель параметры, характеризующие состояние плода, не отличались от таковых в группе здоровых. Сравнение пациенток с различными сроками гестации выявило незначительные в абсолютном выражении, по возрасту и показателям ДАД. Кроме того, вес плода при УЗ исследовании у пациенток со сроком гестации менее 37 недель был



значимо ниже соответствующего показателя в группе пациенток со сроком гестации более 37 недель.

В группе пациенток без признаков преэклампсии и плацентарной недостаточности со сроком гестации более 37 недель были зарегистрированы значительные изменения концентрации и состава вкДНК по сравнению с группой беременных со сроком гестации более 37 недель. У пациенток группы «более 37 недель» концентрация вкДНК варьировала от 34,0 до 503 нг/мл (медиана 143 нг/мл;  $p = 0,0006$ ). У пациенток со сроком гестации менее 37 недель уровень вкДНК плазмы был ниже. Значения данного показателя варьировали от 34,0 до 270,0 нг/мл, значение медианы составило 53 нг/мл ( $p = 0,2016$ ).

Исследование активности ДНКазы I в образцах плазмы показало, что при беременности менее 37 недель активность ДНКазы I варьировала от 0,8 до 14,8 U/мл, а значение медианы составляло 3,4 U/мл. У пациенток со сроком гестации более 37 недель активность ДНКазы I колебалась между 0,8 и 14,3 U/мл, а значение медианы не превышало 2,4 U/мл ( $p = 0,0845$ ).

Концентрация вкДНК в группе пациенток со сроком гестации менее 37 недель достигала максимальных значений, активность ДНКазы I, основной эндонуклеазы крови, не отличалась от соответствующего показателя в группе здоровых. У пациенток со сроком гестации более 37 недель уровень активности ДНКазы I был значимо выше, чем у пациенток с доношенной беременностью. У этих пациенток активность ДНКазы I варьировала от 3,4 до 14,3 ед./мл, а значение медианы составляло 7,1 ед./мл ( $p = 0,0299$ ).

Полученные результаты показывают, что у пациенток со сроком беременности менее 37 недель наблюдаются наиболее выраженные изменения концентрации вкДНК и ее характеристик (см. Таблицу 9).

По данным литературы [Wei Ve, Xiaojun Tang, Chu Liu et al., 2017] вк мтДНК – число копий, повторов митохондриальной ДНК в составе вкДНК, определенные методом ПЦР составляет  $168,8 \pm 32$  копий в микролитре. В наших исследованиях вк мтДНК в норме колеблется 100–250 копий в микролитре, по своему строению напоминает плодную ДНК, обладает мощным стимулирующим

эффектом, может провоцировать прерывание беременности, клет. мтДНК – число копий, повторов клеточной лейкоцитарной митохондриальной ДНК в составе внеклеточной, свидетельствует о повреждении либо гибели лейкоцитов,  $\text{вк мтДНК} / \text{клет. мтДНК}$  – интегративный показатель, свидетельствующий о накоплении митохондриальной ДНК в кровотоке. В наших исследованиях (см. Таблицу 9) не было зарегистрировано существенных различий мтДНК между показателями беременных со сроком гестации менее 37 и более 37 недель. Следует отметить, что пациентки двух групп с различными сроками гестации статистически значимо не отличались по количеству митохондриальных повторов в плазме, а также по значениям интегративных показателей « $\text{вк мтДНК} / \text{клет. мтДНК}$ ».

**Таблица 9** – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с различными сроками гестации у здоровых беременных

Показатели	Здоровые (n=70)	$\leq 37$ недель	$> 37$ недель
		M $\pm$ m	M $\pm$ m
Концентрация вкДНК, нг/мл	78,4 $\pm$ 3,09	53,7 $\pm$ 11,14	140,6 $\pm$ 16,
Нукл акт, ед./мл	4,4 $\pm$ 2,7	<b>2,1<math>\pm</math>1,2</b>	6,8 $\pm$ 0,9
вк мтДНК	140,82 $\pm$ 23,18	153,5 $\pm$ 28,7	120,7 $\pm$ 31,7
клет. мтДНК	238,39 $\pm$ 18,02	198,9 $\pm$ 7,9	257,4 $\pm$ 10,0
$\text{вк мтДНК} / \text{клет. мтДНК}$	0,56 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,2	0,52 $\pm$ 0,4
<i>Примечание: * – при р-значении менее 0,05. Курсивом выделены показатели, отличие которых от группы здоровых – незначимы. Различия по всем параметрам в группах с доношенной и недоношенной беременностью – незначимы</i>			

Частотный анализ показал, что вкДНК в группе здоровых беременных в 78,3% наблюдений не превышала 250 нг/мл, а ДНКза-1 – 7,1 ед/мл. Количество мтДНК в составе вкДНК не превышало 250 копий в 66%, клет. мтДНК в 74%, а отношение  $\text{вк мтДНК} / \text{клет. мтДНК}$  не превышало 1 в 13% и свидетельствовало о физиологическом состоянии пациенток.

Таким образом проведенные исследования показали, что у небеременных концентрация вкДНК варьировала от 11 до 113 нг/мл (медиана 79 нг/мл). При нормальной беременности в последнем триместре концентрация вкДНК

колеблется (за исключением 1 наблюдения в 503 нг/мл) от 2 до 347 нг/мл (медиана 71 нг/мл) и свидетельствовала о невысоком уровне апоптоза. Следовательно, за физиологический уровень вкДНК здоровых беременных следует принимать значения от 2 до 350 нг/мл. Согласно критерию Манна – Уитни концентрация вкДНК здоровых небеременных и беременных достоверно не отличаются между собой ( $p > 0.05$ ). Физиологический уровень (более 70% наблюдений) активности ДНКзы-1 не превышает 7,1 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК не превышает 250 копий.

### 3.2. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при преэклампсии

В соответствии с целью и задачами исследования среди обследованных пациенток ретроспективно были отобраны беременные с ПЭ. Критериями постановки диагноза послужили наличие артериальной гипертензии САД  $\geq 140$  и/или ДАД  $\geq 90$  мм рт. ст. и протеинурии  $\geq 0,3$  г/л в суточной пробе мочи после 20 недель беременности. При таком распределении пациенток мы могли анализировать полные данные 49 из 57 беременных с преэклампсией и 40 пациенток с нормально протекающей беременностью.

**Таблица 10** – Характеристика обследованных беременных

	<i>Условно здоровые беременные</i>	<i>Беременные с преэклампсией</i>
Возраст	32,0 $\pm$ 0,9	32,6 $\pm$ 0,8
САД	116,5 $\pm$ 1,3	139,9 $\pm$ 1,6
ДАД	73,5 $\pm$ 1,5	87,7 $\pm$ 1,4
Отеки (степень)	0,1 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1
Белок в моче	0,1 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,2
Вес плода после рождения	3485,4 $\pm$ 88,3	2896,9 $\pm$ 152,9
Ст. гипотр. плода	0	0,7 $\pm$ 0,1
Беременность < 35 нед.	1 из 30	23 из 49

*Примечание:* \* – при р-значении менее 0,05. Курсивом выделены показатели, отличие которых от группы здоровых – незначимы. САД – систолическое артериальное давление. ДАД – диастолическое артериальное давление

Для исключения случайного характера появления общеизвестных признаков ПЭ у современных больных при развитии болезни была проведена статистическая обработка клинических признаков с использованием непараметрического критерия U Манна – Уитни.

Как видно из приведенных данных, клинические показатели пациенток с преэклампсией существенно отличались от параметров в группе пациенток с нормально протекающей беременностью. Так, пациентки с преэклампсией демонстрировали повышенные показатели САД и ДАД, высокий уровень белка в моче, а также наличие выраженных отеков. Приблизительно половину пациенток с преэклампсией обследовали при сроке гестации не превышающем 35 недель. В Таблице 11 представлены результаты исследования корреляционной связи между

клиническими параметрами всех беременных, свидетельствующие о наличии преэклампсии у части пациенток и хорошей зависимости между различными признаками болезни, исключая случайные появления. В биологии считают удовлетворительной корреляцией тогда, когда показатель R – коэффициент корреляции Спирмена превышает 0,3.

**Таблица 11** – Корреляционный анализ клинических параметров (все обследованные беременные)

	<i>САД</i>	<i>ДАД</i>	<i>Отеки степень</i>	<i>Белок в моче</i>	<i>Вес плода</i>	<i>Ст. гипотр.</i>	<i>Срок гестации</i>
САД		0,75	0,79	0,66	-0,30	0,33	-0,41
ДАД	0,75		0,61	0,50	-0,27	0,30	0,26
Отеки степень	0,79	0,61		0,72	-0,40	0,44	-0,50
Белок в моче	0,66	0,50	0,72		-0,45	0,59	0,36
Вес плода	-0,30	-0,27	-0,40	-0,45		-0,79	0,68
Ст. гипотр.	0,33	0,30	0,44	0,59	-0,79		0,45
Срок гестации	-0,41	0,26	-0,50	-0,36	0,68	-0,45	

*Примечание:* \* – при р-значении менее 0,05

Как видно из приведенных данных, была обнаружена выраженная статистически значимая прямая корреляционная связь между показателями САД и ДАД, степенью отеков, концентрацией белка в моче и степенью ЗРП. Обращает на себя внимание наличие обратной корреляционной связи между сроком гестации и показателями САД, степенью отеков и концентрации белка в моче.

Результаты исследования характеристик внеклеточной клеточной ДНК у пациенток с нормально протекающей беременностью и пациенток с преэклампсией выявили специфические изменения вкДНК, которые представлены в Таблице 12.

У пациенток с преэклампсией независимо от срока гестации было выявлено повышенное содержание мтДНК в составе вкДНК, свидетельствующее о апоптозе. Аналогичные данные были получены для интегративных показателей

«вк мтДНК/клет. мтДНК», значения медиан которых у пациенток с преэклампсией были существенно выше, чем в группе здоровых беременных.

**Таблица 12** – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с преэклампсией и у здоровых беременных

	<i>Условно здоровые беременные (n=70)</i>	<i>Беременные с преэклампсией (n=57)</i>
Концентрация вкДНК нг/мл	78,4±3,09	1133,45±321,23
Нукл акт, ед./мл	4,4±2,7	15,42±1,44
вк мтДНК число копий/микролитре	140,82±23,18	550,39±74,12
клет. мтДНК число копий/микролитре	238,39±18,02	201,37±6,30
вк мтДНК / клет. мтДНК	0,56±0,10	3,12±0,45
<i>Примечание: * – при значении p менее 0,05. Клеточную ДНК выделяли из клеток крови, вк ДНК выделяли из образцов плазмы беременных, вкДНК-внеклеточная ДНК. вк мтДНК – митохондриальная ДНК в составе вкДНК. мтДНК – митохондриальная ДНК в составе клеточной ДНК</i>		

Исследование количества митохондриальных копий в составе клеточной ДНК (выделена из клеток крови – лейкоцитов) не выявило статистически значимых различий между группой пациенток с преэклампсией и группой с нормально протекающей беременностью, свидетельствующие о целостности клеточных ядер. В группе пациенток с преэклампсией были также зарегистрированы значительные изменения концентрации и состава вкДНК по сравнению с группой условно здоровых. При нормальной беременности концентрация вкДНК варьировала от 2,0 до 347 нг/мл (медиана 78,4 нг/мл). У пациенток с преэклампсией концентрация вкДНК варьировала от 67,0 до 11579,3 нг/мл (медиана 589,3 нг/мл;  $p = 0,001$ ). В соответствии с повышением общего уровня вкДНК в кровотоке, у пациенток с преэклампсией было обнаружено статистически значимое повышение активности ДНКазы I в образцах плазмы. При условно физиологической беременности (здоровые беременные) активность ДНКазы I варьировала от 0,8 до 14,8 ед./мл (медиана 4 ед./мл), а при беременности, осложненной преэклампсией – от 3,7 до 52,4 ед./мл (медиана 12,6 ед./мл;  $p = 0,0301$ ).

Кроме того, у пациенток с преэклампсией было выявлено повышенное содержание мтДНК копий в составе вкДНК. Так, значения медиан количества копий мтДНК в группе с преэклампсией составили, соответственно, 394,0 у.е. против 96,7 у.е. в группе здоровых (оба  $p < 0,0001$ ). При этом, чем выше обнаруживалась концентрация вкДНК в крови пациенток, тем больше в ней регистрировалось повторов вк мтДНК. Аналогичные данные были получены для интегративных показателей «вк мтДНК / клет. мтДНК», значения медиан которых у пациенток с преэклампсией составляли, соответственно, 2,41 против 0,38 в группе пациенток с не осложненной беременностью (оба  $p < 0,0001$ ) и свидетельствовали, по крайней мере, о повреждении нейтрофильных лейкоцитов. У пациенток с тяжелой ПЭ количество повторов мтДНК в составе вкДНК возрастало более чем 78% от 400 до 2182 копий.

В Таблицах 13, 14 представлены результаты исследования корреляционной зависимости между характеристиками вкДНК и клиническими параметрами.

**Таблица 13** – Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и концентрацией вкДНК

	<i>Концентрация вкДНК в образцах плазмы</i>		
	Все беременные	Условно здоровые	Преэклампсия
	R	R	R
Возраст	<b>-0,02</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,10</b>
САД	0,32	0,11	0,12
ДАД	0,16	0,12	-0,09
Отеки степень	0,39	0,10	0,30
Белок в моче	0,39	0,02	0,33
Вес плода	-0,40	0,19	-0,56
Ст. гипотр.	0,40	–	0,42
Срок гестации	-0,32	0,14	-0,24
<i>Примечание:</i> * – при р-значении менее 0,05			

Как видно из данных, приведенных в Таблице 13, в группе пациенток с преэклампсией была выявлена умеренно выраженная, но статистически значимая, положительная корреляционная связь между концентрацией вкДНК и уровнем

белка в моче ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,023$ ), степенью отеков ( $R = 0,30$ ;  $p = 0,034$ ) и ЗРП ( $R = 0,42$ ;  $p = 0,002$ ). Кроме того, у пациенток с преэклампсией была обнаружена выраженная отрицательная корреляция между концентрацией вкДНК и весом плода ( $R = -0,56$ ;  $p = 0,003$ ).

Статистически значимая корреляционная связь между уровнем вкДНК и клиническими параметрами была выявлена для всех обследованных пациенток. В частности, концентрация вкДНК положительно коррелировала с показателями САД, степенью отеков, уровнем белка в моче и ЗРП. Отрицательная корреляционная связь была обнаружена между уровнем вкДНК и весом плода, а также между уровнем вкДНК и сроком гестации. У пациенток с нормально протекающей беременностью концентрация вкДНК и клинические параметры слабо коррелировали между собой.

**Таблица 14** – Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и содержанием мтДНК в образцах вкДНК

	<i>Содержание мтДНК в образцах вкДНК</i>		
	Все беременные	Условно здоровые	Преэклампсия
	R	R	R
Возраст	0,10	0,08	0,09
САД	0,42	-0,04	-0,03
ДАД	0,32	0,23	-0,08
Отеки степень	0,57	0,31	0,22
Белок в моче	0,56	0,36	0,30
Вес плода	-0,27	0,14	-0,18
Ст. гипотр.	0,33	–	0,15
Срок гестации	-0,40	0,01	-0,18
<i>Примечание:</i> * – при р-значении менее 0,05			

Как видно из данных, приведенных в Таблице 14, в общей группе беременных пациенток с осложненной и не осложненной беременностью была выявлена статистически значимая, положительная корреляционная связь между содержанием вк мтДНК в плазме и показателями САД и ДАД, степенью отеков, уровнем белка в моче, ЗРП. Кроме того, в группе из всех обследованных была обнаружена



отрицательная корреляционная связь между содержанием вк мтДНК в плазме и весом плода, а также между содержанием вк мтДНК в плазме и сроком гестации. Статистически значимая корреляционная связь между уровнем вк мтДНК в плазме и концентрацией белка в моче была выявлена в группе пациенток с преэклампсией.

У всех в общей массе беременных была также выявлена выраженная статистически значимая положительная корреляционная связь между интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и значениями САД и ДАД, степенью отеков, уровнем белка в моче и степенью ЗРП. Одновременно, статистически значимая отрицательная корреляционная связь (Таблица 15) была обнаружена между интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и весом плода ( $R = -0,40$ ;  $p = 0,005$ ), а также между показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и сроком гестации ( $R = -0,49$ ;  $p < 0,001$ ).

**Таблица 15** – Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК»

	<i>Соотношение внеклеточная мтДНК / клеточная мтДНК</i>		
	Все беременные	Условно здоровые	Преэклампсия
	R	R	R
Возраст	0,12	0,15	0,06
САД	0,58	-0,03	0,07
ДАД	0,44	0,23	-0,05
Отеки степень	0,73	0,46	0,26
Белок в моче	0,64	0,46	0,25
Вес плода	-0,40	0,09	-0,19
Ст. гипотр.	0,37	–	0,10
Срок гестации	-0,49	-0,02	-0,17

*Примечание:* \* – при р-значении менее 0,05

У беременных с преэклампсией показатель «вк мтДНК/клет. мтДНК» и клинические параметры слабо коррелировали между собой.

Проведенный частотный анализ (см. Таблицу 16) выявил значительные колебания изучаемых показателей, однако в большинстве наблюдениях у беременных с преэклампсией они отличались от небеременных и здоровых.

**Таблица 16** – Результаты частотного анализа исследуемых показателей по группам наблюдений

	<i>Условно здоровые</i>	<i>Умеренная преэклампсия</i>	<i>Тяжелая преэклампсия</i>
<i>Концентрация вкДНК, нг/мл</i>	34–250 (78,3%) 251–503 (21,7%)	67–500 (64,7%) 501–946,4 (35,3%)	589,3–1000 (40,9%) 1001–11579,3 (59,1%)
<i>Нуклеазная активность, ед./мл</i>	0,8–6,9 (70%) 7–14,8 (30%)	4–6,9 (18,8%) 7–30,7 (81,2%)	3,7–6,9 (16,7%) 7–52,4 (83,3%)
<i>вк мтДНК</i>	23–250 (65,2%) 251–549 (34,8%)	21–250 (40,0%) 251–2510,1 (60,0%)	21–250 (22,7%) 251–2181,4 (77,3%)
<i>Отношение вк мтДНК /клет. мтДНК</i>	0,08–0,60 (57,1%) 0,61–1,64 (42,9%)	0,11–0,60 (22,2%) 0,61–13,35 (77,8%)	0,09–0,60 (14,3%) 0,61–13,22 (85,7%)

Полученные результаты показывают, что при преэклампсии, сопровождающейся повышением артериального давления, отеками происходит повышение концентрации вкДНК и изменение ее характеристик, в частности повышается количество митохондриальных копий в составе вкДНК и существенно возрастают значения интегративных показателей «вк мтДНК/клет. мтДНК», что свидетельствует о повреждении митохондрий и выходе продуктов их деградации в периферическое русло. Концентрация вкДНК, содержание митохондриальных фрагментов в ее составе, а также интегральный показатель высоко коррелировали с клиническими параметрами, характеризующими состояние плода и матери.

