

На правах рукописи

Аветисова Кристина Григорьевна

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

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Клименко Петр Афанасьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Баев Олег Радомирович

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 1-ое родильное отделение, руководитель отделения

доктор медицинских наук, профессор **Давыдов Александр Ильгизирович**
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии лечебного факультета, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____ 2020г. в 14:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.15 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___»_____ 2020 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Хашукоева Асият Зильчифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Айламазян Э. К., 2014; Samantha E. P., 2014, Сухих Г. Т., Стрижаков А. Н. и др., 2017; Серов В. Н. и др. 2018]. Преэклампсия и плацентарная недостаточность в любом проявлении могут приводить к серьезным изменениям как в организме матери, вплоть до полиорганной недостаточности, так и плода, приводя к гипоксии.

В последние годы, с целью диагностики хронических полиорганных нарушений, стали использовать в качестве дополнительных признаков повреждения тканей исследование протеом, ДНК и других нуклеотидов. ВкДНК может являться маркером тяжести осложнений, связанных с преэклампсией и плацентарной недостаточностью (Логутова Л.С. и др. 2012, Баев О. Р. и др. 2018). Поэтому, в качестве одного из триггеров плацента-ассоциированных состояний выбрано исследование изменений концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока - фермента ДНКазы 1 в плазме крови беременных и не беременных. В этом случае определяют не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК в материнской крови. В акушерской практике роль вкДНК и ее характеристик в диагностике полиорганных системных заболеваний, до настоящего времени мало изучены.

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 клиничко-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 1 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. Обнаружено что при преэклампсии существенно изменяется как вкДНК так и ее характеристики. Они коррелируют с клиническими признаками болезни.

Установлено, что если учитывать три показателя – концентрация вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I, то можно определять уровень гибели клеток в организме беременной. Если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы I на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то это свидетельствует о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе и клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при повышенной активности ДНКазы I указывают на недостаточно эффективный клиренс вкДНК из организма. Данные ультразвукового исследования фиксируют ЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время изменения антропометрических данных плода, тестируемых ультразвуком.

Выявлено, что увеличение в крови количества копий (повторов) мтДНК в составе вк ДНК 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%. Она непосредственно участвовала в проведении анализа литературы, составления анкет и электронных баз данных, анализе медицинской документации всех пациенток. Автором лично проведен отбор, ультразвуковое и клиническое обследование беременных, проводила анализ полученных результатов с применением статистических методов исследования. Автор принимала 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

По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 4 – в рецензируемых научных изданиях, 2 – в рецензируемом издании, рекомендованном Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, 1- в англоязычном журнале, входящим в Scopus.

Объём 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.

Материалы и методы исследования

За период с 2017 по 2019 гг. нами в ЦПС и Р обследовано 207 пациенток в возрасте 22-40 лет, проживающие в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. Группа 1 – небеременные, здоровые, представляла 40 студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров); группа 2 – 70 пациенток с нормально протекающей более 37 недель беременностью, которые родили здоровых детей без признаков гипоксии и гипотрофии; 3 группу составили 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 36 недель – у 34; группа 4 – пациентки со сроком гестации более 30 недель, с клиническими диагнозами: невынашивание - 25, плацентарная недостаточность и ЗРП, хроническая гипоксия плода - 15.

Диагностика развития плода. Развитие плода во время беременности определяли с помощью ультразвуковой антропометрии: измеряли бипариетальный размер головки, диаметры груди и живота и длину бедренной кости плода. При отставании этих размеров от средне популяционных, имеющих во всех справочниках, на 2 недели ставили диагноз ЗРП - 1 степени, от 2 до 4 недель – ЗРП 2 степени и более 4 недель – ЗРП 3 степени. Окончательный диагноз ЗРП устанавливали после родов на основании данных массы плода. Нормативные параметры находились между 75 и 25 перцентильными кривыми, 1 степень ЗРП - 25-10 кривая. 2 степень - 10-3 кривая, 3 степень – ниже 3 кривой. Использовали так же массо-ростовой коэффициент: норма – выше 60, ЗРП 1 степени – 55-60, ЗРП 2 степени – 50-55, ЗРП 3 степени – ниже 50. Функциональное состояние плода во время беременности и родов оценивалось с помощью методов функциональной диагностики: КТГ, доплерометрии сосудов матки, пуповины, среднемозговой артерии 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 (2-5МГц), RAB 4-8 D (2-8 МГц), КТГ – фетального монитора GE (General Electric) Corometrics (250CX), США.

