

На правах рукописи

ЛАРИНА ЕКАТЕРИНА БОРИСОВНА

**ПРОФИЛАКТИКА ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ:
КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ**

14.01.01- Акушерство и гинекология

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Панина Ольга Борисовна

Доктор медицинских наук

Мальков Павел Георгиевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Мурашко Андрей Владимирович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, медико-профилактический факультет, кафедра акушерства и гинекологии, профессор кафедры

доктор медицинских наук, профессор

Волощук Ирина Николаевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, профессор кафедры

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «__» ____ 201_ года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.15 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте:<http://rsmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Хашукоева Асият Зульчифовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Плацентарная недостаточность и ассоциированные с ней осложнения, такие как преэклампсия, задержка роста плода (ЗРП), антенатальная гибель, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты (ПОНРП) обусловлены патологией формирования плаценты. Учитывая общность патогенетических механизмов развития ЗРП, преэклампсии и ПОНРП, многие ученые объединяют данные осложнения беременности в группу «плацента-ассоциированных осложнений» [Ananth C.V., 2007; Roberts M.D., 2014]. Данные осложнения беременности являются основными причинами перинатальной заболеваемости и смертности в современном акушерстве [Волощук И.Н., 2002; Айламазян Э.К., 2014; SamanthaE.P., 2014], обуславливают около трети индуцированных преждевременных родов, в том числе очень ранних, связанных с рождением детей с экстремально низкой массой тела [Walker M.G., 2012, Савельева Г.М., 2013; Robert L.G., 2015]. Плацента-ассоциированные осложнения являются важнейшей медицинской проблемой и значимым финансовым вопросом, так как реанимация и выхаживание недоношенных детей являются дорогостоящими.

Пациентки, анамнез которых отягощен плацента-ассоциированными осложнениями, находятся в группе риска, и их следующая беременность часто вновь осложняется тяжелой плацентарной недостаточностью [Ananth C.V., 2007; Melamed N., 2012], что говорит о необходимости проведения профилактики плацента-ассоциированных осложнений именно в данной группе пациенток.

Одним из основных факторов развития неосложненной беременности является правильное формирование плаценты. Нарушение инвазии вневорсинчного трофобласта, трансформации спиральных артерий, баланса про- и антиангиогенных факторов роста, формирования ворсинчатого дерева плаценты и приводят к развитию плацентарной недостаточности, преэклампсии и ЗРП [Милованов А.П., 2008; JamesM., 2014; Мурашко А.В, 2015; Щеголев А.И.,

2016,]. Патоморфологическое исследование последов пациенток, чья беременность осложнилась преэкламсией и ЗРП выявляет высокую частоту ишемических изменений плацентарной ткани, тромбозов сосудов ворсин и инфарктов плаценты [Волощук И.Н., 2002; Sankar K.D., 2013; Mukherjee R., 2014].

Предполагается, что антитромботические препараты могут быть эффективны в качестве профилактики ПОНРП, преэкламсии, ЗРП и антенатальной гибели плода, в связи с чем применяют препараты нефракционированного гепарина, низкомолекулярных гепаринов (НМГ) и ацетилсалациловой кислоты [Бицадзе В.О., 2004; Бугеренко Е.Ю., 2010; Мурашко А.В., 2014]. Однако существующие работы, посвященные эффективности применения НМГ для профилактики плацента-ассоциированных осложнений, представлены небольшими одноцентровыми исследованиями, гетерогенны по дизайну и не дают однозначного ответа о целесообразности антикоагулянтной терапии.

Несмотря на то, что основной причиной плацента-ассоциированных осложнений является нарушение формирования плацентарной ткани, работы по изучению влияния антикоагулянтной терапии на макро- и микроскопическую структуру плаценты, а также на экспрессию основных факторов роста в плацентарной ткани единичны.

Таким образом, целесообразно оценить клиническую эффективность НМГ для профилактики плацента-ассоциированных осложнений, а также изучить влияние антикоагулянтной терапии на структуру плаценты и экспрессию основного ангиогенного фактора роста VEGF-A.

Цель исследования

Разработка патогенетически обоснованных подходов к профилактике и терапии плацента-ассоциированных осложнений у пациенток группы высокого риска.

Задачи исследования

- 1) Провести анализ течения беременности, родов и перинатальных исходов у пациенток группы высокого риска при применении НМГ в зависимости от срока назначения препаратов.
- 2) Оценить влияние НМГ на строение плаценты на макро- и микроскопическом уровне.
- 3) Изучить влияние НМГ на экспрессию VEGF-Ac учетом срока назначения препаратов.
- 4) Оценить вклад минорных аллелей гена VEGF-A (G(-1154)A, C(-2578)A, C(-936)T, G(-634)C) в развитие плацентарной недостаточности.