Следует отметить, что при индивидуальном анализе наших наблюдений у беременных с преэклампсией клиническая картина заболевания не всегда совпадала с результатами исследования вкДНК. Так, при умеренной ПЭ и почти физиологических колебаниях вкДНК (от 67 до 500 нг/мл) САД и ДАД превышали нормативные показатели у 14 из 22, уровень белка в моче у 13 из 22, отеки у 16 из 22, задержка роста плода зарегистрирована у 4 из 22 беременных. При колебаниях вкДНК от 500 до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры у 6 из 13, белок в моче у 6 из 13, умеренные отеки наблюдались у 6 из 13, головная боль – у 5 из 13, ЗРП у 2 из 13 пациентов.

При тяжелой преэклампсии у 9 из 22 беременных концентрация вкДНК была от 589 до 1000 нг/мл, у остальных 13 превышала эту величину. У пациенток, имеющих в крови концентрацию вкДНК до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры в 4 из 9, белок в моче – в 6 из 9, выраженные отеки – в 8 из 9, головная боль – в 3 из 9, ЗРП в 1 из 9 наблюдений. При концентрациях вкДНК в крови беременных выше 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические показатели в 10 из 13, белок в моче – в 10 из 13, выраженные отеки в 11 из 13, головная боль – в 6 из 13, ЗРП – в 6 из 13 наблюдений.

Полученные результаты вкДНК и клинические характеристики пациентов свидетельствуют либо о гипердиагностике преэклампсии, либо о неизвестных еще компенсаторных возможностях у части наших беременных.

В современной медицине хорошим тестом (маркером) является таковой, когда при сравнении 2 групп он не встречается в группе сравнения примерно в 70%. В наших исследованиях практически по всем параметрам таких наблюдений было большинство при сравнении с группой здоровых и беременных с умеренной преэклампсией и при сравнении пациенток с умеренной и тяжелой преэклампсией.

Следует отметить, что у пациенток в 23% при умеренной и в 36% при тяжелой преэклампсии новорожденные родились с ЗРП различной степени тяжести. Тяжесть ЗРП при умеренной форме ПЭ в 4 наблюдениях составила 1-я ст., в 3 – 2-я ст., в 1 – 3-я ст. При тяжелой форме ПЭ наблюдалось более выраженное внутриутробное страдание плодов: 1-я ст. ЗРП зарегистрирована у 2, 2-я ст. – у 5, 3-я ст. – у 1 из родильниц. При этом в крови пациенток с умеренной ПЭ в 4 из 8 наблюдений концентрация вкДНК колебалась от 611 до 946 нг/мл, нуклеазная активность от 11,1 до 21,6 ед./мл, а количество повторов мтДНК в составе вкДНК уже в 5 из 8 наблюдений превышало физиологическое значение и колебалось 370 до 1169. При тяжелой ПЭ в крови этих беременных вкДНК превышала 1000 нг/мл, нуклеазная активность колебалась в 6 наблюдениях от 9,5 до 19,9 ед./мл, а количество копий мтДНК в составе вкДНК уже в 7 из 8 наблюдений превышало физиологические значения, колеблясь 257 до 1342 копий.

Клеточная мтДНК в составе вкДНК при этом существенно не менялась. Следовательно, изменения, обнаруженные нами при исследовании вкДНК ее состав и нуклеазная активность, в большей мере были связаны тяжестью ПЭ, чем выраженностью ЗРП.

Индивидуальный анализ тяжелых форм преэклампсии показал, что при критических формах происходили самые выраженные изменения вкДНК и ее характеристик. Так, в группе беременных с преэклампсией тяжелой степени (критическая форма) заболевания была выявлена в 6 наблюдениях. У этих беременных в крови выявлена концентрация вкДНК от 1595 до 11579 нг/мл, нуклеазная активность от 9,5 до 28,9 ед./мл, вк мтДНК от 257 до 938 повторов, клет. мтДНК от 212 до 348 повторов, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК от 2,83 до 4,64. Сравнение полученных результатов вкДНК с данными беременных при критической форме преэклампсии в 5 из 6 наблюдений не выявило перекреста данных вкДНК и ее характеристик с таковыми у беременных с преэклампсией умеренной и тяжелой формы.

Таким образом проведенные исследования показали, что при тяжелой преэклампсии выявляются пороговые значения молекулярно-биологических факторов: концентрация вкДНК выше 1000 нг/мл, нуклеазная активность выше 10 ед./мл, вк мтДНК более 250 повторов, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК более 1,64.

### **3.3. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при плацентарной недостаточности и задержке роста плода**

До настоящего времени патогенез развития плацентарной недостаточности остается невыясненным. По данным [Sur Chowdhury C., Hahn S., Hasler P. et al., 2016; Ermakov A. V., Kostyuk S. V., Konkova M. S. et al., 2016; Muñoz-Hernández R., Medrano-Campillo P., Miranda M. L. et al., 2017.] она развивается в результате некоторой иммунной маладаптации между матерью и плодом в течение самых первых недель беременности, приводя к развитию бессимптомных нарушений и отелонение в плодово-материнских иммунных взаимодействиях в стенке матки, которые приводят к артериальной инвазии трофобластными клетками. Это вызывает преобразование спиральных артерий и впоследствии ухудшает плацентарную перфузию. Хроническая гипоксия вызывает оксидантный стресс ткани и увеличивают уровень плацентарного апоптоза и некроза [Hahn S., Giaglis S., Buser A., 2014; Nadeau-Vallée M., Obari D., Palacios J. et al., 2016]. Клинические нарушения возникают тогда, когда материнские сосудистые и иммунные системы не могут больше взаимодействовать с увеличенной потерей плацентарным образом аберрантных провоспалительных, антиангиогенных факторов, приводя к системной дисфункции эндотелиальной клетки и высокой воспалительной реакции [Urbanova M., Plzak J., Strnad H. et al., 2010; Hahn S., Giaglis S., Buser A. et al., 2014; Nadeau-Vallée M., Obari D., Palacios J. et al., 2016]. Поэтому, для выяснения критического состояния плаценты и плода, нами проанализированы 3 группы пациенток примерно одинакового возраста (22–40 лет), проживающих в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. Группа 1 – небеременные, практически здоровые пациентки (N = 40) (22–40 лет), представляла студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров); группа 2 – беременные с нормально протекающей беременностью сроком более 37 недель (N = 40), которые родили здоровых детей без признаков гипоксии и ЗРП; группа 3 – пациентки с проблемной беременностью, с клиническими диагнозами: плацентарная недостаточность, ЗРП, хроническая гипоксия плода,

несостоятельный рубец на матке; сроком более 30 недель, родившие детей с признаками ЗРП (N = 40). 80 рожениц были обследованы в момент родов.

Проведенные исследования показали, что во второй группе наблюдений (пациентки с нормально протекающей беременностью) оценка сердечной деятельности плода по шкале Фишера колебалась от 7 до 10 баллов, объемный кровоток в аорте от 180 до 260 мл/мин, в вене пуповины от 86 до 140 мл/мин на кг. В 3-й группе регистрировались в 28 из 40 наблюдений снижение функционального состояния плода по шкале Фишера от 4 до 7 баллов, объемный кровоток в аорте плода от 120 до 174 мл/мин, в вене пуповины от 60 до 86 мл/мин на кг.

Характеристика пациенток с ЗРП I–III степени тяжести представлена в Таблице 19.

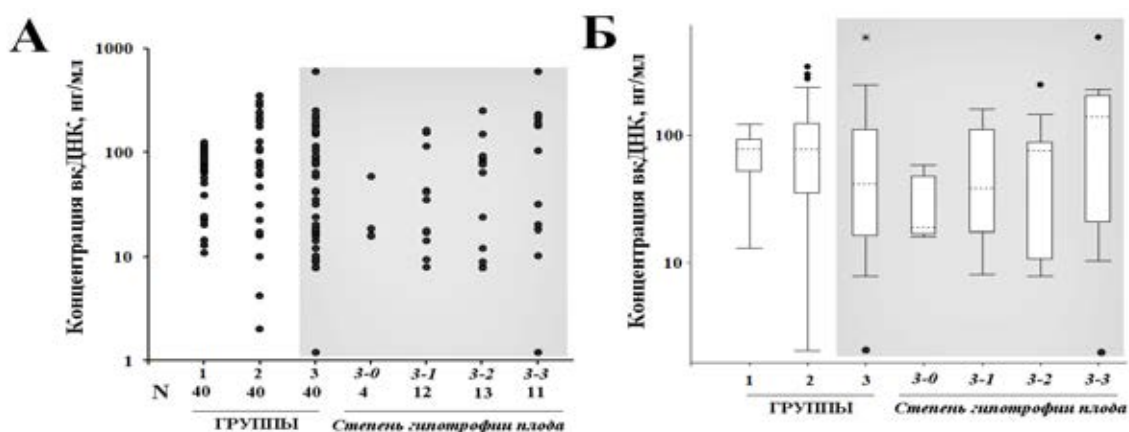
**Таблица 19** – Характеристика пациенток с ЗРП

	Пациентки с ЗРП I ст.	Пациентки с ЗРП II ст.		Пациентки с ЗРП III ст.		
	N = 16	N = 13		N = 11		
			p1		p1	p2
Кровоток в аорте	220 154÷254	150 126 ÷ 180	0,0002	122 120÷142	0,0001	0,0005
Кровоток в пуповинной вене	110 82÷120	80 64 ÷ 86	0,0001	64 60÷68	0,0001	0,0002
Реверсивный кровоток в артерии пуповины или аорте	–	1 (7,7%)	1,0000	6 (54,5%)	0,0124	0,0233
Преждевременные роды	–	3 (23,1%)	0,2228	4 (36,3%)	0,0902	0,6591
Баллы по шкале Фишера	8 7÷9	6,5 6÷7	0,0001	5 4,5÷6	0,0001	0,0002
Срок беременности (недели)	40 38÷41	38 36÷41	0,0397	37 30÷40	0,0008	0,0084
Вес плода (г)	2790 2630÷3030	2520 2350÷2650	0,0001	1720 600÷2270	0,0001	< 0,0001
Рост плода (см)	48 47 ÷ 51	47 46 ÷ 50	0,0221	43 29÷47	0,0002	0,0010

Наиболее значительные изменения функционального состояния плода были зарегистрированы у пациенток при ЗРП II и III степени. У пациенток с ЗРП II степени были выявлены нарушения маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока. При ЗРП III степени регистрировались нарушения

плодо-плацентарного кровотока – нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока. У пациенток с ЗРП II и III степени было зарегистрировано снижение функционального состояния плода – оценки по шкале Фишера ниже 7 баллов и нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока.

На Рисунке 8А указана численность групп и подгрупп (N). При нормальной беременности концентрация вкДНК варьировала от 2 до 241 нг/мл (медиана 71 нг/мл), при беременности с ЗРП концентрация вкДНК варьировала от 0,1 до 596 нг/мл (медиана 41 нг/мл). Согласно критерию Манна – Уитни эти группы не отличаются достоверно между собой ( $p > 0,05$ ). Можно отметить, что во 2-й и в 3-й группах у 9 образцов (22,5%) концентрации вкДНК превышали верхнюю границу для небеременных (123 нг/мл).



*Примечание:* 1 – небеременные; 2 – беременные с нормально протекающей беременностью и 3 – беременность, осложненная ЗРП. Помимо этого, 3-я группа поделена на 4 подгруппы: 3-0 – нет ЗРП, 3-1 – ЗРП 1-й степени, 3-2 – ЗРП 2-й степени, 3-3 – ЗРП 3-й степени

**Рисунок 8** – Значения концентраций вкДНК (А) и данные описательной статистики (Б) для образцов плазмы крови трех выборок пациенток

Обращает на себя внимание факт значительного разброса данных у беременных, особенно в группе 3, по сравнению с небеременными. Коэффициенты вариации изменялись в ряду 0,42 (группа 1) < 0,87 (группа 2) < 1,37 (группа 3). У пациенток групп 2 и 3 по сравнению с группой 1 выявляются подгруппы с более низкими и более высокими значениями концентрации вкДНК. В 3-й группе концентрации вкДНК несколько снижены по сравнению со 2-й

группой. Если отбросить выпадающее максимальное значение концентрации вкДНК для одного образца подгруппы 3 (596 нг/мл), в котором новорожденный родился еще и в состоянии острой гипоксии, то наблюдается достоверное снижение концентрации вкДНК в 3-й группе по сравнению со 2-й группой ( $p < 0,05$ ;  $N_2 = 40$ ;  $N_3 = 39$ ). В подгруппах группы 3, сформированных по значениям степени ЗРП, концентрации вкДНК также изменялись в широких пределах. Значения медиан концентраций вкДНК в данных подгруппах уменьшались в ряду: 3-3 (143 нг/мл) > 3-2 (76 нг/мл) > 3-1 (38 нг/мл) > 3-0 (16 нг/мл). Однако различия между подгруппами были недостоверны ( $p > 0,05$ ) вследствие малочисленности наблюдений и большого разброса значений. Одновременно можно отметить, что чем выше степень ЗРП в подгруппе, тем больше в ней число образцов с высокими значениями концентрации, превышающими верхнюю границу для небеременных пациенток:

3-0 (0%), 3-1 (16%), 3-2 (17%) и 3-3 (45%). Таким образом, мы не зафиксировали ожидаемого увеличения концентрации вкДНК в крови беременных пациенток по сравнению с небеременными. Более того, при патологии, когда ожидали значительного повышения концентрации вкДНК, мы определили, напротив, снижение концентрации вкДНК по сравнению с нормально протекающей беременностью.

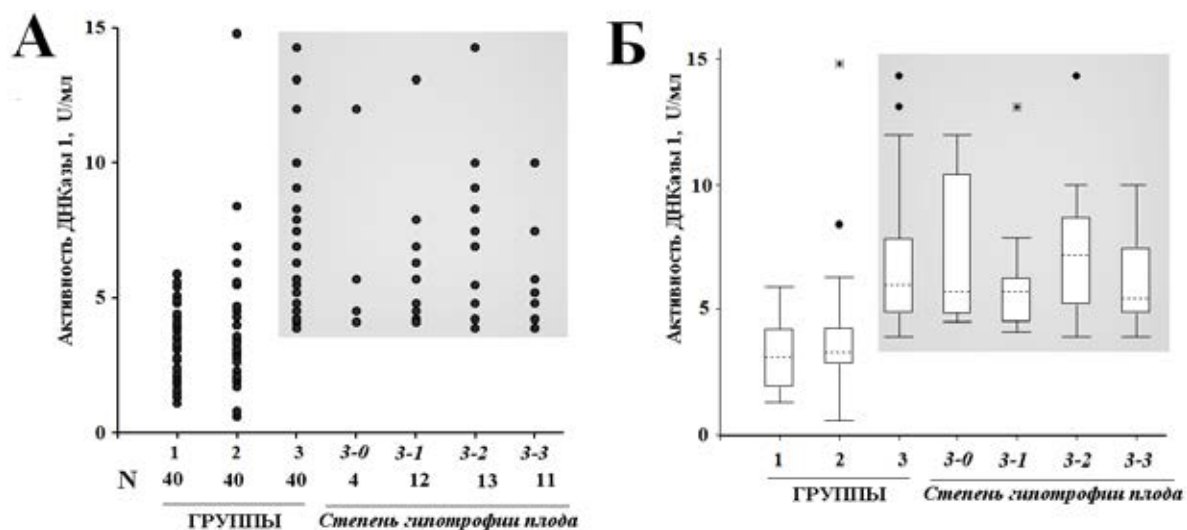
Основной причиной снижения концентрации вкДНК может быть повышение активности компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из факторов, влияющих на элиминацию вкДНК, является активность фермента, отвечающего за гидролиз вкДНК - ДНКазы 1 плазмы крови.

### **Изменение активности ДНКазы 1 плазмы крови матери при нормальной и осложненной беременности с ЗРП**

Проведенные исследования активности ДНКазы 1 в плазме крови 120 пациенток стандартным методом радиальной диффузии показали, что у небеременных активность ДНКазы 1 в плазме крови варьировала от 1,1 до 6 U/мл (медиана 3,2U/мл). На Рисунке 9А приводятся значения активности ДНКазы 1 в



трех группах и четырех подгруппах группы 3. На Рисунке 9Б приведены данные описательной статистики.