Определение молекулярно-биологических факторов

Сбор образцов. Пробы (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.

Характеристики вкДНК определяли известными методиками.

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 (ДНКза 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 $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение.

Проведенные исследования показали, что при нормальной беременности не происходит заметных изменений в организме матери и плода. У небеременных концентрация вкДНК варьировала от 11 до 123 нг/мл (медиана 76 нг/мл). При нормальной беременности концентрация вкДНК колеблется от 2 до 347 нг/мл (медиана 78 нг/мл). Физиологический уровень вкДНК у беременных составляет 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. 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, 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 ($p = 0,0299$). В наших исследованиях не было зарегистрировано существенных различий мтДНК между показателями беременных 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».

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.

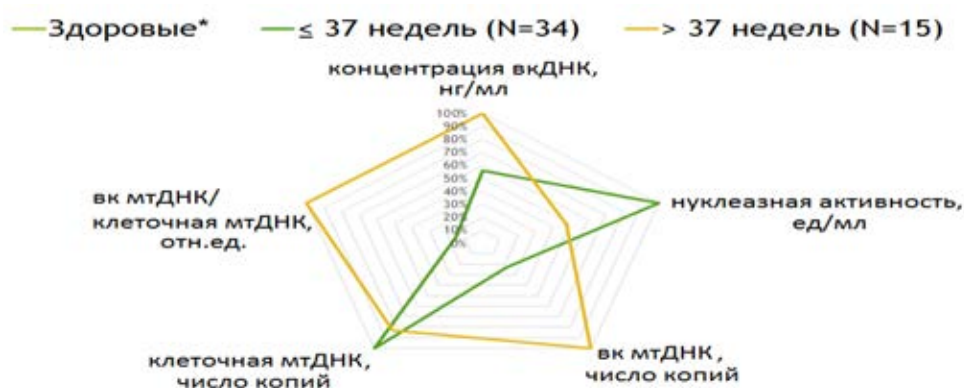


Рисунок 1 – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с различными сроками гестации у здоровых беременных

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

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 от 2 до 347 нг/мл (медиана 78 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.

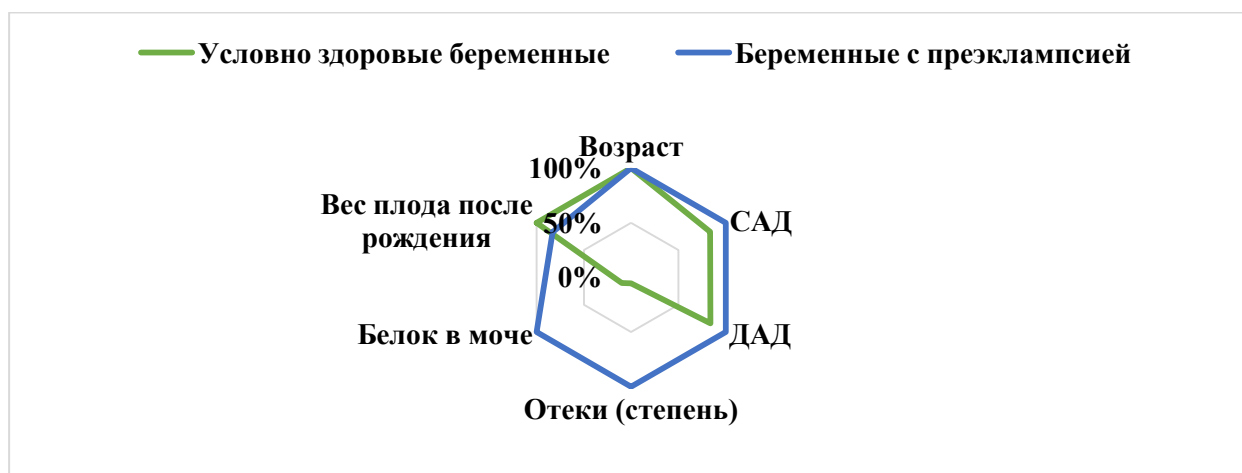


Рисунок 2 – Характеристика обследованных беременных

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

Как видно из приведенных данных на рис. 2, клинические показатели пациенток с преэклампсией существенно отличались от параметров в группе пациенток с нормально протекающей беременностью, они 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 рис.3 представлены результаты исследования корреляционной связи между клиническими параметрами всех беременных, свидетельствующие о наличии преэклампсии у части пациенток и хорошей зависимости между различными признаками болезни, исключающими случайные появления. 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
Ст. отеки	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 бер-ти	-0,41	0,26	-0,5	-0,36	0,68	-0,45	

Рисунок 3 – Корреляционный анализ клинических параметров (все обследованные беременные)

У пациенток с преэклампсией (см. рис. 4) 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. 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 – от 3,7 до 52,4 ед./мл (медиана 12,6 ед./мл; $p = 0,0301$).