Научная новизна исследования

Проведен тщательный анализ течения беременности, родов, раннего неонатального периода у пациенток, получавших антикоагулянтную терапию с целью профилактики повторного развития плацентарной недостаточности в зависимости от срока назначения НМГ.

В ходе данной работы получены данные о влиянии антикоагулянтной терапии, начатой с прегравидарного этапа, на развитие ЗРП, преэклампсии у пациенток, с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе вне зависимости от наличия у них врожденной или приобретенной тромбофилии. Впервые проведен детальный анализ макро- и микроскопических особенностей последов, а также экспрессии VEGF-A в плацентарной ткани при назначении НМГ с прегравидарного этапа и/или различных сроков гестации.

Установлено, что назначение НМГ у пациенток группы высокого риска с прегравидарного этапа (не менее, чем за 1 цикл до наступления беременности) позволяет достоверно снизить частоту развития плацента-ассоциированных осложнений в результате прямого и/или косвенного влияния на формирование ворсинчатого древа и сосудистой сети плаценты.

Практическая значимость работы

В результате исследования получено клинико-морфологическое обоснование назначения антикоагулянтной терапии с прегравидарного этапа

и/или первого триместра гестации пациенткам с тяжелыми плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе с целью профилактики ЗРП, преэклампсии, ПОНРП, антенатальной гибели плода, вне зависимости от наличия у них врожденной и/или приобретенной тромбофилии. Сформулированы практические рекомендации по профилактическому назначению НМГ пациенткам с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе.

Разработаны оригинальные методики:

Макроскопическое изучение плаценты, оценка удельной площади инфарктов;

Компьютерная морфометрия, оценка удельной площади ворсин, межворсинчатого пространства, сосудов, патологических участков.

На основании гистологического и иммуногистохимического изучения плацентарной ткани получено морфологическое обоснование эффективности антикоагулянтной терапии за счет прямого и/или косвенного влияния на экспрессию сосудисто-эндотелиального фактора роста, созревание ворсинчатого древа и ангиогенез плаценты.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Профилактическое назначение НМГ обосновано у пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе. Данная терапия приводит к снижению частоты ЗРП III степени, тяжелой преэклампсии, ранних и очень ранних индуцированных родов, перинатальной смертности. Назначение данной терапии должно быть основано на анамнезе пациентки и не зависеть от наличия врожденной и/или приобретенной тромбофилии.

2) Клиническая эффективность применения НМГ с целью профилактики плацента-ассоциированных осложнений обусловлена влиянием данной терапии на развитие ворсинчатого древа и сосудистой сети плаценты за счет прямого и/или косвенного изменения уровня экспрессии VEGF-A.

3) Эффективность антикоагулянтной терапии коррелирует со сроком ее начала. Предпочтительно проведение прегравидарной подготовки препаратами НМГ с фертильного цикла.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность ГБУЗ ЦПСиР ДЗМ (главный врач – к.м.н. О.А. Латышкевич), перинатального медицинского центра ЗАО «МД ПРОЕКТ 2000» (главный врач – Т.О. Нормантович) и клинического госпиталя Лапино «ООО Хавен» (главный врач – к.м.н. Е.И. Спириdonova). Материалы диссертации используются в учебном процессе при подготовке студентов, ординаторов и аспирантов на кафедре акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Апробация диссертации

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно - практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии, кафедры физиологии и общей патологии Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», и сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №6 от 27 июня 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 - в журналах, рецензируемых ВАК РФ Минобрнауки РФ.

Личное участие автора

Автор принимала непосредственное участие в выборе направления исследования, постановке задач, клиническом обследовании и определении тактики ведения беременных с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе. Автором проводилось патологоанатомическое исследование

последов, включающей морфометрическую оценку (в том числе компьютерную), гистологический анализ и иммуногистохимическое определение экспрессии VEGF-A в плацентарной ткани. Автор участвовала в генотипировании пациенток по 4 полиморфизмам гена VEGF-A. Самостоятельно проведен клинический анализ и статистическая обработка полученных данных, написаны и подготовлены к публикации статьи по результатам проведенного исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «материалы и методы исследования», результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 28 рисунков и 11 таблиц. Список литературы содержит 215 источников(65 отечественных и 150 зарубежных авторов).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа проводилась в период с 2012 по 2017 гг. на кафедре акушерства и гинекологии ФФММГУ имени М.В. Ломоносова на базе ГБУЗ ЦПСиР ДЗМ (главный врач – к.м.н. Латышкевич О.А.), исследовательская часть – в отделе клинической патологии МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. отделом клинической патологии – д.м.н. Мальков П.Г.); на кафедре биохимии и молекулярной биологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. кафедрой – д.б.н., профессор, академик РАН Ткачук В.А.).