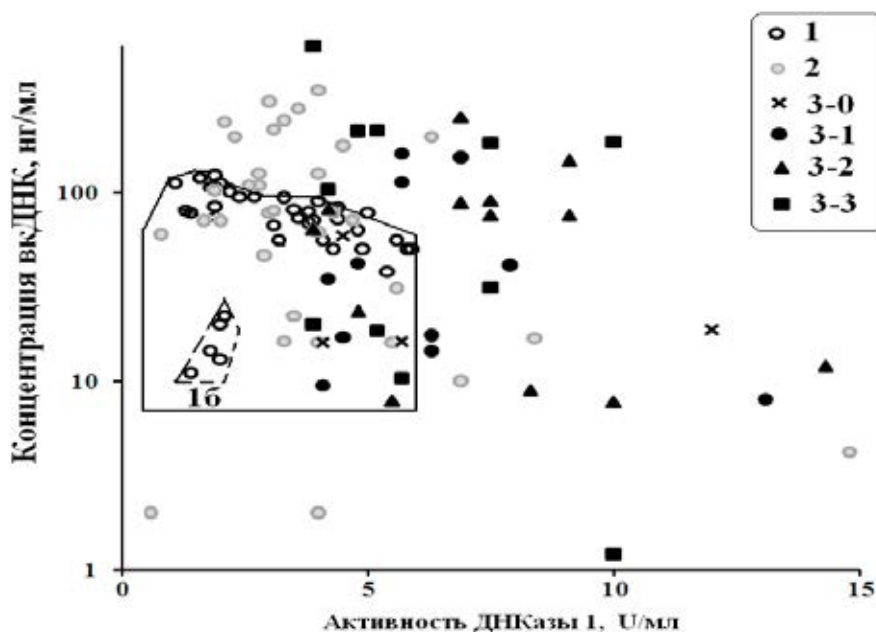
**Рисунок 9** – Значения активности ДНКазы 1 (А) и данные описательной статистики (Б) для образцов плазмы крови трех групп пациенток. Приводятся также данные для подгрупп группы 3

При нормальной беременности активность ДНКазы 1 варьировала от 0,8 до 14,8 U/мл (медиана 3,4 U/мл) и в случае беременности с ЗРП – от 3,9 до 14,3 U/мл (медиана 6 U/мл). Согласно критерию Манна – Уитни выборки 1 и 2 не отличаются достоверно между собой ( $p > 0.05$ ). Однако выборка 3 с высокой вероятностью отличается от выборки 1 ( $p < 10^{-7}$ ) и выборки 2 ( $p < 10^{-5}$ ). Таким образом, плазма крови беременных, у которых диагностировали ЗРП, характеризуется высокими значениями активности ДНКазы1, по сравнению с плазмой крови беременных с нормально протекающей беременностью и по сравнению с плазмой небеременных пациенток. У 19 из 40 (47,5%) беременных группы 3 тестировали высокие значения активности ДНКазы 1, которые не встречались в выборке небеременных пациенток. В группе 2 повышенные значения активности ДНКазы 1 встречались только у 4 (10%) беременных.

Различий в значениях активности ДНКазы 1 между подгруппами группы 3 не обнаружили.

**Зависимость концентрации вкДНК от активности ДНКазы 1 плазмы крови**

На Рисунке 3 приводятся зависимости концентрации вкДНК в плазме крови от значений активности ДНКазы 1. Ломаной линией на Рисунке 10 обозначено поле точек для небеременных пациенток (группа 1).



*Примечание:* Ломаной сплошной линией обозначена область значений для небеременных (группа 1, прозрачные кружки). Группа 2 – серые кружки, группа 3 – черные фигуры (обозначения подгруппы группы 3 приведены на рисунке)

**Рисунок 10** – Зависимость концентрации вкДНК плазмы крови пациенток от значений активности ДНКазы 1 плазмы крови

У небеременных (прозрачные кружки) образцы плазмы можно разделить на 2 подгруппы (1а и 1б). Для 35 (1а подгруппа, 87,5%) образцов плазмы наблюдается выраженная линейная зависимость концентрации вкДНК от значений активности ДНКазы 1. 5 образцов (1б подгруппа, выделены пунктирной линией) характеризуются низкими значениями и концентрации вкДНК (11–22 нг/мл) и активности ДНКазы 1 (1,4–2,1 U/мл).

В область значений, характерной для небеременных, обозначенной на Рисунке 10 ломаной линией, вошли 25 (2б подгруппа, включены также 2 образца с аномально низкими значениями вкДНК и ДНКазы 1, см. Рисунок 3) и 16 (3б подгруппа) образцов плазмы соответственно 2-й и 3-й групп. Стоит отметить, что активность ДНКазы 1 для образцов плазмы подгруппы 3б в этой области выше, чем для группы 1 и подгруппы 2б.

Остальные образцы групп 2 и 3 находятся вне области значений, характерной для небеременных. Для этих образцов наблюдается линейная зависимость между рассматриваемыми параметрами. Ниже приведены уравнения линейной регрессии ( $y = A - kx$ ), отражающие зависимости концентрации от активности ДНКазы 1 в трех подгруппах, и данные статистики.

$$1a. y = 123 - 13x \quad (n = 35) \quad k = -0,8, \quad p \ll 0,0001$$

$$2a. y = 275 - 21x \quad (n = 15) \quad k = -0,7, \quad p < 0,01$$

$$3a. y = 354 - 30x \quad (n = 24) \quad k = -0,62, \quad p < 0,002$$

Значения коэффициента  $A$  в уравнении отражают средний гипотетический уровень вкДНК в отсутствие активности ДНКазы 1 ( $x = 0$ ). По-видимому, этот уровень отражает количество гибнущих клеток организма при прочих равных условиях. Можно предположить, что уровень гибели клеток изменяется в ряду:

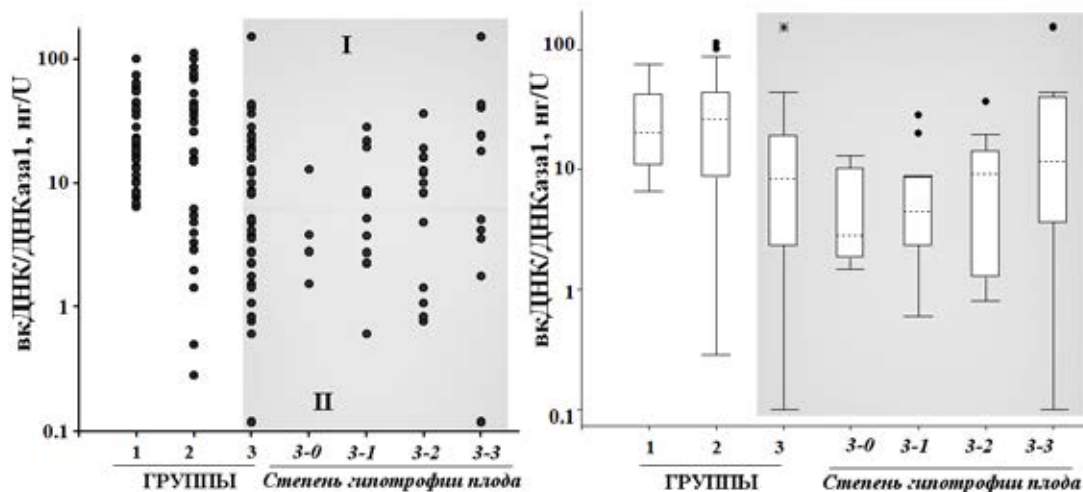
**Группа 1 (небеременные) < группа 2 (нормальная беременность) < группа 3 (ЗРП)**

Коэффициент  $k$  в уравнениях отражает скорость снижения концентрации вкДНК при изменении активности ДНКазы 1. Этот коэффициент увеличивается в ряду.

При одних и тех же изменениях активности ДНКазы 1 плазмы крови уменьшение концентрации вкДНК гораздо сильнее выражено в группе 3 (ЗРП). Мы ввели показатель, отражающий количество вкДНК, приходящееся на единицу активности ДНКазы 1: вкДНК/ДНКазы 1 (Рисунок 11). Согласно критерию Манна – Уитни группы 1 и 2 по этому показателю не отличаются достоверно между собой ( $p > 0,05$ ). Однако группа 3 с высокой вероятностью отличается от 1-й ( $p < 0,001$ ) и 2-й ( $p < 0,001$ ) групп.

В Таблице 20 приведены значения медиан, интервалы варьирования и данные регрессионного анализа зависимости показателя вкДНК/ДНКазы 1 от концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1 для трех групп. Эти данные указывают на уменьшение значения активности ДНКазы 1, как основного фактора элиминации вкДНК из кровотока при беременности и, особенно, при осложненной беременности (группа 3). Низкие значения концентраций вкДНК на

фоне умеренного увеличения активности ДНКазы 1 (подгруппы 2б и 3б), по-видимому, также указывают на дополнительные факторы элиминации вкДНК из кровотока.



**Рисунок 11** – Значения показателя вкДНК/ДНКазы 1 (А) и данные описательной статистики (Б) для образцов плазмы крови трех групп пациенток. Приводятся также данные для подгрупп группы 3

ЗРП может быть охарактеризована такими объективными параметрами, как вес и рост плода и отношение двух величин. Мы проанализировали зависимость этих показателей, а также длительность беременности, от концентрации вкДНК, активности ДНКазы 1 и показателя вкДНК/ДНКазы 1 методом линейной регрессии (Таблица 20).

### **Зависимость показателей ЗРП от параметров, характеризующих вкДНК**

**Таблица 20** – Анализ зависимости показателей развития плода и длительности беременности от концентрации вкДНК, активности ДНКазы 1 и показателя вкДНК/ДНКазы 1 методом линейной регрессии для группы 3 (ЗРП)

Сравниваемый параметр	Вес плода		Рост плода		Вес/рост		Длительность беременности, недели	
	k	p	k	p	k	p	k	p
Концентрация вкДНК	-0,63	< 0,0001	-0,74	< 0,0001	-0,63	< 0,0001	-0,6	< 0,0001
Активность ДНКазы 1	0,01	0,92	0,02	0,8	0,01	0,8	0,1	0,6
вкДНК/ДНКазы 1	-0,55	0,0004	-0,62	<0,0001	-0,54	0,0005	-0,5	0,001

Концентрация вкДНК и показатель вкДНК/ДНКазы I отрицательно коррелировали со всеми показателями состояния плода: чем выше были концентрации вкДНК в крови матери и показатель вкДНК/ДНКазы I, тем меньше гестационный возраст плода, рост и вес плода. Активность ДНКазы I не коррелирует с перечисленными показателями (Таблица 20).

**Таблица 21** – Концентрация вкДНК и уровень активности ДНКазы I у пациенток с ЗРП различной степени тяжести

Показатели	Пациентки с ЗРП I степени	Пациентки с ЗРП II степени	Пациентки с ЗРП III степени			
	N = 16	N = 13	N = 11			
			p1		p1	p2
Концентрация вкДНК (нг/мл)	34,7 8,0 ÷ 160,7	76,0 7,8 ÷ 251,1	0,817	103,5 1,2 ÷ 595,7	0,212	0,354
Активность ДНКазы IU/мл	5,7* 4,1 ÷ 13,1	7,5* 3,9 ÷ 14,3	0,183	5,2* 3,9 ÷ 10,0	0,793	0,271
Соотношение вкДНК/ДНКазы I	5,2* 0,6 ÷ 28,2	10,1* 0,8 ÷ 36,4	0,817	18,5 0,1 ÷ 152,7	0,325	0,271

*Примечание:* 1) результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); 2) p1 – значения p при сравнении с группой пациенток с ЗРП I степени; 3) p2 – значения p при сравнении с группой пациенток с ЗРП II степени; 3) \* – p < 0,01 при сравнении с группами здоровых небеременных и беременных пациенток

Частотный анализ наших наблюдений показал, что у подавляющего числа беременных при ЗРП плода 2-й и 3-й степеней в крови матерей регистрируется снижение концентрации вкДНК меньше 100 (нг/мл) и увеличение активности ДНКазы I более 7,5 (U/мл).

Известно, что при острых эндогенных и экзогенных воздействиях в организме усиливаются процессы гибели клеток. ДНК погибших клеток поступает частично в циркуляцию, образуя пул вкДНК. ВкДНК влияет на многие параметры функционирования организма. Во-первых, вкДНК может изменять гемодинамические свойства крови [Конорова И. Л., Вейко Н. Н., Ершова Е. С. и др., 2009]. Низкомолекулярная вкДНК увеличивает гидродинамическое сопротивление и турбулентность потока, тогда как длинные фрагменты ДНК значительно снижают сопротивление, повышая ламинарность потока. вкДНК воздействует на многие клетки организма. Циркулирующая ДНК может усилить окислительный стресс, стимулировать синтез провоспалительных цитокинов и

индуцировать стерильное воспаление [Speranskii A. I., Kostyuk S.V., Veiko N. N. et al., 2015]. Организм защищается от негативного действия избыточных количеств вкДНК путем активации системы элиминации вкДНК из кровотока. У здоровых, небеременных пациенток мы обнаружили выраженную отрицательную корреляцию между количеством вкДНК в плазме и активностью ДНКазы 1. По-видимому, активность ДНКазы 1 в данном случае является основным фактором, ответственным за вывод фрагментов вкДНК из кровотока.

В случае патологии плаценты при беременности, с которой, как правило, ассоциирована ЗРП, клетки плаценты частично погибают в результате апоптоза и/или некроза. В крови матери увеличивается концентрация ДНК из клеток плаценты. Предполагается, что эта ДНК индуцирует в организме матери также усиление апоптоза, что сопровождается повышением количества вкДНК из материнских клеток в плазме крови. Таким образом, при ЗРП следует ожидать значительного увеличения общей концентрации вкДНК в плазме матери. Очевидно, в начале патологического процесса, который индуцирует повышенный уровень гибели клеток плаценты, такое увеличение количества вкДНК имеет место. Далее активируется защитный механизм – элиминация избыточных количеств вкДНК из кровотока. Одним из компонентов системы элиминации вкДНК является эндонуклеазная активность крови. Основной эндонуклеазой в крови является ДНКаза 1, гидролизующая фосфодиэфирные связи в цепях ДНК. Накопление в цепях одонитевых разрывов приводит к возникновению двухнитевых разрывов и снижению молекулярного веса фрагментов вкДНК. Низкомолекулярные фрагменты вкДНК могут элиминироваться путем почечной фильтрации.

Повышенная активность ДНКазы 1 указывает на наличие патологии, которая сопровождается гибелью клеток. В случае беременности, осложненной ЗРП, мы впервые обнаружили достоверное увеличение активности ДНКазы 1 плазмы, что говорит об увеличении интенсивности процессов гибели клеток в организме беременной. Интересно отметить, что для части образцов плазмы групп 2 и 3 (подгруппы 2б и 3б) мы наблюдали аномально высокое снижение

уровня вкДНК по сравнению с группой 1 на фоне относительно невысоких значений активности ДНКазы 1. В этих подгруппах концентрация вкДНК не зависит от активности ДНКазы 1. В других образцах беременных (подгруппы 2а и 3а) снижение концентрации вкДНК при увеличении активности ДНКазы 1 также было гораздо более высоким, чем в группе 1, хотя и наблюдалась корреляция между концентрацией вкДНК и активностью ДНКазы 1.

Все эти факты указывают на наличие других, наравне с активностью ДНКазы 1, компонентов, ответственных за элиминацию избыточных количеств вкДНК при беременности. К таким факторам можно отнести связывание вкДНК антителами к ДНК и усиление функции почек, направленной на выведение коротких фрагментов вкДНК. Нельзя также исключить, что помимо тестируемой нами активности ДНКазы 1, в плазме крови беременных повышено экспрессируется другой фермент (ферменты), активность которого направлена на гидролиз вкДНК. Эти предположения требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

Высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Видимо, поэтому литературные данные об изменении концентрации вкДНК при патологии беременности столь противоречивы. Однако, если учитывать три показателя – концентрация вкДНК, активность ДНКазы 1 и отношение вкДНК/ДНКазы 1, то в перспективе можно разработать систему мониторинга уровня гибели клеток в организме беременной на протяжении всей беременности (например, один раз в три месяца). Эти показатели дают информацию об уровне гибели клеток и об эффективности работы системы элиминации, которая включает ДНКазу 1 и другие значимые при беременности компоненты. Например, если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы 1 на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при увеличенной активности ДНКазы 1 говорят

о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма. При этом данные ультразвукового исследования могут зафиксировать ЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время для накопления признаков ЗРП, тестируемых ультразвуком.

Таким образом наши исследования впервые описали совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока – фермента ДНКазы I в плазме крови небеременных, пациенток с нормальной беременностью и беременностью, осложненной ЗРП. Мы показали, что концентрация вкДНК в плазме матери не является надежным маркером ЗРП в последнем триместре беременности. Однако одновременное определение концентрации вкДНК и активности ДНКазы I может дать ценную информацию о развитии ЗРП. При ЗРП плода 2-й и 3-й степени в крови регистрируется снижение концентрации вкДНК меньше 100 (нг/мл) и увеличение активности ДНКазы I более 7,5 ед./мл.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плацентарная недостаточность и ассоциированные с ней осложнения, такие как преэклампсия, задержка роста плода (ЗРП), антенатальная гибель плода, преждевременная отслойка плаценты обусловлены патологией формирования плаценты. Данные осложнения являются основными причинами перинатальной заболеваемости и смертности [Сухих Г. Т., Серов В. Н., Адамян Л. В., 2018; Стрижаков А. Н., Мирющенко М. М., Игнатко И. В. и др., 2017; Айламазян Э. К., 2014; Samantha E. P., 2014]. Преэклампсия и плацентарная недостаточность в любом проявлении могут приводить к серьёзным изменениям как в организме матери, вплоть до полиорганной недостаточности, так и плода, приводя к гипоксии.

В настоящее время, по данным ВОЗ преэклампсия осложняет 2,2% беременностей, и имеется тенденция роста частоты ее встречаемости. В структуре материнской смертности преэклампсия занимает 2-е место после кровотечений, в Российской Федерации согласно данным статистики – 3-е место. Плацентарная недостаточность приводит к росту перинатальной смертности до 10% среди доношенных новорожденных и до 49% среди недоношенных, а также к задержке развития плода, частота которой варьирует в широком диапазоне: от 5 до 22%.

Преэклампсию не всегда сопровождает единообразная клиническая картина. По данным Савельевой Г. М. и соавт. (2010), артериальная гипертензия выше 160/100 мм рт. ст. определяется лишь в 25,5% эклампсии, а в остальных находилась в пределах 130/90–150/100 мм рт. ст. и ниже. Протеинурия не была подтверждена в 25% при эклампсии. Выявлены большие различия в тяжести отечного синдрома в характере субъективных симптомов. Наличие всех трех симптомов отмечено только в 58,8% наблюдений [Савельева Г. М., Шалина Р. И., Курцер М. А. и др., 2010]. Проспективное исследование [Douglas K. A., Redman C. W., 1994] при эклампсии показало, что у 38% беременных приступы развились до того, как появились и были диагностированы протеинурия и артериальная гипертензия. К «атипической преэклампсии» относят наблюдения с отсутствием одного или более симптомов [Sibai B. M., Stella C. L., 2009].