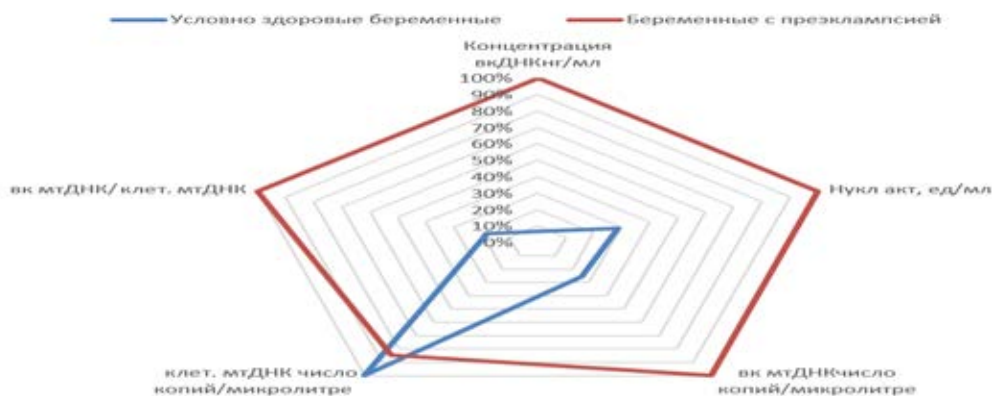


Рисунок 4 – Характеристики клеточной и внеклеточной ДНК у пациенток с преэклампсией и у здоровых беременных

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.

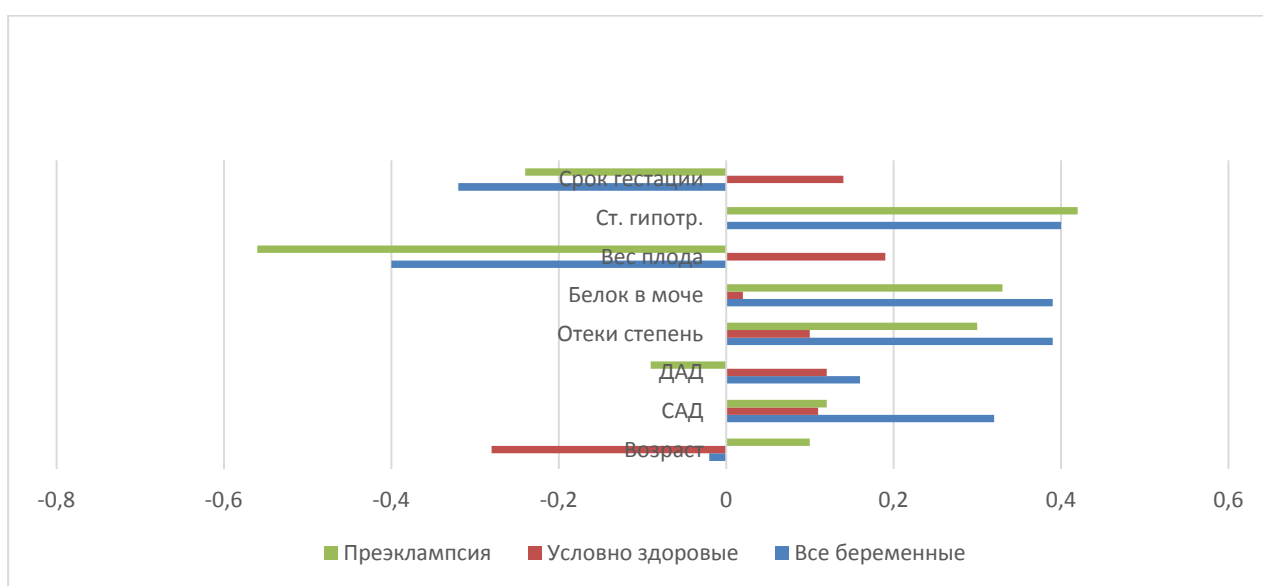


Рисунок 5– Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и концентрацией вкДНК

В группе пациенток с преэклампсией (рис. 5) 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 ($R = -0,56$; $p = 0,003$).

