

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Баева Олега Радомировича на диссертационную работу Аветисовой Кристины Григорьевны «Внеклеточная ДНК у беременных при преэклампсии и плацентарной недостаточности», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.01 - акушерство и гинекология.

### Актуальность исследования

Диссертационная работа Аветисовой Кристины Григорьевны посвящена повышению качества диагностики тяжелых форм преэклампсии и плацентарной недостаточности во время беременности с помощью определения параметров внеклеточной ДНК.

Актуальность работы не вызывает сомнений и обусловлена высокой частотой преэклампсии, которая не имеет тенденции к снижению. Преэклампсия встречается у 5-8% беременных и занимает второе место в мире в структуре материнской смертности. Среди беременных с тяжелой ПЭ перинатальная смертность наблюдается примерно в 25%, антенатальная гибель плода из них у 65-70%. Плацентарная недостаточность также 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%.

В последнее десятилетие увеличилось количество пациенток с «атипичным» течением ПЭ, не укладывающимся в классическую картину заболевания, однако строгого определения атипичной ПЭ не существует.

Выполнение данной работы обусловлено необходимостью выявить особенности клинического течения тяжелой преэклампсии и плацентарной недостаточности в современных условиях, возможные пути снижения материнской заболеваемости и смертности.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Объем исследования и методический подход, использованные автором для формирования групп и статистической обработки данных, представляются достаточными для получения достоверных результатов. 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  $p < 0,05$ .

### **Научная новизна и практическая значимость**

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов, выводов и практических рекомендаций несомненна.

На основании изучения особенностей течения тяжелых форм заболевания у пациенток с ПЭ и плацентарной недостаточностью, было установлено, 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 вкДНК свидетельствует о тяжелом течении преэклампсии и прогрессировании плацентарной недостаточности.

Полученные результаты имеют существенное значение для науки и практической медицины. Определена возможность диагностики тяжелой ПЭ и плацентарной недостаточности и обоснована полезность внедрения этой методики в клиническую практику.

### **Общая характеристика и содержание работы**

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, клинической характеристики больных, результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит 12 отечественный и 152 зарубежных источников. Обзор литературы соответствует теме диссертации, подробно освещает современные представления об этиологии и патогенезе преэклампсии и плацентарной недостаточности, симптомах заболевания и методах диагностики. Диссертант хорошо владеет изучаемой научной проблемой и демонстрирует эрудицию, умение анализировать материал.

Во второй главе автор приводит подробную характеристику обследованных пациенток, дизайн исследования и описание всех его этапов.

В третьей главе изложены результаты собственных исследований.

В разделе 3.1. представлено изменение концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при нормальной беременности, где были обследованы 80 здоровых пациенток для выявления нормативных параметров вкДНК. Из них 40 небеременных в возрасте 22-40 лет из студенток и ординаторов медицинского учреждения (волонтеров) составили 1 контрольную группу. Другие 40 беременных были с нормально протекающей беременностью сроком более 37 недель, которые родили здоровых детей без признаков гипоксии и ЗРП. Автором не зафиксировано 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.

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 автор провел сопоставление концентрации вкДНК и активности ДНКазы 1 в крови небеременных и пациенток при физиологической беременности с разными концентрациями вкДНК. Проведенные исследования показали, что концентрация вкДНК и ее характеристики имеют отрицательную корреляционную связь со сроком беременности. Учитывая то, что в последующих исследованиях из-за тяжести преэклампсии и плацентарной недостаточности беременность прерывали раньше срока путем кесарева сечения, представлялось целесообразным отдельно рассмотреть результаты пациенток, обследованных до и после 37 недель физиологической беременности.

Было установлено, 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.

В разделе 3.2. представлены изменения концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при преэклампсии. 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.

Было обнаружено, что 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. 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.

У беременных с повышением артериального давления, отеками автором обнаружено повышение концентрации вкДНК и изменение ее характеристик, в

частности увеличение митохондриальных копий в составе вкДНК и существенное возрастание значений 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 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 проведенных 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 автором 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.

В разделе 3.3. представлены изменения концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК и ее характеристик в крови при плацентарной недостаточности и задержке роста плода. Было обнаружено, 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 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.

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

Частотный анализ 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. Повышенная активность ДНКазы 1 указывает на наличие патологии, которая сопровождается гибелью клеток. В случае беременности, осложненной ЗРП, автор впервые обнаружила достоверное увеличение активности ДНКазы 1 плазмы, что говорит об увеличении интенсивности процессов гибели клеток в организме беременной.

Высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затруднял и искажал 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 исследования выявили совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока – фермента ДНКазы ДНКазы I в плазме крови небеременных, пациенток с нормальной беременностью и беременностью, осложненной ЗРП. Было выявлено, 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.

Диссертация иллюстрирована достаточным количеством наглядных таблиц и рисунков. Статистическая достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений, так как работа выполнена на достаточном материале с применением оптимальных методов анализа. Научные положения диссертации обоснованы, достоверны, содержат признаки новизны.

**Выводы и практические рекомендации** конкретны, полностью отвечают задачам исследования. Опубликованные работы и автореферат полностью отражают суть работы. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 - в рецензируемых научных изданиях, Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, а также 1- в англоязычном журнале, входящем в Scopus.

Принципиальных замечаний к диссертации нет. Общая оценка представленной работы положительная. Важность ее как с научных, так и с практических позиций не вызывает сомнений.

### **Заключение**

Диссертационная работа Аветисовой Кристины Григорьевны «Внеклеточная ДНК у беременных при преэклампсии и плацентарной недостаточности» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора П.А. Клименко, содержащей решение актуальной для акушерства задачи поиска оптимального подхода к своевременной диагностике ПЭ и плацентарной недостаточности и грамотной оценке степени её тяжести с учетом особенностей клинического течения заболевания в настоящее время, в том числе с использованием современных инструментальных и лабораторных методов

исследования. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а диссертант, Аветисова Кристина Григорьевна, достойна присуждения искомой степени по специальности 14.01.01 - акушерство и гинекология.

**Официальный оппонент:**

Руководитель 1-го родильного отделения  
ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр  
акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор

**Баев О.Р.**

« 05 » 03 2020

**Подпись д.м.н., профессора Баева О.Р. заверяю:**

Ученый секретарь  
ФГБУ «Национальный  
медицинский исследовательский центр  
акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
кандидат медицинских наук, доцент



**Павлович С.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 117198, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. тел.: 8(495)438-14-77, e-mail: secretariat@oparina4.ru