В последние годы, с целью диагностики хронических полиорганных нарушений, стали использовать в качестве дополнительных признаков повреждения тканей исследование протеом, ДНК и других нуклеотидов. Обнаружено повышение вкДНК при аутоиммунных заболеваниях [Козлов В. А., 2013; Galeazzi M., Morozzi G., Piccini M. et al., 2003; Leon S. A., Revach M., Ehrlich G. E. et al., 1981], остром инфаркте миокарда [Destouni A., Vrettou C., Antonatos D. et al., 2009], у больных, перенесших острый инсульт [Rainer T. H., Wong L. K. S., Lam W. et al., 2003; Lam N Y., Rainer T. H., Wong L. K. et al., 2006, N 68, p. 71–78], в онкологии [Васильева И. Н, Беспалов В. Г., 2013; Dorval P., Laurent, 2010].

В акушерстве имеется небольшое количество работ, в которых показано, что вкДНК полезна в диагностике преэклампсии и плацентарной недостаточности [Логутова Л. С., и др., 2012; Баев О. Р., 2018]. В этом случае необходимо определять не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК в материнской крови. Основным источником вкДНК плода в крови матери считают гибнущие в результате некроза или апоптоза клеток плаценты [Smid M., 2011]. Обнаружена высокая корреляция между концентрацией в плазме матери последовательностей материнского генома и вкДНК плода [Lo Y. M., 1999]. В акушерской практике роль вкДНК и ее характеристик в диагностике полиорганных системных заболеваний, до настоящего времени мало изучена, а результаты исследований противоречивы.

Поэтому целью исследования явилось повышение качества диагностики тяжелых форм преэклампсии и плацентарной недостаточности во время беременности с помощью внеклеточной ДНК и ее характеристик.

В соответствии с поставленной целью было обследовано 207 пациенток в возрасте 22–40 лет, проживающих в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. Группа 1 – небеременные, здоровые (N = 40), представляла студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров); группа 2 – пациентки с нормально протекающей беременностью (срок гестации более 37 недель; N = 70 – здоровые), которые родили здоровых детей без признаков гипоксии и ЗРП и не страдали преэклампсией; 3-ю группу составили (N = 57) беременные с

преэклампсией, у которых в 35 наблюдениях была умеренная и в 22 наблюдениях преэклампсия тяжелой формы (в 6 наблюдениях – критическая форма). У пациенток с преэклампсией срок беременности при исследовании составлял до 36 недель у 23, больше 36 недель – у 34; группа 4 – пациентки с проблемной беременностью, с клиническими диагнозами: плацентарная недостаточность, ЗРП, хроническая гипоксия плода, несостоятельный рубец на матке (срок гестации более 30 недель, N = 40).

Проведенные исследования показали, что при нормальной беременности не происходит заметных изменений в организме матери и плода в виде повышенного распада клеток – апоптоза. У небеременных концентрация вкДНК варьировала от 11 до 113 нг/мл (медиана 79 нг/мл). При нормальной беременности перед родами концентрация вкДНК колеблется от 2 до 241 нг/мл (медиана 71 нг/мл) и свидетельствовала о невысоком уровне апоптоза. При дополнительном введении данных 34 пациенток, обследованных в сроки 24-36 нед., физиологический уровень вкДНК у беременных составил от 2 до 350 нг/мл. Согласно критерию Манна – Уитни выборки здоровых небеременных и беременных достоверно не отличаются между собой ( $p > 0,05$ ). Активность вк ДНК-казы 1 не превышает 6,1 U/мл.

Исследования также показали, что концентрация вкДНК и ее характеристики имеют отрицательную корреляционную связь со сроком беременности. Учитывая то, что в последующих наших исследованиях из-за тяжести преэклампсии и плацентарной недостаточности беременность прерывали раньше срока путем кесарева сечения, нам представлялось целесообразным отдельно рассмотреть показатели пациенток, обследованных в разные сроки.

Сравнение пациенток с различными сроками гестации выявило незначительные в абсолютном выражении, но статистически значимые различия по возрасту и показателям ДАД. Кроме того, вес плода при УЗ исследовании у пациенток со сроком гестации менее 37 недель был значимо ниже соответствующего показателя в группе пациенток со сроком гестации более 37 недель.

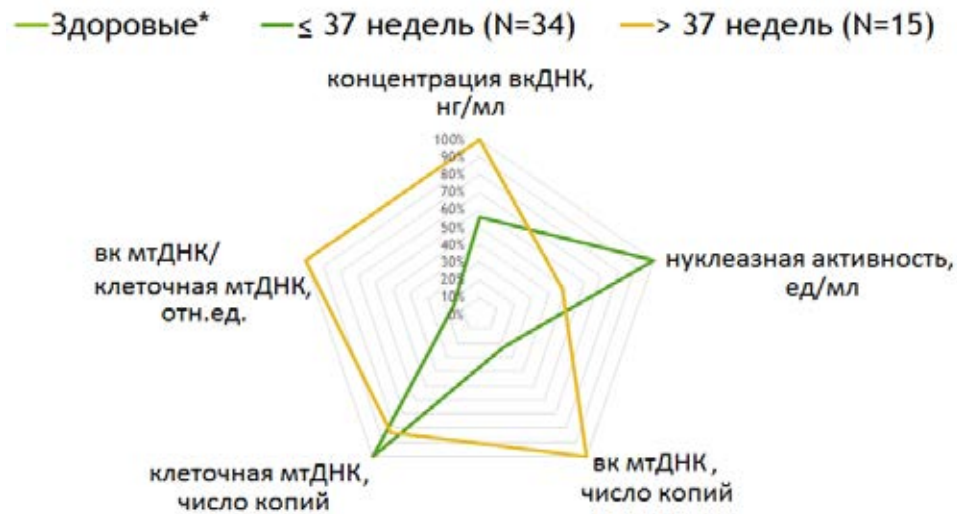
В группе пациенток, обследованных при сроках гестации менее 37 недель, были зарегистрированы изменения концентрации и состава вкДНК по сравнению с группой беременных с доношенной беременностью. У пациенток группы «менее 37 недель» концентрация вкДНК варьировала от 34,0 до 503 нг/мл (медиана 143 нг/мл;  $p = 0,0006$ ). У пациенток со сроком гестации более 37 недель уровень вкДНК плазмы был существенно ниже. Значения данного показателя варьировали от 34,0 до 270,0 нг/мл, значение медианы составило 53 нг/мл ( $p = 0,2016$ ).

Исследование активности ДНКазы I в образцах плазмы показало, что при беременности менее 37 недель активность ДНКазы I варьировала от 0,8 до 14,8 U/мл, а значение медианы составляло 3,4 U/мл. У пациенток со сроком гестации более 37 недель активность ДНКазы I колебалась между 0,8 и 14,3 U/мл, а значение медианы не превышало 2,4 U/мл ( $p = 0,0845$ ).

Концентрация вкДНК в группе пациенток со сроком гестации менее 37 недель достигали максимальных значений, активность ДНКазы I, основной эндонуклеазы крови, не отличалась от соответствующего показателя в группе здоровых. У пациенток со сроком гестации более 37 недель уровень активности ДНКазы I был значимо выше, чем у пациенток с доношенной беременностью. У этих пациенток активность ДНКазы I варьировала от 3,4 до 14,3 ед./мл, а значение медианы составляло 7,1 ед./мл ( $p = 0,0299$ ).

Полученные результаты показывают, что у пациенток со сроком беременности менее 37 недель наблюдаются более выраженные изменения концентрации вкДНК и ее характеристик (см. Рисунок 12).

В наших исследованиях (см. Рисунок 12) не было зарегистрировано существенных различий мтДНК между показателями беременных с физиологической беременностью и пациенток со сроком беременности менее 37 и более 37 недель. Следует отметить, что пациентки двух групп с различными сроками гестации статистически значимо не отличались по количеству митохондриальных повторов в плазме, а также по значениям интегративных показателей «вк мтДНК / клет. мтДНК».



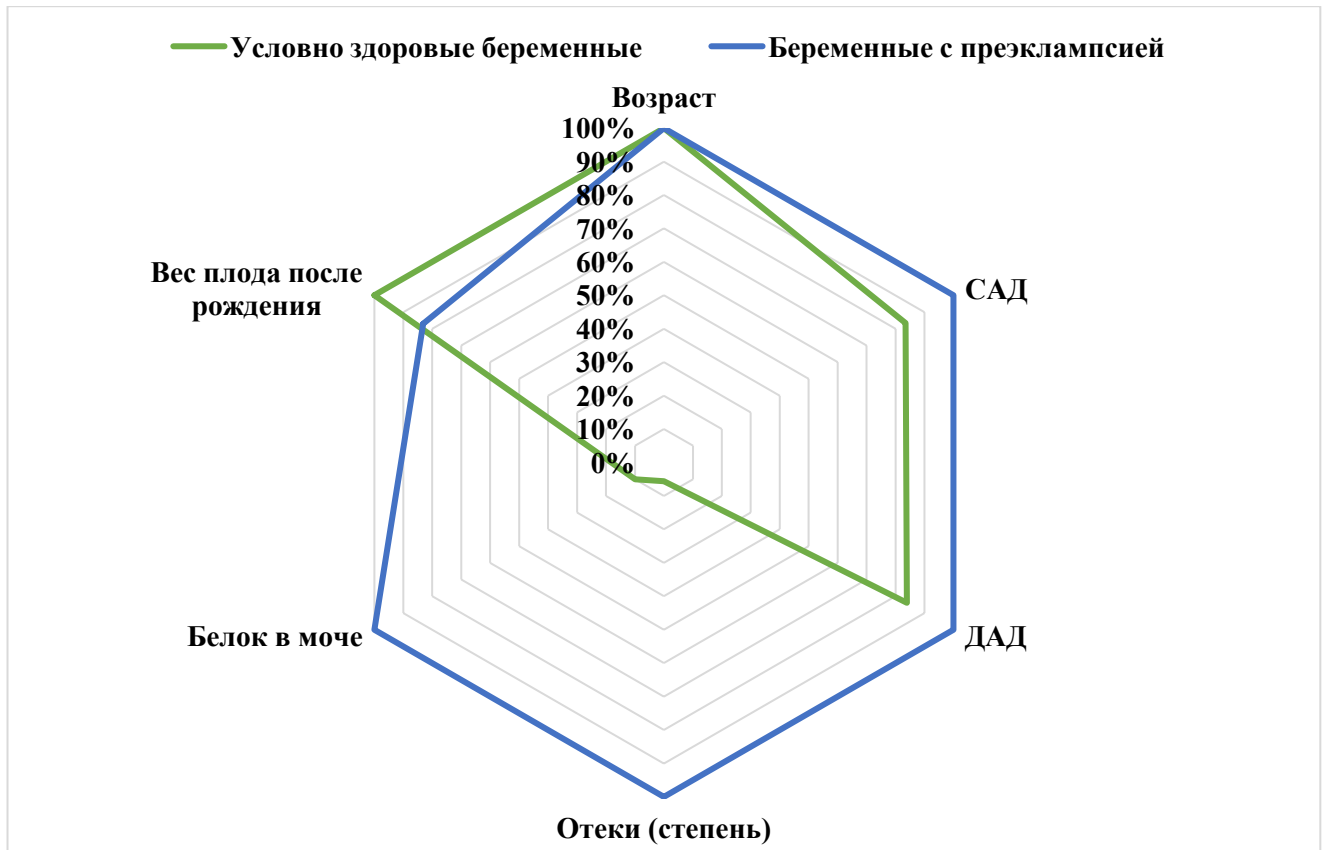
*Примечание:* Клеточную ДНК выделяли из клеток крови, вкДНК выделяли из образцов плазмы беременных, вк мтДНК – митохондриальная ДНК в составе вкДНК; мтДНК – митохондриальная ДНК в составе клеточной ДНК

**Рисунок 12** – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с различными сроками гестации у здоровых беременных

Частотный анализ показал, что вкДНК в группе здоровых беременных в 78,3% наблюдений не превышала 250 нг/мл, а ДНКза-1 – 7,1 ед./мл. Количество повторов мтДНК в составе вкДНК не превышало 250 копий в 87%, клет. мтДНК в 74%, а отношение вк мтДНК / клет. мтДНК не превышало 1 в 13% и свидетельствовало о физиологическом состоянии пациенток.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у небеременных концентрация вкДНК варьировала от 11 до 123 нг/мл (медиана 76 нг/мл). При нормальной беременности концентрация вкДНК колеблется (за исключением 1 наблюдения в 503 нг/мл) от 2 до 347 нг/мл (медиана 78 нг/мл) и свидетельствовала о невысоком уровне апоптоза. Физиологический уровень вкДНК у беременных составлял от 2 до 350 нг/мл. Согласно критерию Манна – Уитни концентрация вкДНК здоровых небеременных и беременных достоверно не отличаются между собой ( $p > 0,05$ ). Физиологический уровень (более 70% наблюдений) активности ДНКзы-1 не превышает 7,1 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК не превышает 250 копий.

В соответствии с целью и задачами исследования среди обследованных пациенток ретроспективно были отобраны беременные с ПЭ. Для исключения случайного характера появления общеизвестных признаков ПЭ у современных больных при развитии болезни была проведена статистическая обработка клинических признаков с использованием непараметрического критерия U Манна – Уитни.



*Примечание:* САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление

**Рисунок 13** – Характеристика обследованных беременных

Как видно из приведенных данных на Рисунке 13, клинические показатели пациенток с преэклампсией существенно отличались от параметров в группе пациенток с нормально протекающей беременностью. Так, пациентки с преэклампсией демонстрировали повышенные показатели САД и ДАД, высокий уровень белка в моче, а также наличие выраженных отеков. Приблизительно у половины пациенток с преэклампсией срок гестации не превышал 35 недель.

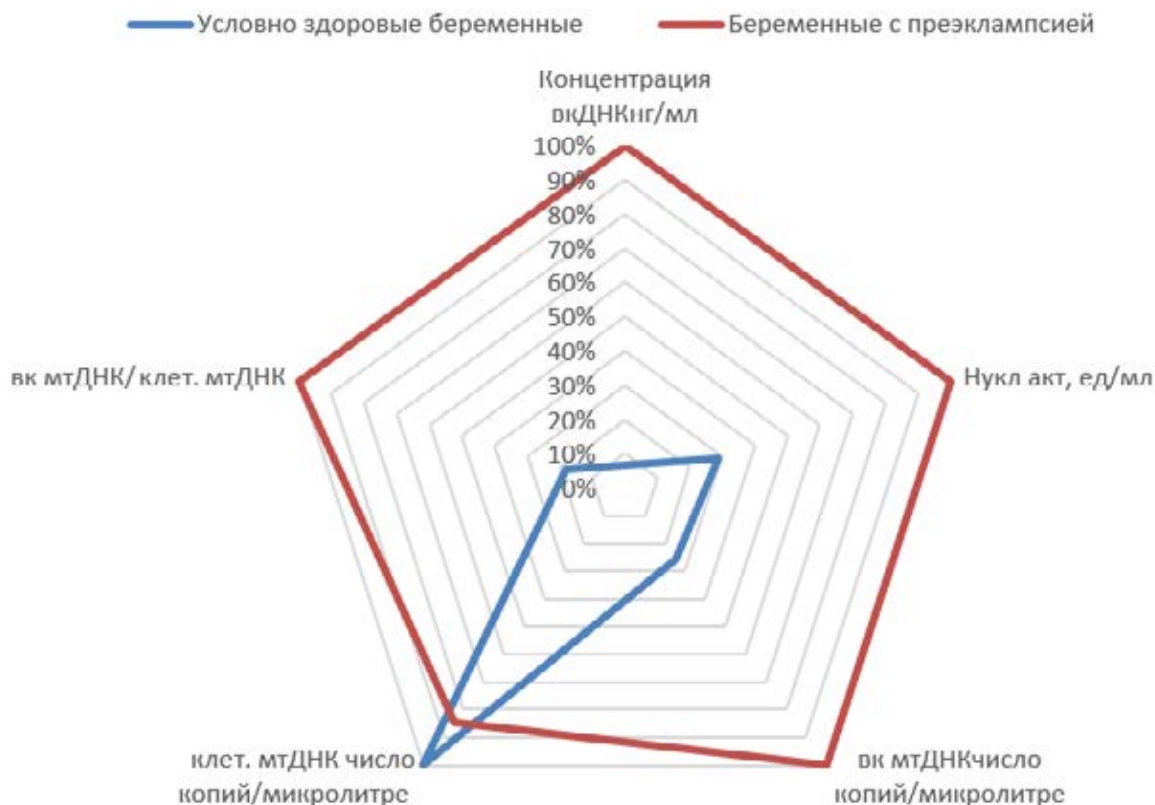
На Рисунке 14 представлены результаты исследования корреляционной связи между клиническими параметрами всех беременных, свидетельствующие о наличии преэклампсии у части пациенток и хорошей зависимости между различными признаками болезни, исключая случайные появления. Как видно из приведенных данных, была обнаружена выраженная статистически значимая прямая корреляционная связь между показателями САД и ДАД, степенью отеков, концентрацией белка в моче и степенью ЗРП. Обращает на себя внимание наличие обратной корреляционной связи между сроком гестации и показателями САД, степенью отеков и концентрации белка в моче.

	<i>САД</i>	<i>ДАД</i>	<i>Отеки степень</i>	<i>Белок в моче</i>	<i>Вес плода</i>	<i>Ст. гипотр.</i>	<i>Срок гестации</i>
САД		0,75	0,79	0,66	-0,3	0,33	-0,41
ДАД	0,75		0,61	0,5	-0,27	0,3	0,26
Отеки степень	0,79	0,61		0,72	-0,4	0,44	-0,5
Белок в моче	0,66	0,5	0,72		-0,45	0,59	0,36
Вес плода	-0,3	-0,27	-0,4	-0,45		-0,79	0,68
Ст. гипотр.	0,33	0,3	0,44	0,59	-0,79		0,45
Срок гестации	-0,41	0,26	-0,5	-0,36	0,68	-0,45	

**Рисунок 14** – Корреляционный анализ клинических параметров (все обследованные беременные)

Результаты исследования характеристик внеклеточной и клеточной ДНК у пациенток с нормально протекающей беременностью и пациенток с преэклампсией выявили специфические изменения вкДНК, которые представлены на Рисунке 16.