В общей группе беременных (рис. 6) пациенток с осложненной и не осложненной беременностью определена статистически значимая, положительная корреляционная связь между содержанием вк мтДНК в плазме и показателями САД и ДАД, степенью отеков, уровнем белка в моче, ЗРП.

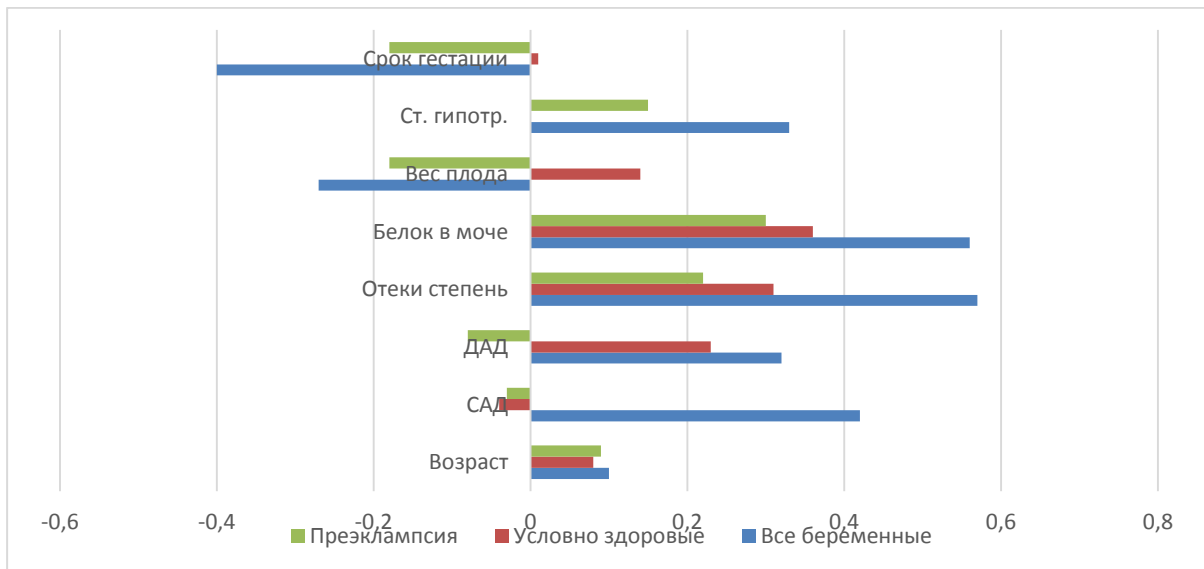


Рисунок 6– Корреляция Спирмена между клиническими показателями и содержанием мтДНК в образцах вкДНК

Кроме того, в группе из всех обследованных 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 выявлена и 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 (рис. 7) 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.