У пациенток с преэклампсией независимо от срока гестации было выявлено повышенное содержание мтДНК в составе вкДНК. Аналогичные данные были получены для интегративных показателей «вк мтДНК / клет. мтДНК», значения медиан которых у пациенток с преэклампсией были существенно выше, чем в группе здоровых беременных.



*Примечание:* Клеточную ДНК выделяли из клеток крови, вкДНК выделяли из образцов плазмы беременных; вкДНК – внеклеточная ДНК; вк мтДНК – митохондриальная ДНК в составе вкДНК; мтДНК – митохондриальная ДНК в составе клеточной ДНК

**Рисунок 15** – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с преэклампсией и у здоровых беременных

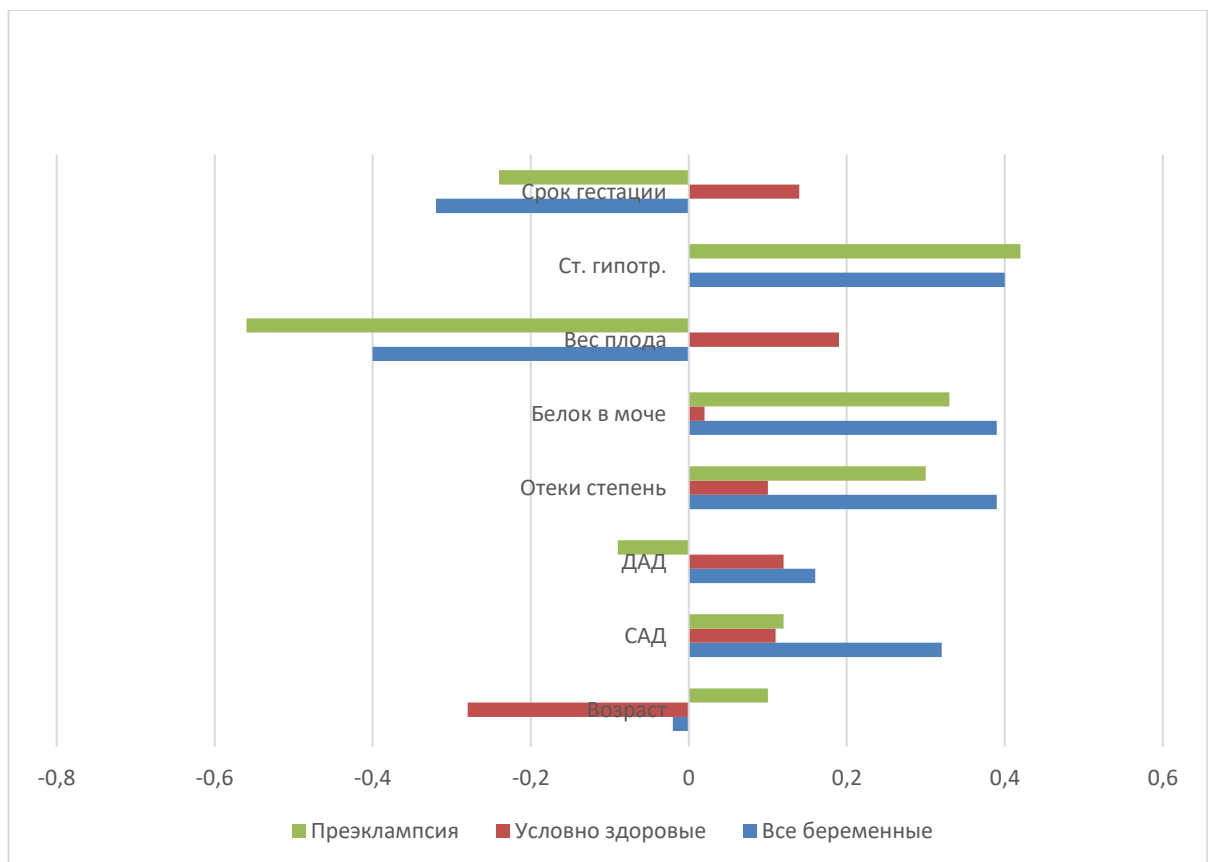
Исследование количества митохондриальных повторов в составе клеточной ДНК (выделена из клеток крови – лейкоцитов) не выявило статистически значимых различий между группой пациенток с преэклампсией и группой с нормально протекающей беременностью. В группе пациенток с преэклампсией были также зарегистрированы значительные изменения концентрации и состава вкДНК по сравнению с группой здоровых. У пациенток с преэклампсией концентрация вкДНК варьировала от 67,0 до 11579,3 нг/мл (медиана 589,3 нг/мл;  $p = 0,001$ ). В соответствии с повышением общего уровня вкДНК в кровотоке, у пациенток с преэклампсией было обнаружено статистически значимое повышение активности ДНКазы I в образцах плазмы. При условно физиологической беременности (здоровые беременные) активность ДНКазы I



варьировала от 0,8 до 14,8 ед./мл (медиана 4 ед./мл), а при беременности, осложненной преэклампсией – от 3,7 до 52,4 ед./мл (медиана 12,6 ед./мл;  $p = 0,0301$ ).

Кроме того, у пациенток с преэклампсией было выявлено повышенное содержание мтДНК повторов в составе вкДНК. Так, значения медиан количества повторов мтДНК в группе с преэклампсией составили, соответственно, 394,0 у.е. против 96,7 у.е. в группе здоровых (оба  $p < 0,0001$ ). Аналогичные данные были получены для интегративных показателей «вк мтДНК /клет. мтДНК», значения медиан которых у пациенток с преэклампсией составляли, соответственно, 2,41 против 0,38 в группе пациенток с не осложненной беременностью (оба  $p < 0,0001$ ) и свидетельствовали, по крайней мере, о повреждении нейтрофильных лейкоцитов.

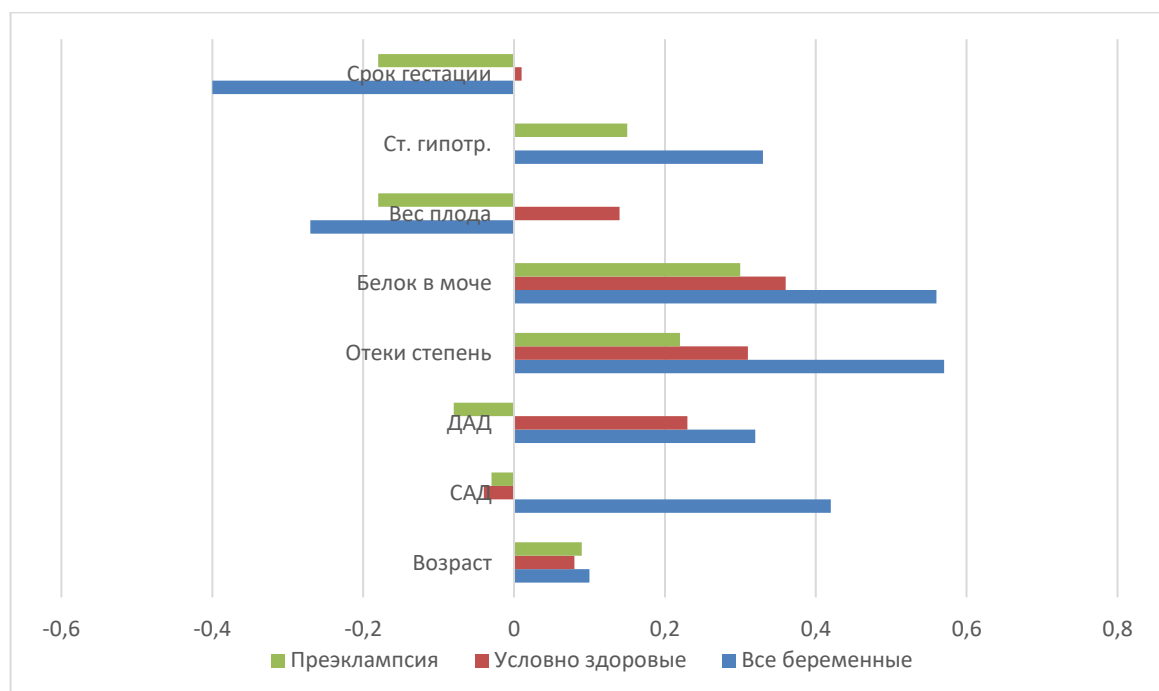
На Рисунках 16–18 представлены результаты исследования корреляционной зависимости между характеристиками вкДНК и клиническими параметрами.



**Рисунок 16–** Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и концентрацией вкДНК

Как видно из данных, приведенных на Рисунке 16, в группе пациенток с преэклампсией была выявлена умеренно выраженная, но статистически значимая, положительная корреляционная связь между концентрацией вкДНК и уровнем белка в моче ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,023$ ), степенью отеков ( $R = 0,30$ ;  $p = 0,034$ ) и ЗРП ( $R = 0,42$ ;  $p = 0,002$ ). Кроме того, у пациенток с преэклампсией была обнаружена выраженная отрицательная корреляция между концентрацией вкДНК и весом плода ( $R = -0,56$ ;  $p = 0,003$ ).

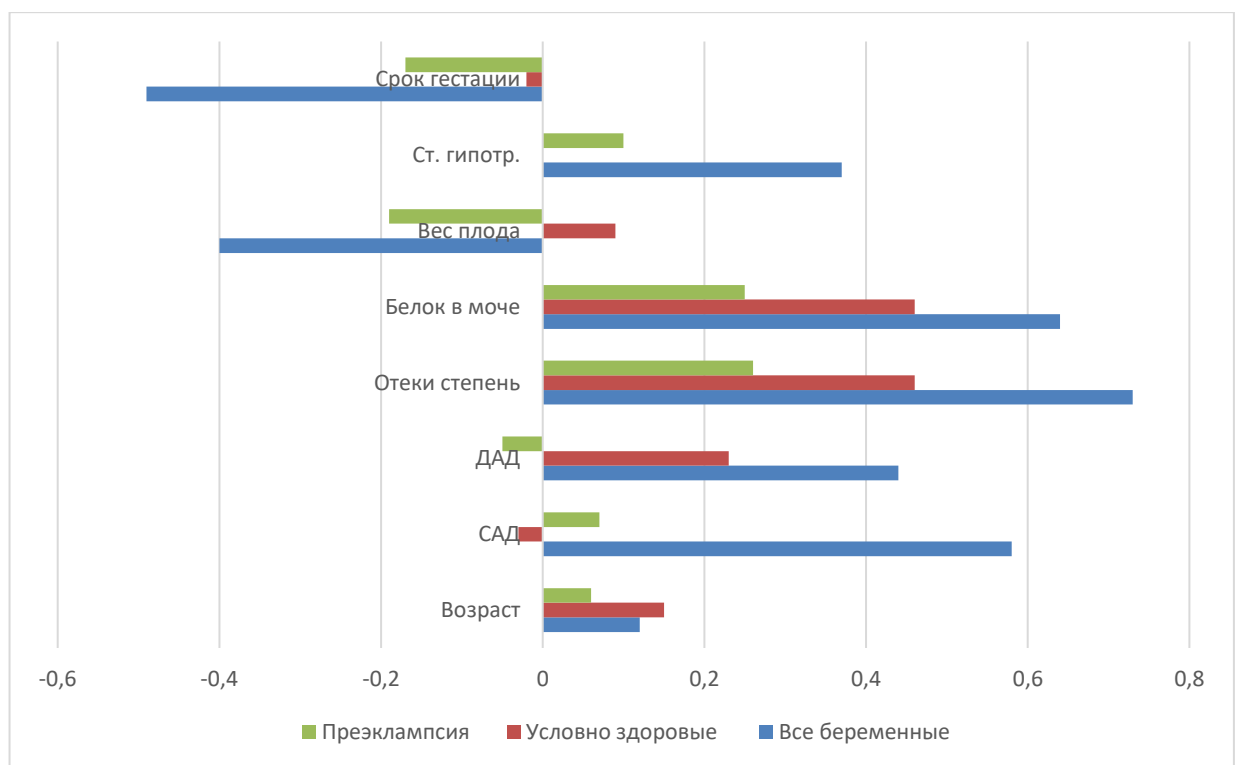
Как видно из данных, приведенных на Рисунке 17, в общей группе беременных пациенток с осложненной и не осложненной беременностью была выявлена статистически значимая, положительная корреляционная связь между содержанием вк мтДНК в плазме и показателями САД и ДАД, степенью отеков, уровнем белка в моче, ЗРП. Кроме того, в группе из всех обследованных была обнаружена отрицательная корреляционная связь между содержанием вк мтДНК в плазме и весом плода, а также между содержанием вк мтДНК в плазме и сроком гестации. Статистически значимая корреляционная связь между уровнем вк мтДНК в плазме и концентрацией белка в моче была выявлена в группе пациенток с преэклампсией.



**Рисунок 17**– Корреляция Спирмена между клиническими показателями и содержанием мтДНК в образцах вкДНК

У беременных с нормально протекающей беременностью содержание вк мтДНК в плазме и клинические параметры слабо коррелировали между собой.

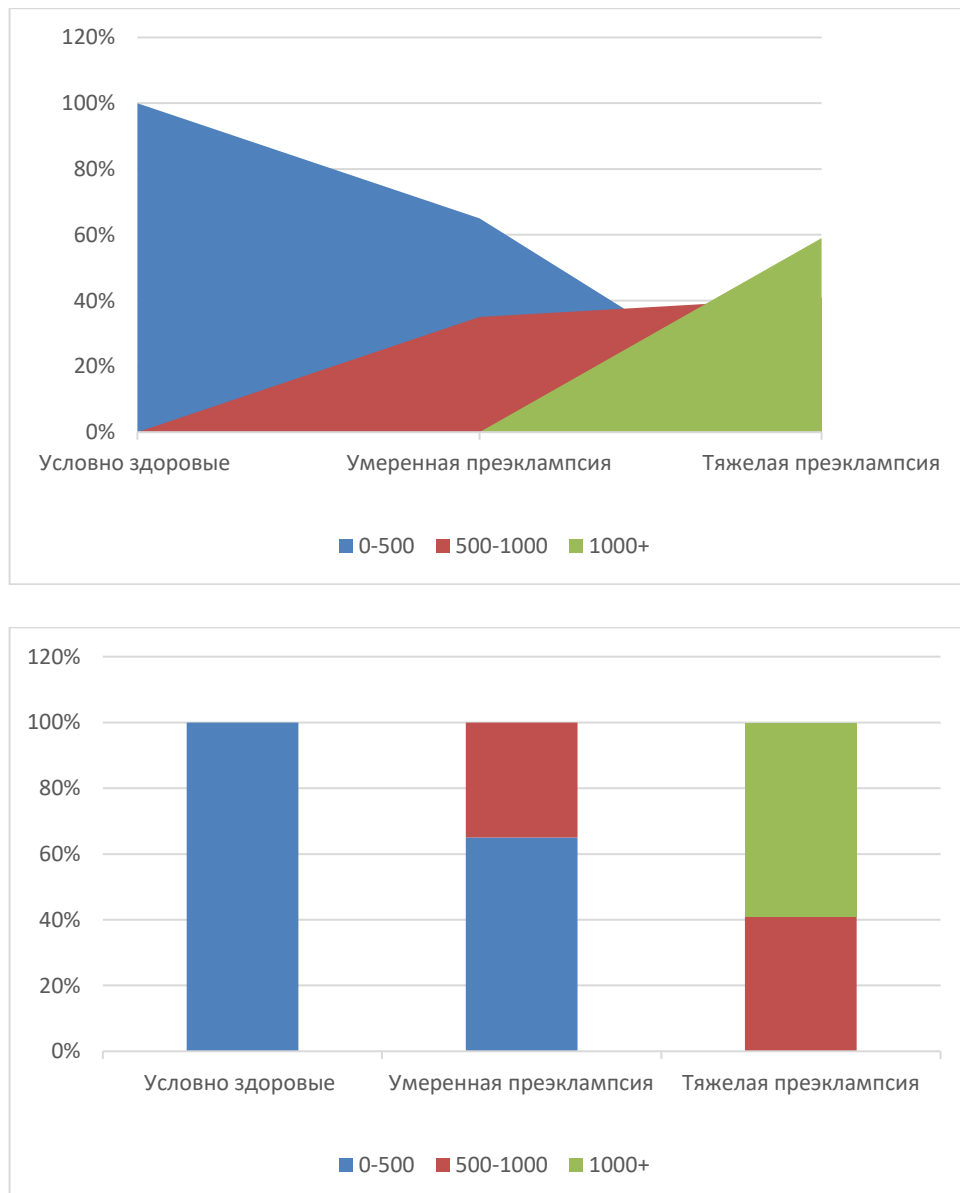
У всех в общей массе беременных была также выявлена выраженная статистически значимая положительная корреляционная связь между интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и значениями САД и ДАД, степенью отеков, уровнем белка в моче и степенью ЗРП. Одновременно, статистически значимая отрицательная корреляционная связь (Рисунок 19) была обнаружена между интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и весом плода ( $R = -0,40$ ;  $p = 0.005$ ), а также между показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК» и сроком гестации ( $R = -0,49$ ;  $p < 0,001$ ). У беременных с преэклампсией показатель «вк мтДНК/ клет. мтДНК» и клинические параметры слабо коррелировали между собой.



**Рисунок 18**– Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК»

Полученные результаты показывают, что при преэклампсии, сопровождающейся повышением артериального давления, отеками происходит повышение концентрации вкДНК и изменение ее характеристик, в частности

повышается количество митохондриальных копий в составе вкДНК и существенно возрастают значения интегративных показателей «вк мтДНК/ клет. мтДНК», что свидетельствует о повреждении митохондрий и выходе продуктов их деградации в периферическое русло. Концентрация вкДНК, содержание митохондриальных фрагментов в ее составе, а также интегральный показатель высоко коррелировали с клиническими параметрами, характеризующими состояние плода и матери.



**Рисунок 19** – Результаты частотного анализа исследуемых показателей по группам наблюдений (концентрация вкДНК, нг/мл)

Проведенный частотный анализ (Рисунок 19) выявил значительные колебания изучаемых показателей, однако в большинстве наблюдениях у беременных с преэклампсией они отличались от небеременных и здоровых.

При индивидуальном анализе наших наблюдений у беременных с преэклампсией клиническая картина заболевания не всегда совпадала с результатами исследования вкДНК. Так, при умеренной ПЭ и почти физиологических колебаниях вкДНК (от 67 до 500 нг/мл) САД и ДАД превышали нормативные показатели у 14 из 22, уровень белка в моче у 13 из 22, отеки у 16 из 22, задержка роста плода зарегистрирована у 4 из 22 беременных. При колебаниях вкДНК от 500 до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры у 6 из 13, белок в моче у 6 из 13, умеренные отеки наблюдались у 6 из 13, головная боль – у 5 из 13, ЗРП у 2 из 13 пациентов.

При тяжелой преэклампсии у 9 из 22 беременных концентрация вкДНК была от 589 до 1000 нг/мл, у остальных 13 превышала эту величину. У пациенток, имеющих в крови концентрацию вкДНК до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры в 4 из 9, белок в моче – в 6 из 9, выраженные отеки – в 8 из 9, головная боль – в 3 из 9, ЗРП в 1 из 9 наблюдений. При концентрациях вкДНК в крови беременных выше 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические показатели в 10 из 13, белок в моче – в 10 из 13, выраженные отеки в 11 из 13, головная боль – в 6 из 13, ЗРП – в 6 из 13 наблюдений.

Полученные результаты вкДНК и клинические характеристики пациентов свидетельствуют либо о гипердиагностике преэклампсии, либо о неизвестных еще компенсаторных возможностях у части наших беременных.

В современной медицине хорошим тестом (маркером) является таковой, когда при сравнении 2 групп он не встречается в группе сравнения примерно в 70%. В наших исследованиях практически по всем параметрам таких наблюдений было большинство при сравнении с группой здоровых и беременных с умеренной преэклампсией и при сравнении пациенток с умеренной и тяжелой преэклампсией.

Следует отметить, что у пациенток в 23% при умеренной и в 36% при тяжелой преэклампсии новорожденные родились с ЗРП различной степени тяжести. Тяжесть ЗРП при умеренной форме ПЭ в 4 наблюдениях составила 1-я ст., в 3 – 2-я ст., в 1 – 3-я ст. При тяжелой форме ПЭ наблюдалось более выраженное внутриутробное страдание плодов: 1-я ст. ЗРП зарегистрирована у 2, 2-я ст. – у 5, 3-я ст. – у 1 из родильниц. При этом в крови пациенток с умеренной ПЭ в 4 из 8 наблюдений концентрация вкДНК колебалась от 611 до 946 нг/мл, нуклеазная активность от 11,1 до 21,6 ед./мл, а количество повторов мтДНК в составе вкДНК уже в 5 из 8 наблюдений превышало физиологическое значение и колебалось 370 до 1169. При тяжелой ПЭ в крови этих беременных вкДНК превышала 1000 нг/мл, нуклеазная активность колебалась в 6 наблюдениях от 9,5 до 19,9 ед./мл, а количество копий мтДНК в составе вкДНК уже в 7 из 8 наблюдений превышало физиологические значения, колеблясь 257 до 1342 копий. Клеточная мтДНК в составе вкДНК при этом существенно не менялась. Следовательно, изменения, обнаруженные нами при исследовании вкДНК ее состав и нуклеазная активность, в большей мере были связаны тяжестью ПЭ, чем выраженностью ЗРП.

Индивидуальный анализ тяжелых форм преэклампсии показал, что при критических формах происходили самые выраженные изменения вкДНК и ее характеристик. Так, в группе беременных с преэклампсией тяжелой степени (критическая форма) заболевания была выявлена в 6 наблюдениях. У этих беременных в крови выявлена концентрация вкДНК от 1595 до 11579 нг/мл, нуклеазная активность от 9,5 до 28,9 ед./мл, вк мтДНК от 257 до 938 повторов, клет. мтДНК от 212 до 348 повторов, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК от 2,83 до 4,64. Сравнение полученных результатов вкДНК с данными беременных при критической форме преэклампсии в 5 из 6 наблюдений не выявило перекреста данных вкДНК и ее характеристик с таковыми у беременных с преэклампсией умеренной и тяжелой формы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при тяжелой преэклампсии выявляются концентрация вк ДНК выше 1000 нг/мл, нуклеазная

активность выше 10 ед./мл, вк мтДНК более 250 повторов, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК более 1,64.

Исследования, проведенные при осложненной беременности и ЗРП плода (1-я ст. – 1, 2-я ст. – 2, 3-я ст. – 3 подгруппы), не связанной с преэклампсией показали, что наиболее значительные изменения функционального состояния плода были зарегистрированы у пациенток при ЗРП II и III степени. У пациенток с ЗРП II степени были выявлены нарушения маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока. При ЗРП III степени регистрировались нарушения плодово-плацентарного кровотока – нулевой или реверсивный диастолический кровотоки в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока. У пациенток с ЗРП II и III степени было зарегистрировано снижение функционального состояния плода – оценки по шкале Фишера ниже 7 баллов и нулевой или реверсивный диастолический кровотоки в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока. Можно отметить, что во 2-й и в 3-й подгруппах при ЗРП у 9 беременных (22,5%) концентрации вкДНК превышали верхнюю границу для небеременных пациенток (123 нг/мл). Обращает на себя внимание факт значительного разброса данных у беременных, особенно в подгруппе ЗРП – 3, по сравнению с небеременными. Коэффициенты вариации изменялись в ряду  $0,42$  (группа 1)  $< 0,87$  (подгруппа 2)  $< 1,37$  (подгруппа 3). У пациенток подгрупп 2 и 3 по сравнению с группой 1 выявляются подгруппы с более низкими и более высокими значениями концентрации вкДНК. В 3-й группе ЗРП концентрации вкДНК несколько снижены по сравнению со 2-й группой. Если отбросить выпадающее максимальное значение концентрации вкДНК для одного образца подгруппы 3 (596 нг/мл), в котором новорожденный родился еще и в состоянии острой гипоксии, то наблюдается достоверное снижение концентрации вкДНК

в 3-й группе по сравнению со 2-й группой ( $p < 0,05$ ,  $N_2 = 40$ ,  $N_3 = 39$ ). В подгруппах группы 3, сформированных по значениям степени ЗРП плода, концентрации вкДНК также изменялись в широких пределах. Значения медиан концентраций вкДНК в данных подгруппах уменьшались в ряду: 3-3 (143 нг/мл)  $>$

3-2 (76 нг/мл) > 3-1 (38 нг/мл) > 3-0 (16 нг/мл). Однако различия между подгруппами были недостоверны ( $p > 0,05$ ) вследствие малочисленности выборок и большого разброса значений. Одновременно можно отметить, что чем выше степень ЗРП в подгруппе, тем больше в ней частота образцов с высокими значениями концентрации, превышающими верхнюю границу для небеременных: 3-0 (0%), 3-1 (16%), 3-2 (17%) и 3-3 (45%).

Таким образом, мы не зафиксировали ожидаемого увеличения концентрации вкДНК в крови беременных по сравнению с небеременными. Более того, при патологии, когда ожидали значительного повышения концентрации вкДНК, мы определили, напротив, снижение концентрации вкДНК по сравнению с нормально протекающей беременностью.

Основной причиной снижения концентрации вкДНК может быть повышение активности компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из факторов, влияющих на элиминацию вкДНК, является активность фермента, отвечающего за гидролиз вкДНК – ДНКазы 1 плазмы крови.

Плазма крови беременных, у которых диагностировали ЗРП, характеризовалась высокими значениями активности ДНКазы 1, по сравнению с плазмой крови пациенток с нормально протекающей беременностью и по сравнению с плазмой небеременных. У 19 из 40 (47,5%) беременных группы 3 тестировали высокие значения активности ДНКазы 1, которые не встречались в выборке небеременных пациенток. В группе 2 повышенные значения активности ДНКазы 1 встречались только у 4 (10%) беременных.

При одних и тех же изменениях активности ДНКазы 1 плазмы крови обнаружено уменьшение концентрации вкДНК гораздо более выраженное в группе 3 (ЗРП). Мы ввели показатель, отражающий количество вкДНК, приходящееся на единицу активности ДНКазы 1: вкДНК/ДНКазы 1. Согласно критерию Манна – Уитни подгрупп 1 и 2 по этому показателю не отличаются достоверно между собой ( $p > 0,05$ ). Однако подгруппа 3 с высокой вероятностью отличается от подгруппы 1 ( $p < 0,001$ ) и подгруппы 2 при ЗРП ( $p < 0,001$ ).

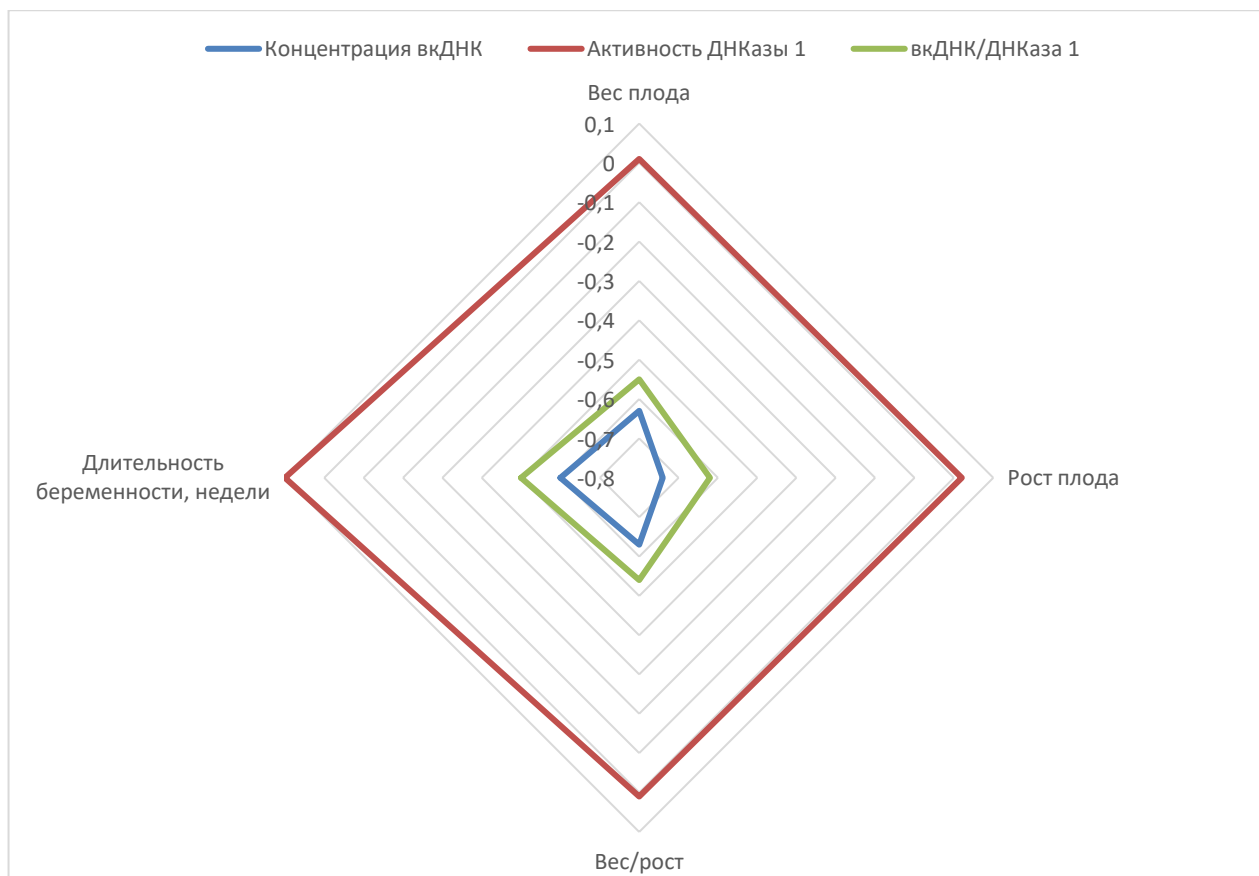


ЗРП может быть охарактеризована такими объективными параметрами, как вес и рост плода и отношение двух величин. Мы проанализировали зависимость этих показателей, а также длительность беременности, от концентрации вкДНК, активности ДНКазы 1 и показателя вкДНК/ДНКазы 1 методом линейной регрессии (Рисунок 20).

Концентрация вкДНК и показатель вкДНК/ДНКазы 1 отрицательно коррелировали со всеми показателями состояния плода: чем выше были концентрации вкДНК в крови матери и показатель вкДНК/ДНКазы 1, тем меньше был срок беременности, рост и вес плода.

Частотный анализ наших наблюдений показал, что у подавляющего числа беременных при ЗРП 2-й и 3-й степеней в крови матерей регистрируется снижение концентрации вкДНК меньше 100 (нг/мл) и увеличение активности ДНКазы I более 7,5 (ед/мл)

При беременности, осложненной ЗРП, мы впервые обнаружили достоверное увеличение активности ДНКазы 1 плазмы, что говорит об увеличении интенсивности процессов гибели клеток в организме беременной. Интересно отметить, что для части образцов плазмы групп 2 и 3 (подгруппы 2б и 3б) мы наблюдали аномально высокое снижение уровня вкДНК по сравнению с группой 1 на фоне относительно невысоких значений активности ДНКазы 1. В этих подгруппах концентрация вкДНК не зависит от активности ДНКазы 1. В других образцах беременных (подгруппы 2а и 3а) снижение концентрации вкДНК при увеличении активности ДНКазы 1 также было гораздо более высоким, чем в группе 1, хотя и наблюдалась корреляция между концентрацией вкДНК и активностью ДНКазы 1.



**Рисунок 20**– Анализ зависимости показателей развития плода и длительности беременности от концентрации вкДНК, активности ДНКазы 1 и показателя вкДНК/ДНКазы 1 методом линейной регрессии для группы 3 (ЗРП)

Эти показатели дают информацию об уровне гибели клеток и об эффективности работы системы элиминации, которая включает ДНКазу 1 и другие значимые при беременности компоненты. Например, если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы 1 на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при увеличенной активности ДНКазы 1 говорят о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма. При этом данные ультразвукового исследования могут зафиксировать ЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время для накопления признаков ЗРП, тестируемых ультразвуком.

Таким образом при ЗРП 2-й и 3-й степеней в крови матерей регистрируется снижение концентрации вкДНК меньше 100 (нг/мл) и увеличение активности ДНКазы I более 7,5 (U/мл).

## ВЫВОДЫ

1. При нормальной беременности во втором и третьем триместре регистрируются: концентрация вкДНК менее 347 нг/мл, активность ДНКзы-1 менее 7,1 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК менее 250 копий, свидетельствуют о удовлетворительном состоянии матери и плода.

2. В отличие от неосложненной беременности у женщин с преэклампсией и ЗРП вкДНК и ее характеристики коррелируют с САД, ДАД, наличием отеков, белком в моче, весом плода, степенью ЗРП, параметрами ультразвукового и доплерометрического исследования.

3. При средне тяжелой преэклампсии более, чем у 60% пациенток наблюдается гибель материнских и плодовых клеток: уровень вкДНК превышает 347 нг/мл, активность ДНКзы-1 - 7,1 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК - 250 копий. Тяжелая степень преэклампсии характеризуется прогрессивным увеличением гибели клеток: уровень вкДНК превышает в большинстве (более 60%) наблюдений 1000 нг/мл, активность ДНКзы-1 (более 83%) наблюдений - 7,1 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК (более 77%) - 250 копий.

4. При критической форме тяжелой преэклампсии (у 100 % пациенток) наблюдаются: концентрация вкДНК выше 1000 нг/мл, активность ДНКзы-1 - 10 ед./мл, количество повторов мтДНК в составе вкДНК - 250 копий.

5. Для выраженной ЗРП, не связанной с преэклампсией, характерно снижение концентрации вкДНК меньше 100 нг/мл и увеличение активности ДНКазы 1 более 7,5 U/мл.

6. Существенное изменение от нормы концентрации вкДНК и активности ДНКазы-1 в 3 триместре беременности при преэклампсии и выраженной ЗРП свидетельствует о нарушении роста и гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при увеличенной активности ДНКазы-1 свидетельствуют о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма и могут служить диагностическим тестом при плацентоассоциированных состояниях.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве дополнительных критериев диагностики приэклампсии и ЗРП и их степени тяжести целесообразно исследование концентрации вкДНК и ее характеристик, которые свидетельствуют о гибели клеток.

2. Для тяжелой преэклампсии характерны: концентрация вк ДНК выше 1000 нг/мл, увеличение активности ДНКазы I выше 10 ед./мл, вк мтДНК более 250 копий, отношение вк мтДНК / клет. мтДНК более 1,64.

3. Для ЗРП 2-й и 3-й степеней тяжести, не связанной с преэклампсией, характерны: концентрации вкДНК меньше 100 (нг/мл) и увеличение активности ДНКазы I более 7,5 у. ед.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ПЭ – преэклампсия

ПН – плацентарная недостаточность

ЗРП – задержка роста плода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

клетДНК – клеточная ДНК

вкДНК – внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная ДНК

генДНК – геномная ДНК

ДНКаза 1 – дезоксирибонуклеаза 1

ДАД – диастолическое артериальное давление

САД – систолическое артериальное давление

ХАГ – хроническая артериальная гипертензия

ФПН – фетоплацентарная недостаточность

РДС – респираторный дистресс синдром

КТГ – кардиотокография

УЗИ – ультразвуковое исследование

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Литература на русском языке

1. Баев, О. Р. Роль внеклеточной ДНК плода в прогнозировании больших акушерских синдромов / О. Р. Баев, А. О. Карапетян [и др.] // Акуш. и гинек. – 2018. – № 4. – С. 10–15.
2. Башмакова, Н. В. Ангиогенные ростовые факторы и патогенез преэклампсии / Н. В. Башмакова, П. Б. Цывьян, Г. Н. Чистякова [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2017. – № 17 (5). – С. 7–12.
3. Вейко, Н. Н. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК – маркер гибели клеток организма / Н. Н. Вейко, Н. В. Булычева, О. А. Рогинко [и др.] // Биомед. химия. – 2008. – № 54. – С. 78–92.
4. Ефремова, Л. В. Внеклеточная ДНК влияет на количество NO в эндотелиальных клетках человека / Л. В. Ефремова, А. Ю. Алексеева, М. С. Конькова [и др.] // БЭБиМ. – 2010. – Т. 149, № 9. – С. 156–162.
5. Конорова, И. Л. Гемодинамическая роль циркулирующей в плазме крови внеклеточной ДНК и содержащейся в ее составе высокомолекулярной СРГ-богатой фракции в патогенезе артериальной гипертензии и облитерирующего атеросклероза сонных артерий / И. Л. Конорова, Н. Н. Вейко, Е. С. Ершова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – № 15 (2). – С. 19–28.
6. Логутова, Л. С. Циркуляция внеклеточной плодной дезоксирибонуклеиновой кислоты в плазме крови беременных и формирование у них клинко-патогенетических особенностей артериальной гипертензии / Л. С. Логутова, О. В. Радьков, М. Н. Калинин // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – № 2. – С. 18–21.
7. Савельева, Г. М. Какой классификации гестозов (преэклампсии) должен придерживаться врач в повседневной работе? / Г. М. Савельева, В. И. Краснопольский, А. Н. Стрижаков [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Том 62, № 1. – С. 5–9.