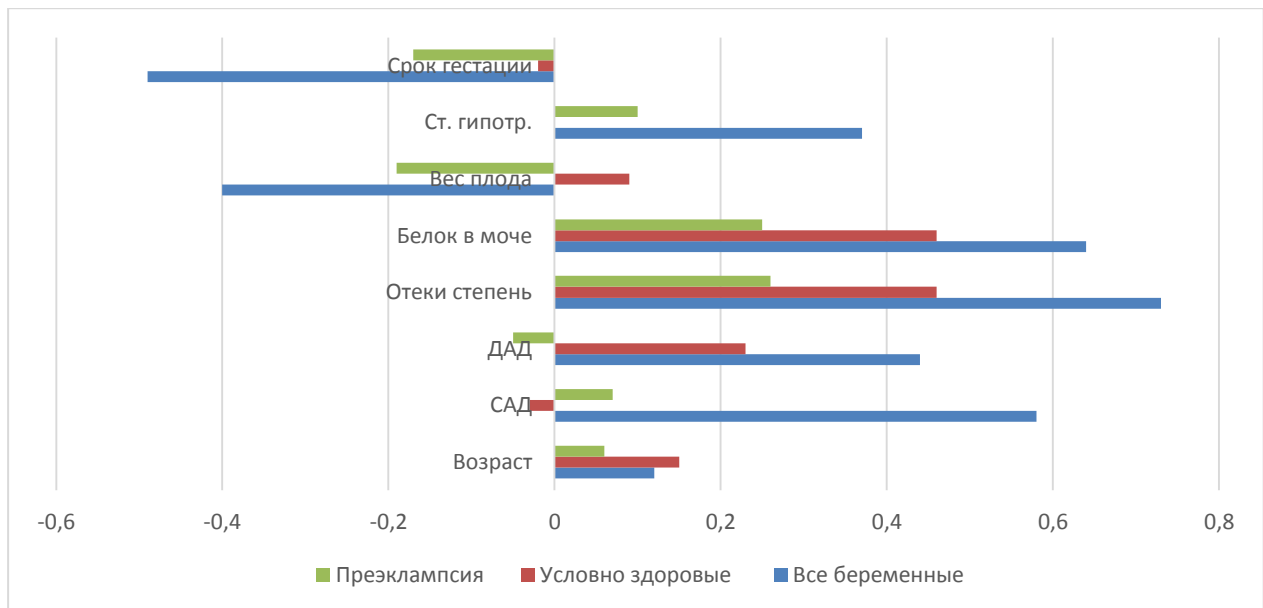


Рисунок 7– Корреляция Спирмена (Spearman Correlation) между клиническими показателями и интегративным показателем «вк мтДНК / клет. мтДНК»

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.

Проведенный частотный анализ (рис. 8) выявил значительные колебания изучаемых показателей, однако в большинстве наблюдениях у беременных с преэклампсией они отличались от небеременных и здоровых.

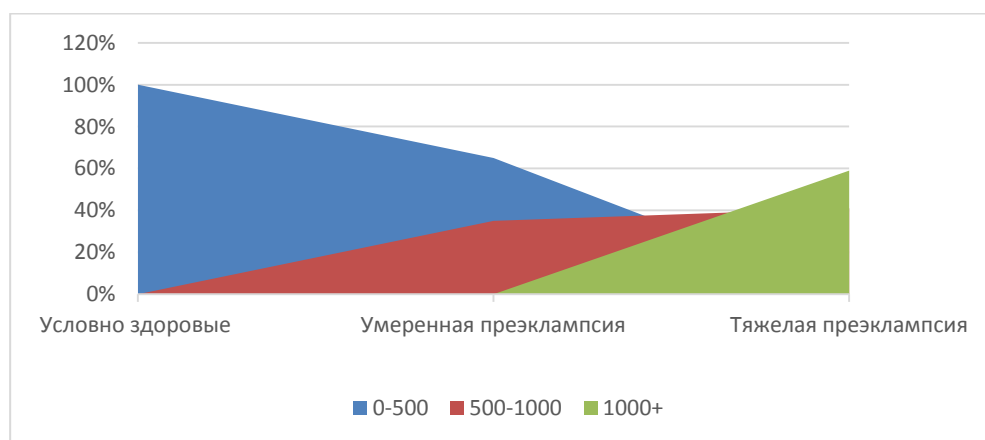


Рисунок 8 – Результаты частотного анализа исследуемых показателей по группам наблюдений (концентрация вкДНК, нг/мл)

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 63%, уровень белка в моче у 60%, отеки у 70%, задержка роста плода зарегистрирована у 18% беременных. При колебаниях вкДНК от 500 до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры у 47%, белок в моче у 47%, умеренные отеки наблюдались у 47%, головная боль у 40 %, ЗРП у 15% пациентов.

При тяжелой преэклампсии у 40% беременных концентрация вкДНК была от 589 до 1000 нг/мл, у остальных 60% превышала эту величину. У пациенток, имеющих в крови концентрацию вкДНК до 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические параметры в 44%, белок в моче в 66%, выраженные отеки в 90%, головная боль – в 33%, ЗРП в 11% наблюдений. При концентрациях вкДНК в крови беременных выше 1000 нг/мл САД и ДАД превышали физиологические показатели в 77%, белок в моче в 77%, выраженные отеки в 90%, головная боль – в 46%, ЗРП в 46% 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) меньше 0,87 (подгруппа 2) меньше 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 ($p < 0,05$, $N_2 = 40$, $N_3 = 39$). 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) больше 3-2 (76 нг/мл) больше 3-1 (38 нг/мл) больше 3-0 (16 нг/мл). Однако различия между подгруппами были недостоверны ($p > 0,05$) вследствие малочисленности выборок и большого разброса значений. Можно отметить, что чем выше степень ЗРП в подгруппе, тем больше в ней частота образцов с высокими значениями концентрации вкДНК, 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.

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 (рис. 9). 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.