8. Савельева, Г. М. Эклампсия в современном акушерстве / Г. М. Савельева. Р. И. Шалина, М. А. Курцер [и др.] // Акуш. и гинек. – 2010. – № 6. – С. 4–10.

9. Стрижаков, А. Н., Мирющенко М. М., Игнатко И. В. Прогнозирование синдрома задержки роста плода у беременных высокого риска Ж. Акушерство и гинекология. –2017. – № 7. – С. 34–44.

10. Сухих, Г. Т. Преэклампсия / Г. Т. Сухих, Л. Е. Мурашко, Л. В. Ванько. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 566 с. – (Библиотека врача-специалиста. Акушерство. Гинекология.). – ISBN 978-5-9704-1409-5.

11. Сухих, Г. Т. Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия / Г. Т. Сухих, В. Н. Серов, Л. В. Адамян [и др.] // Проблемы репродукции. – 2018. – Т. 24, № 6. – С. 80–114.

12. Черепанова, А. В. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии / А. В. Черепанова, С. Н. Тамкович, В. В. Власов // Биомедицинская химия. – 2007. – № 53. – С. 488–496.

#### **Литература на иностранном языке**

13. Abalos, E. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review / E. Abalos, C. Cuesta, A. L. Grosso [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2013 Sep. – N 170 (1). – P. 1–7.

14. Abou-Nassar, K. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and meta-analysis / K. Abou-Nassar, M. Carrier, T. Ramsay [et al.] // Thromb. Res. – 2011. – N 128 (1). – P. 77–85.

15. Achkar, M. Vitamin D status in early pregnancy and risk of preeclampsia / M. Achkar, L. Dodds, Y. Giguere [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2014. – N 212 (4). – P. 511e–517.

16. Adane, A. Adverse birth outcomes among deliveries at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia / A. Adane, T. Ayele, L. Ararsa [et al.] // BMC Pregnancy Childbirth. – 2014. – N 14 (1). – P. 90.

17. Aitken, L. M. Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis A phase I study / L. M. Aitken, W. Burke, G. McDonald [et al.] // *J. Am. Med. Assoc.* – 1992. – N 67. – P. 1947–1951.

18. Akolekar, R. Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy / R. Akolekar, D. Casagrandi, P. Livanos [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2009. – N 29 (10). – P. 934–938.

19. Al Nakib, M. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction Fetal / M. Al Nakib, R. Desbrière, N. Bonello // *Diagn. Ther.* – 2009. – N 26. – P. 24–28. – DOI: 10.1159/000236355.

20. Alberry, M. S. 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.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2009. – N 200. – P. 98.

21. Aliyu, M. H. Fetal sex and differential survival in preeclampsia and eclampsia. / M. H. Aliyu, H. M. Salihu, O. Lynch [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2012 Feb;285(2):361-5

22. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 111: Inherited thrombophilias pregnancy // *Obstet. Gynecol.* – 2010. – N 115 (4). – P. 877.

23. Ananth, C. V. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980–2010: age-period-cohort analysis / C.V. Ananth, K. M. Keyes, R. J. Wapner // *BMJ.* – 2013. – N 347. – P. f6564.

24. Andersgaard, A. B. Recurrence and long-term maternal health risks of hypertensive disorders of pregnancy: a population-based study / A. B. Andersgaard, G. Acharya, E. B. Mathiesen [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2012. – N 206 (2). – P. 43.e1–143.e8.

25. Aune, D. Physical activity and the risk of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis / D. Aune, O. Saugstad, T. Henriksen [et al.] // *Epidemiology.* – 2014. – N 25 (3). – P. 331–343.



26. Backes, C. H. Maternal preeclampsia and neonatal outcomes / C. H. Backes, K. Markham, P. Moorehead [et al.] // *J. Pregnancy*. – 2011. – N 2011. – P. 214–365.
27. Baragou, S. Hypertension and pregnancy in Lome (sub-Saharan Africa): epidemiology, diagnosis and risk factors / S. Baragou, E. Goeh-Akue, M. Pio [et al.] // *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. – 2014. – N 63 (3). – P. 145–150.
28. Bauer, M. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome / M. Bauer, G. Hutterer, M. Eder [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2006. – N 26. – P. 831–836.
29. Bdolah, Y. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? / Y. Bdolah, C. Lam, A., Rajakumar [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. – N 198 (4). – P. 428e1-6
30. Bigelow, C. A. Risk factors for new-onset late postpartum preeclampsia in women without a history of preeclampsia / C. A. Bigelow, G. A. Pereira, A. Warmesley, [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2013. – N 210 (4). – P. 338e1–8.
31. Bilano, V. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis / V. Bilano, E. Ota, T. Ganchimeg [et al.] // *PLOS ONE*. – 2014. – N 9 (3). – P. e91198.
32. Bissenden, J. G. The biochemistry of amniotic fluid with poor fetal growth / J. G. Bissenden, P. H. Scott, S. Milner [et al.] // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1979. – N 86. – P. 540–547.
33. Bodnar, L. M. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia / L. M. Bodnar, J. M. Catov, H. N. Simhan [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – N 92 (9). – P. 3517–3522.
34. Bodnar, L. M. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index / L. M. Bodnar, R. B. Ness, N. Markovic [et al.] // *Ann. Epidemiol.* – 2005. – N 15 (7). – P. 475–482.
35. Bosio, P. M. Plasma P-Selectin is elevated in the first trimester in women who subsequently develop pre-eclampsia / P. M. Bosio, S. Cannon, P. J. McKenna [et al.] // *BJOG*. – 2001. – N 108 (7). – P. 709–715.

36. Braekke, K. Asymmetric dimethylarginine in the maternal and fetal circulation in pre-eclampsia / K. Braekke, P. M. Ueland, N. K. Harsem [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2009. – N 66 (4). – P. 411–415.

37. Bramham, K. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis / K. Bramham, B. Parnell, C. Nelson-Piercy [et al.] // *BMJ.* – 2014 Apr 15. – N 348. – P. g2301.

38. Bretelle, F. Maternal endothelial soluble cell adhesion molecules with isolated small for gestational age fetuses: comparison with pre-eclampsia / F. Bretelle, F. Sabatier, A. Blann [et al.] // *BJOG.* – 2001. – N 108. – P. 1277–1282.

39. Buamah, P. K. Amniotic fluid alkaline ribonuclease activity: an indicator of fetal growth retardation and anencephaly / P. K. Buamah, P. H. Scott, A. W. Skillen [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1984. – N 143. – P. 157–162.

40. Caramelli, E. Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction – a pilot study / E. Caramelli, N. Rizzo, M. Concu [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2003. – N 23. – P. 367–371.

41. Cartwright, J. E. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders / J. E. Cartwright, R. Fraser, K. Leslie [et al.] // *Reproduction.* – 2010. – N 140 (6). – P. 803–813.

42. Carty, D. M. Novel markers predicting preeclampsia / D. M. Carty, C. Delles, A. F. Dominiczak // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2008. – N 18 (5). – P. 186–194.

43. Carvajal, D. Sensitivity, Specificity, Predictive Values, and Likelihood Ratios / D. Carvajal, P. Rowe // *Pediatr. Rev.* – 2010. – N 31 (12). – P. 511–513.

44. Chan, K. C. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis / K. C. Chan // *Clin. Chem.* – 2006. – N 52. – P. 2211–2218.

45. Cherepanova, A. V. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases / A. V. Cherepanova, S. N. Tamkovich, V. V. Vlasov [et al.] // *Biomed. Khim.* – 2007. – Vol. 53, N 5. – P. 488–496.

46. Cho, G. Prior cesarean section is associated with increased preeclampsia risk in a subsequent pregnancy / G. Cho, L. Kim, K. Min [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2015. – N 15. – P. 24.

47. Christians, J. K. ADAM12 and PAPP-A: candidate regulators of trophoblast invasion and first trimester markers of healthy trophoblasts / J. K. Christians, A. G. Beristain // *Cell Adh. Migr.* – 2016. – N 10 (1-2). – P. 147–153.

48. Cnossen, J. S. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict preeclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis / J. S. Cnossen, R. K. Morris, G. ter Riet [et al.] // *Can. Med. Assoc. J.* – 2008. – N 178 (6). – P. 701–711.

49. Combs, C. A. Early-pregnancy proteinuria in diabetes related to preeclampsia / C. A. Combs, B. Rosenn, J. L. Kitzmiller [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 1993 Nov. – N 82 (5). – P. 802–807.

50. Conde-Agudelo, A. Maternal infection and risk of preeclampsia: systematic review and metaanalysis / A. Conde-Agudelo, J Villar, M. Lindheimer // *Am J. Obstet. Gynecol.* – 2008. – N 198 (1). – P. 7–22.

51. Conde-Agudelo, A. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia / A. Conde-Agudelo, J Villar, M. Lindheimer // *Obstet Gynecol* 2004. – N 104 (6). – P. 1367–1391.

52. Douglas, K. A. Eclampsia in the United Kingdom / K. A. Douglas, C. W. Redman // *BMJ*. – 1994. – N 309. – P. 1395–1400.

53. Duke, R. C. IL-2 addition: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells / R. C. Duke, J. J. Cohen // *Lymphokine Res.* – 1986. – N 5. – P. 289–299.

54. Endeshaw, M. Diet and Pre-eclampsia: A Prospective Multicentre Case-Control Study in Ethiopia / M. Endeshaw, F. Abebe, M. Bedimo [et al.] // *Midwifery*. – 2015. – N 31(6). – P. 617–624.

55. England, L. Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review / L. England, J. Zhang // *Front Biosci.* – 2007. – N 12. – P. 2471–2483.

56. England, L. J. Effects of maternal smokeless tobacco use on selected pregnancy outcomes in Alaska Native women: a case-control study / L. J. England, S. Y. Kim, C. K. Shapiro-Mendoza [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2013. – N 92 (6). – P. 648–655.

57. Farina, A. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy / A. Farina, E. S. Le Shane, G. M. Lambert-Messerlian [et al.] // *Clin. Chem.* – 2003. – N 49. – P. 239–242.

58. Farina, A. Total cell-free DNA (beta-globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening / A. Farina, A. Sekizawa, M. Iwasaki [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2004. – N 24. – P. 722–726.

59. Feig, D. S. Trends in deliveries, prenatal care, and obstetrical complications in women with pregestational diabetes: a population-based study in Ontario, Canada, 1996–2001 / D. S. Feig, A. Razzaq, K. Sykora [et al.] // *Diabetes Care.* – 2006. – N 29 (2). – P. 232–235.

60. Ferrazzi, E. Uterine Doppler velocimetry and placental hypoxicischemic lesion in pregnancies with fetal intrauterine growth restriction / E. Ferrazzi, G. Bulfamante, R. Mezzopane [et al.] // *Placenta.* – 1999. – N 20. – P. 389–394.

61. Fleischhacker, M. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey / M. Fleischhacker // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1775. – P. 181–232.

62. Gallo, D. Prediction of Preeclampsia by Mean Arterial Pressure at 11–13 and 20–24 Weeks' Gestation / D. Gallo, L. Poon, M., Fernandez [et al.] // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2014. – N 36 (1). – P. 28.

63. Gillon, T. E. Hypertensive disorders of pregnancy: a systematic review of international clinical practice guidelines / T. E. Gillon, A. Pels, P. von Dadelszen [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – N 9 (12). – P. e113715.

64. Gillon, T. E. Hypertensive disorders of pregnancy: a systematic review of international clinical practice guidelines / T. E. Gillon, A. Pels, P. von Dadelszen [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – N 9 (12). – P. e113715.

65. Goetzinger, K. R. Efficiency of first-trimester uterine artery Doppler, a-disintegrin and metalloprotease 12, pregnancy-associated plasma protein A and maternal characteristics in the prediction of preeclampsia / K. R. Goetzinger, Y. Zhong, A. G. Cahill [et al.] // *J. Ultrasound Med.* – 2013. – N 32 (9). – P. 1593–1600.

66. Gonzalez-Gonzalez, C. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience / C. Gonzalez-Gonzalez, M. Garcia-Hoyos, M. J. Trujillo-Tiebas [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2005. – N 53. – P. 307–314.

67. Goodwin, A. A. Does maternal race or ethnicity affect the expression of severe preeclampsia? / A. A. Goodwin, B. M. Mercer // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – N 193 (3 Pt 2). – P. 973–978.

68. Goswami, D. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction / D. Goswami, D. S. Tannetta, L. A. Magee [et al.] // *Placenta.* – 2006. – N 27. – P. 56–61.

69. Grill, S. Potential markers of pre-eclampsia – a review / S. Grill, C. Rusterholz, R. Zanetti-Dallenbach [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2009. – N 7. – P. 70–84.

70. Gupta, A. Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? / A. Gupta, P. Hasler, S. Gebhardt [et al.] // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 2006. – N 1075. – P. 118–122.

71. Hahn, S. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation / S. Hahn, C. Rusterholz, I. Hösli // *Placenta.* – 2011. – N 32. – P. 17–20. – DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.018.

72. Hanna, J. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface / J. Hanna, D. Goldman-Wohl, Y. Hamani [et al.] // *Nat. Med.* – 2006. – N 12 (9). – P. 1065–1074.

73. Hayes, D. K. Maternal Asthma, Diabetes and High Blood Pressure are Associated with Low Birth Weight and Increased Hospital Birth and Delivery Charges. – N Hawai'i Hospital Discharge Data 2003–2008 / D. K. Hayes, D. W. Feigal, R. A. Smith, [et al.] // *Hawaii J. Med. Public Health.* – 2014. – N 73 (2). – P. 49–57.

74. Hirose, N. Risk of Preeclampsia in Women with CKD, Dialysis or Kidney Transplantation / N. Hirose, A. Ohkuchi, S. Rie Usui // *Med. J. Obstet. Gynecol.* – 2014. – N 2 (2). – P. 1028.

75. Ito, K. Human urine DNase I: immunological identity with human pancreatic DNase I, and enzymic and proteochemical properties of the enzyme / K. Ito, N. Minamiura, T. Yamamoto // *J. Biochem.* – 1984. – N 95. – P. 1399–1406.

76. Johnson, M. R. Does endothelial cell activation occur with intrauterine growth restriction? / M. R. Johnson, N. Anim-Nyame, P. Johnson [et al.] // *BJOG.* – 2002. – N 109. – P. 836–839.

77. Kasawara, K. Exercise and physical activity in the prevention of pre-eclampsia: systematic review / K. Kasawara, S. do Nascimento, M. Costa [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2012. – N 91 (10). – P. 1147–1157.

78. Kishi, K. Genetic polymorphism of human urine deoxyribonuclease I / K. Kishi, T. Yasuda, S. Awazu [et al.] // *Hum. Genet.* – 1989. – N 81. – P. 295–297.

79. Korzeneva, I. B. Comparative analysis of the formation of  $\gamma$ H2AX foci in human mesenchymal stem cells exposed to 3H-thymidine, tritium oxide, and X-rays irradiation / I. B. Korzeneva, S. V. Kostuyk, L. S. Ershova // *Mutat. Res.* – 2015. – N 779. – P. 1–15.

80. Kristensen, K. Increased cystatin C expression in the pre-eclamptic placenta / K. Kristensen, I. Larsson, S. R. Hansson // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – N 13 (3). – P. 189–195.

81. Kuc, S. Maternal Characteristics, Mean Arterial Pressure and Serum Markers in Early Prediction of Preeclampsia / S. Kuc, Maria P. H. Koster, A. Franx [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – N 8 (5). – P. e635468.

82. Kurki, T. Depression and anxiety in early pregnancy and risk for preeclampsia / T. Kurki, V. Hiilesmaa, R. Raitasalo [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2000. – N 95 (4). – P. 487–490.

83. La Torre, R. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease / R. La Torre, G. Nigro, M. Mazzocco [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2006. – N 43. – P. 994–1000.

84. Laresgoiti-Servitje, E. An immunological insight into the origins of preeclampsia / E. Laresgoiti-Servitje, N. Gomez-Lopez, D. M. Olson // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – N 16 (5). – P. 510–524.

85. Lecarpentier, E. Risk factors of superimposed preeclampsia in women with essential chronic hypertension treated before pregnancy / E. Lecarpentier, V. Tsatsaris, F. Goffinet [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – N 8 (5). – P. e62140.

86. Leslie, K. Early prediction and prevention of preeclampsia / K. Leslie, B. Thilaganathan, A. Papageorghiou // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2011. – N 25 (3). – P. 343–354.

87. Leung, T. N. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia / T. N. Leung, J. Zhang, T. K. Lau [et al.] // *Clin. Chem.* – 2001. – N 47. – P. 137–139.

88. Levine, R. J. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia / R. J. Levine, C. Qian, E. S. Leshane [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – N 190. – P. 707–713.

89. Lisonkova, S. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early-versus late-onset disease / S. Lisonkova, K. S. Joseph // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2013 Dec. – N 209 (6). – P. 544.e1–544.e12.

90. Lo Y. M. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum / Y. M. Lo, N. Corbetta, P. F. Chamberlain [et al.] // *Lancet.* – 1997. – N 350. – P. 485–487.

91. Lo, Y. M. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing *Reprod* / Y. M. Lo // *Biomed. Online.* – 2013. – N 27. – P. 593–598. – DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.008.

92. Lo, Y. M. Genomic Analysis of Fetal Nucleic Acids in Maternal Blood / Y. M. Lo, R. W Chiu // *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* – 2012. – N 13. – P. 285–306. – DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.

93. Lo, Y. M. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia / Y. M. Lo, T. N. Leung, M. S. Tein [et al.] // *Clin. Chem.* – 1999. – N 45. – P. 184–188.

94. Lo, Y. M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis / Y. M. Lo, M. S. Tein, T. K. Lau [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1998. – N 62. – P. 768–775.

95. Love, J. D. The relationship between human serum and human pancreatic DNase I / J. D. Love, R. R. Hewitt // *J. Biol. Chem.* – 1979. – N 254. – P. 12588–12594.

96. Lundqvist-Avall, E. Serum alkaline DNase activity in normal or nonhospitalised individuals / E. Lundqvist-Avall, A. Economidou-Karaoglou, K. Sjoval [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1989. – N 185. – P. 35–44.

97. Magee, L. A. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary / L. A. Magee, A. Pels, M. Helewa [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* – 2014. – N 36 (5). – P. 416–441.

98. Mehrabadi, A. Hypertensive disorders of pregnancy and the recent increase in obstetric acute renal failure in Canada: population based retrospective cohort study / A. Mehrabadi, S. Liu, S. Bartholomew [et al.] // *BMJ.* – 2014. – N 349. – P. g4731.

99. Minassian, C. Acute maternal infection and risk of pre-eclampsia: a population-based case-control study / C. Minassian, S. L. Thomas, D. J. Williams [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – N 8 (9). – P. e73047.

100. Morikawa, M. Seasonal variation in the prevalence of pregnancy-induced hypertension in Japanese women / M. Morikawa, T. Yamada, T. Yamada [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2014. – N 40 (4). – P. 926–931.

101. Mostello, D. Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births / D. Mostello, D. Kallogieri, R. Tungsiripat [et al.] // *Am J. Obstet. Gynecol.* – 2008. – N 199(1). – P. 55.e1–55.e7.

102. Mutter, W. P. Molecular mechanisms of preeclampsia / W. P. Mutter, S. A. Karumanch // *Microvasc. Res.* – 2008. – N 75 (1). – P. 1–8.

103. Myklestad, K. Hypertensive disorders in pregnancy and paternal cardiovascular risk: a population-based study / K. Myklestad, L. Vatten, K. Salvesen [et al.] // *Ann. Epidemiol.* – 2011. – N 21 (6). – P. 407–412.



104. Nadano, D. Measurement of deoxyribo nuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme on pregnant diffusion method / D. Nadano, T. Yasuda, K. Kishi // *Clin. Chem.* – 1993. – N 39. – P. 448–452.
105. Nerenberg, K. A. Risks of gestational diabetes and preeclampsia over the last decade in a cohort of Alberta women / K. A. Nerenberg, J. A. Johnson, B. Leung [et al.] // *J. Obstet Gynaecol. Can.* – 2013 Nov. – N 35 (11). – P. 986–994.
106. Nicolaides K. H. Turning the pyramid of prenatal care. / K. H. Nicolaides // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2011. – N 29. – P. 183–196.
107. Olayemi, O. Influence of duration of sexual cohabitation on the risk of hypertension in nulliparous parturients in Ibadan: A cohort study / O. Olayemi, D. Strobino, C. Aimakhu [et al.] // *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* – 2010. – N 50 (1). – P. 40–44.
108. Olusanya, B. O. Perinatal outcomes associated with maternal hypertensive disorders of pregnancy in a developing country / B. O. Olusanya, O. A. Solanke // *Hypertens. Pregnancy.* – 2011. – N 31 (1). – P. 120–130.
109. Opdahl, S. Risk of hypertensive disorders in pregnancies following assisted reproductive technology: a cohort study from the CoNARTaS group / S. Opdahl, A. Henningsen, A. Tiitinen, [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2015. – N 30 (7). – P. 1724–1731.
110. Opsjon, S. L. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy / S. L. Opsjon, N. C. Wathen, S. Tingulstad [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1993. – N 169. – P. 397–404.
111. Pare, E. Clinical risk factors for preeclampsia in the 21<sup>st</sup> / E. Pare / Published online 2016 Apr 19. – DOI: 10.1136/bmj.i1753 2005.
112. Park, F. J. Clinical evaluation of a first trimester algorithm predicting the risk of hypertensive disease of pregnancy / F. J. Park, C. H. Y., Leung L. C. Y. Poon [et al.] // *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* – 2013. – N 53 (6). – P. 532–539.
113. Payne, B. Assessment, surveillance and prognosis in pre-eclampsia / B. Payne, L. A. Magee, P. von Dadelszen // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2011. – N 25 (4). – P. 449–462.

114. Perni, U. C. Interpregnancy change in smoking habits and risk of preeclampsia: a population-based study / U. C. Perni, A. Wikstrom, S. Cnattingius [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2012. – N 25(3). – P. 372–378.

115. Polsani, S. Emerging new biomarkers of pre-eclampsia / S. Polsani, E. Phipps, B. Jim // *Adv. Chronic. Kidney. Dis.* – 2013. – N 20 (3). – P. 271–279.

116. Poon, L. C. Y. Maternal Plasma Cell-Free Fetal and Maternal DNA at 11–13 Weeks' Gestation: Relation to Fetal and Maternal Characteristics and Pregnancy Outcomes, a Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, and b Department of Fetal Medicine, University College London Hospital, London, UK / L. C. Y. Poon, T. Musci, K. Song [et al.]. – San Jose, Calif., USA : Ariosa Diagnostics, 2013.

117. Poston, L. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial / L. Poston, A. Briley, P. Seed [et al.] // *Lancet.* – 2006. – N 367 (9517). – P. 1145–1154.

118. Reis, F. M. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy / F. M. Reis, D. D'Antona, F. Petraglia // *Endocr. Rev.* – 2002. – N 23 (2). – P. 230–257.

119. Rieger, R. Glossary in Genetics (Classical and Molecular) / R. Rieger, A. Michaelis, M.M. Green, editors. – 5th ed. – New York : Springer-Verlag, 1991. – P. 353–354.

120. Rigo, J. Family history of early-onset cardiovascular disorders is associated with a higher risk of severe preeclampsia / J. Rigo, T. Boze, Z. Derzsy, [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2006. – N 128 (1–2). – P. 148–151.

121. Robillard, P. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception / P. Robillard, T. Hulsey, J. Perianin [et al.] // *Lancet.* – 1994. – N 344 (8928). – P. 973–975.

122. Romero, R. Amniotic fluid interleukin 1 in spontaneous labour at term / R. Romero, S. T. Parvizi, E. Oyarzum [et al.] // *J. Reprod. Med.* – 1990. – N 35. – P. 235–238.

123. Rosenstreich, D. L. A human urine interleukin-1 inhibitor: homology with deoxyribonuclease I / D. L. Rosenstreich, J. H. Tu, P. R. Kinkade // *J. Exp. Med.* 1988. – N 168. – P. 1767–1779.

124. Schneider, H. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro / H. Schneider, S. Hahn // *Clin. Chem.* – 2004. – N 50. – P. 2187–2190.

125. Sebastian, T. Small for gestational age births among South Indian women: temporal trend and risk factors from 1996 to 2010 / T. Sebastian, B. Yadav, L. Jeyaseelan [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2015. – N 15. – P. 7.

126. Seema, S. Fetal specific hyper methylated RASSF1A quantification in pregnancy / S. Seema, K. Sahai, D. Arora [et al.] // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* – 2016. DOI: 10.1080/14767058.2016.1188917,earlyonline 1–5.

127. Sekizawa, A. Betaglobin DNA in maternal plasma as a molecular marker of pre-eclampsia / A. Sekizawa, A. Farina, K. Koide [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2004. – N 24. – P. 697–700.

128. Seredkina, N. S. Progression of Murine Lupus Nephritis Is Linked to Acquired Renal Dnase1 Deficiency and Not to Up-Regulated Apoptosis / N. S. Seredkina, N. Zykova, O. P Rekvig // *Am. J. Pathol.* – 2009. – N 175. – P. 97–106. – DOI: 10.2353/ajpath.2009.080943.

129. Shak, S. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum / S. Shak, D. J. Capon, R. Hellmiss [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – N 87. – P. 9188–9192.

130. Shand, A. Maternal vitamin D status in pregnancy and adverse pregnancy outcomes in a group at high risk for pre-eclampsia / A. Shand, N. Nassar, V.P. Dadelszen [et al.] // *BJOG.* – 2010. – N 117 (13). – P. 1593–1598.

131. Sibai, B. Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units / B. Sibai, J. Hauth, S. Caritis [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – N 182 (4). – P. 938–942.

132. Sibai, B. Pre-eclampsia / B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc // *Lancet*. – 2005. – N 365. – P. 785–799.

133. Sibai, B. Risks of preeclampsia and adverse neonatal outcomes among women with pregestational diabetes mellitus. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units / B. Sibai, S. Caritis, J. Hauth, [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – N 182 (2). – P. 364–369.

134. Sibai, B. M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia / B. M. Sibai // *Obstet. Gynecol.* – 2003. – N 102 (1). – P. 181–192.

135. Skjaerven, R. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. / R. Skjaerven, A. J. Wilcox, R. T. Lie // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – N 346 (1). – P. 33–38.

136. Smid, M. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies / M. Smid, S., Galbiati A. Lojaco [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 2006. – N 26. – P. 785–790.

137. Smid, M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. / M. Smid, A. Vassallo, F. Lagona [et al.] // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – N 945. – P. 132–137.

138. Smith, G. C. Pregnancy complications and maternal risk of ischemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births / G. C. Smith, J. P. Pell, D. Walsh // *Lancet*. – 2001. – N 357. – P. 2002–2006.

139. Speranskii, A. I. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human / A. I. Speranskii, S. V. Kostyuk, N. N. Veiko // *Cells Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*. – 2015. – N 9 (2). – P. 174–184.

140. Staff, A. C. Circulating predictive biomarkers in pre-eclampsia / A. C. Staff // *Pregnancy Hypertens.* – 2011. – N 1. – P. 28–42.

141. Svenson, M. Human urine deoxyribonuclease increases endogenous thymidine in the mouse thymocyte interleukin 1 assay: an artificial interleukin-1 inhibitor / M. Svenson, K. Bendtzen // *Cytokine*. – 1989. – N 1. – P. 52–55.

142. Thangaratinam, S. Prediction and primary prevention of pre-eclampsia / S. Thangaratinam, J. Langenveld, B. W. Mol [et al.] // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2011. – N 25 (4). – P. 419–433.

143. Thomopoulos, C. Assisted reproductive technology and pregnancy-related hypertensive complications: a systematic review / C. Thomopoulos, C. Tsioufis, H. Michalopoulou [et al.] // J. Hum. Hypertens. – 2013. – N 27 (3). – P. 148–157.

144. Tjoa, M. L. Trophoblastic oxydative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA / M. L. Tjoa, T. Cindrova-Davies, O. Spasic-Boskovic [et al.] // Am. J. Pathol. – 2006. – N 169. – P. 400–404.

145. Trogstad, L. Recurrence risk of preeclampsia in twin and singleton pregnancies / L. Trogstad, A. Skrondal, C. Stoltenberg [et al.] // Am. J. Med. Genet. A. 2004. – N 126A (1). – P. 41–45.

146. Trogstad, L. The effect of recurrent miscarriage and infertility on the risk of pre-eclampsia / L. Trogstad, P. Magnus, A. Moffett [et al.] // BJOG. – 2009. – N 116 (1). – P. 108–113.

147. Tsunoda, H. Changes in interleukin 1 levels in human amniotic fluid with gestational ages and delivery / H. Tsunoda, T. Tamatani, Y. Oomoto [et al.] // MicroBiol. Immunol. – 1990. – N 34. – P. 377–385.

148. Urbanova, M. Circulating nucleic acids as a new diagnostic tool. / M. Urbanova, J. Plzak, H. Strnad [et al.] // Cell Mol. Biol. Lett. – 2010. – Vol. 15, N 2. – P. 242–259. – DOI: 10.2478/s11658-010-0004-6.

149. Vatten, L. J. Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation / L. J. Vatten, R. Skjaerven // Early Hum. Dev. – 2004. – N 76 (1). – P. 47–54.

150. Velasco, E. G. Activity of alkaline ribonuclease in placentas of malnourished women / E. G. Velasco, P. Rosso, J. Brassel [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1975. – N 123. – P. 637–639.

151. Verburg, P. E. Seasonality of pregnancy induced hypertensive disorders in South Australia – A retrospective population study 2007–2011 / P. E. Verburg, G. Tucker, W. Scheil [et al.] // Pregnancy Hypertens. 2015. – N 5 (1). – P. 91

152. Villar, J. World Health Organisation multicentre randomised trial of supplementation with vitamins C and E among pregnant women at high risk for pre-eclampsia in populations of low nutritional status from developing countries / J. Villar, M. Purwar, M. Merialdi [et al.] // *BJOG*. – 2009. – N 116 (6). – P. 780–788.

153. Whitley, G. S. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field / G. S. Whitley, J. E. Cartwright // *Placenta*. – 2010. – N 31 (6). – P. 465–474.

154. Wikstrom, A. Tobacco use during pregnancy and preeclampsia risk: effects of cigarette smoking and snuff / A. Wikstrom, O. Stephansson, S. Cnattingius // *Hypertension*. – 2010. – N 55 (5). – P. 1254–1259.

155. Wright, A. Trisomy 21 is associated with variable defects in cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway / A. Wright, Y. Zhou, J. F. Weier [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2004. – N 130. – P. 354–364.

156. Xiaojun, Tang. Accurate quantitation of circulating cell-free mitochondrial DNA in plasma by droplet digital PCR Wei Ye 1 / Xiaojun Tang, Chu Liu, Chaowei Wen [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – N 409. – P. 2727–2735. – DOI: 10.1007/s00216-017-0217-x.

157. Xiong, X. Fraser W. D., Demianczuk N. N. History of abortion, preterm, term birth, and risk of preeclampsia: a population-based study. / X. Xiong, W. D. Fraser, N. N. Demianczuk // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. – N 187 (4). – P. 1013–1018.

158. Yanit, K. E. The impact of chronic hypertension and pregestational diabetes on pregnancy outcomes / K. E. Yanit, J. M. Snowden, Y. W. Cheng [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2012. – N 207 (4). – P. 333.e1–e6

159. Yasuda, T. Human genetically polymorphic deoxyribonuclease: purification, characterization, and multiplicity of urine deoxyribonuclease I / T. Yasuda, S. Awazu, W. Sato [et al.] // *J. Biochem.* – 1990. – N 108. – P. 393–398.

160. Yasuda, T. Survey of the association of deoxyribonuclease I polymorphism with disease / T. Yasuda, D. Nadano, E. Tenjo [et al.] // *Hum. Hered.* 1993. – N 43. – P. 205–208.

161. Yu, Y. The combined association of psychosocial stress and chronic hypertension with preeclampsia / Y. Yu, S. Zhang, G. Wang [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2013. – N 209 (5). – P. 438.e1–e12.

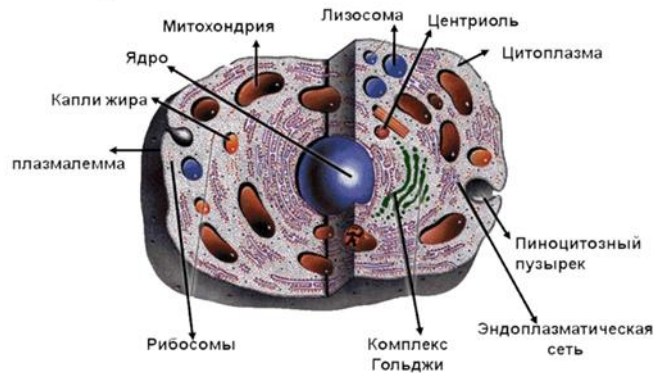
162. Zdravkovic, T. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review / T. Zdravkovic, O. Genbacev, M. T. McMaster [et al.] // *Placenta.* – 2005. – N 26. – P. S81–S86.

163. Zhong, X. Y. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia / X. Y. Zhong, W. Holzgreve, S. Hahn // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – N 945. – P. 138–140.

164. Zhong, X. Y. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia / X. Y. Zhong, W. Holzgreve, S. Hahn // *Hypertens Pregnancy.* – 2002. – N 21. – P. 77–83.

## Приложение А

### Строение животной клетки

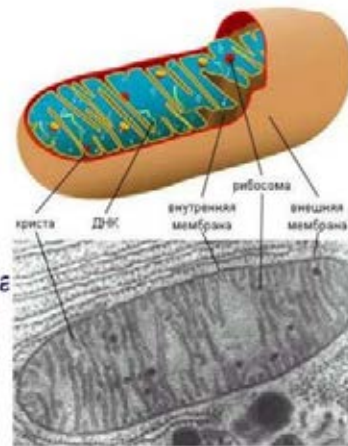


**Рисунок А.1** – Строение животной клетки.

*Источник:* Презентация для уроков биологии. URL: <http://900igr.net/prezentacija/biologija/kletochnyj-uroven-organizatsii-zhizni-152204/stroenie-zhivotnoj-kletki-17.html>

### Митохондрии

- Двойная мембрана
- Собственная ДНК
- Собственные рибосомы
- Складки внутренней мембраны – кристы
- Внутренняя «цитоплазма матрикс»



**Рисунок А.2** – Строение митохондрии

*Источник:* Доклад митохондрии. Строение, функции, происхождение митохондрий. URL: <https://myslide.ru/presentation/skachat-mitochondrii-stroenie--funkcii--proisxozhdenie-mitochondrij>

Митохондрии содержат собственную ДНК, причем в каждой митохондрии человека обычно содержится от 5 до 10 копий кольцевой молекулы ДНК. ДНК митохондрий в человеческих клетках содержит 37 генов, против 20–25 тыс. тех, что содержатся в ядерной ДНК [Wiesner R. J. et al., 1992].