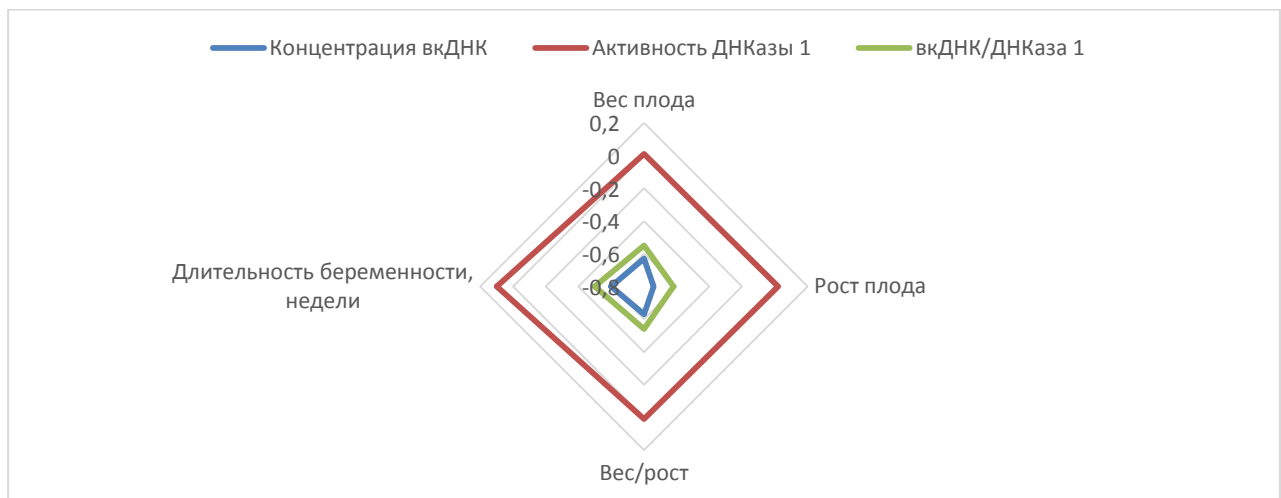


Рисунок 9– Анализ зависимости показателей роста плода и длительности беременности от концентрации вкДНК, активности ДНКазы 1 и показателя вкДНК/ДНКазы 1 методом линейной регрессии для группы 3 (ЗРП).

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.

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).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Тема исследования дает основу для дальнейшей разработки скрининговых программ при преэклампсии и плацентарной недостаточности у беременных. Целесообразно продолжить изучение вкДНК и ее характеристик для рационального ведения беременности и родов с помощью своевременной диагностики преэклампсии и плацентарной недостаточности.

ВЫВОДЫ

1. При нормальной беременности во втором и третьем триместре регистрируются: концентрация вкДНК менее 347 нг/мл, активность ДНКазы-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 I 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 преэклампсии 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 работ, опубликованных автором по теме диссертации

1) Avetisova, K. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy / V. Sergeeva, M. Klimenko, K. Avetisova, P. Klimenko, et al // **Biomed Rep.** - 2017 Oct - 7(4) - P. 319-324.

2) Аветисова, К.Г. Изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и активности ДНКазы I плазмы периферической крови при нормальной беременности / Е.С. Ершова, М.П. Клименко, К.Г. Аветисова, П.А. и др. // Материалы XXIII съезда физиологического общества им И.П. Павлова – 2017 - С. 404-406.

3) Аветисова, К.Г. Уровень внеклеточной ДНК и активность ДНКазы I при нормальной и осложненной беременности / К.Г. Аветисова, С.В. Костюк, Клименко П.А. и др. // **Вестник РГМУ** – 2018. - №4. - С. 75-80.

4) Avetisova, K. Increased mitochondrial and ribosomal DNA copy numbers in cell-free DNA samples obtained from women with complicated pregnancies / A. Poletkina, S. Klimenko, K. Avetisova et al // 11th International Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS) – 2019. - P. 72.

5) Аветисова, К.Г. Прогнозирование внутриутробной задержки роста плода и плацентарной недостаточности / Т.А. Колбасина, П.А. Клименко, К.Г. Аветисова // Сборник тезисов XIV Международной (XXIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых // 2019 - С.16-17.

6) Аветисова, К.Г. Копийность рибосомной ДНК (рДНК) в геномах женщин как фактор успешности ЭКО и наличия осложнений беременности / Клименко П.А., Клименко М.П., Аветисова К.Г. и др.// **Ж. Медицинская генетика.** - 2019, № 11, стр. 14-25.