Проведение исследования было разделено на три этапа.

На первом этапе проведен анализ медицинской документации пациенток с учетом критериев включения и исключения. Критерии включения: наличие в анамнезе ЗРП II-III степени, преэклампсии средней и тяжелой степеней, ПОНРП; применение НМГ (эноксапарин натрия или надропарин кальций в

профилактической дозе, оттитрованной по весу пациентки) с любого срока гестации (или с прегравидарного этапа) в настоящую беременность.

Критерии исключения: гибель плода или новорожденного в анамнезе и в настоящую беременность по причине, не связанной с плацентарной недостаточностью; многоплодная беременность; тяжелая экстрагенитальная патология; гипокоагуляция по данным гемостазиограммы.

Пациентки были разделены на три группы (по срокам назначения НМГ):

Группа 1 (n=40) – с прегравидарного этапа (не менее 1 цикла до наступления беременности);

Группа 2 (n=40) – с I триместра беременности (не позднее 13 недель гестации);

Группа 3 (n=40) – со II или III триместра гестации (не ранее 13 недель гестации; не позднее, чем за 2 недели до родоразрешения).

Эффективность терапии оценивалась по частоте развития и степени тяжести плацента-ассоциированных осложнений (ЗРП, преэклампсии, ПОНРП) в настоящую беременность, частоте преждевременных родов, а также по частоте развития осложнений раннего неонatalного периода.

Была проведена оценка эффективности для следующих вариантов лечения: монотерапия низкомолекулярными гепаринами (n=44) или их комбинация с ацетилсалициловой кислотой (n=36). Профилактические дозы низкомолекулярных гепаринов были оттитрованы по весу пациентки, доза ацетилсалициловой кислоты составляла 100 мг в сутки.

На втором этапе было проведено патологоанатомическое исследование 56 последов, включавшее иммуногистохимическое изучение экспрессии VEGF-A в плацентарной ткани, у пациенток, вошедших в первый этап работы. Были сформированы 3 группы в зависимости от сроков начала применения НМГ (группа 1 – прегравидарная подготовка, n=18; группа 2 – терапия с I триместра, n=21; группа 3 – со II или III триместра, n=17). Исследование последов проводилось по стандартизированной схеме (Милованов А.П., 1999), включающей макроскопический анализ, забор материала и последующее

микроскопическое изучение. Срезы плацентарной ткани, окрашенные гематоксилином и эозином, исследовали при помощи микроскопа Leica DM4000 (Leica Microsystems GmbH, Germany) со стандартным набором оптики. Для морфометрии полученных микрофотографий использовалось программное обеспечение ImageScopeM. Для иммуногистохимического анализа экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста в плацентарной ткани были использовались первичные поликлональные кроличьи антитела к VEGF-A (Thermo, UK). Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов проводили при помощи буфера Dewaxand HIER Buffer L (pH 6,0) и Dewaxand HIER Buffer M (pH 8,0) (Thermo, UK) при температуре 95-98 °C, в течение 20 минут в модуле предобработки (PT-Module, Thermo, UK). Иммуногистохимические реакции проводили в автоматизированном режиме с помощью автостейнера Thermo Scientific LabVision Autostainer 480S (Thermo, UK). Интенсивность цитоплазматической и/или мембранный реакции оценивали полукачественно по балльной шкале от 0 до 3+.

На третьем этапе исследования проводилась оценка вклада полиморфизмов гена VEGF-A в развитие плацентарной недостаточности. В основную группу были включены пациентки, с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе (n=40). В контрольную группу вошли здоровые повторнородящие женщины с физиологическим течением беременности и неотягощенным акушерским анамнезом (n=40). На образцах венозной крови была проведена оценка частоты встречаемости минорных полиморфизмов гена VEGF-A (G(-1154)A, C(-2578)A, C(-936)T, G(-634)C) методом ПЦР в реальном времени. Использовались готовые наборы для определения однонуклеотидных полиморфизмов («ДНК-технология», Россия).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета программ STATISTICA 10. Характер распределения признака оценивался с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для представления количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовали среднее

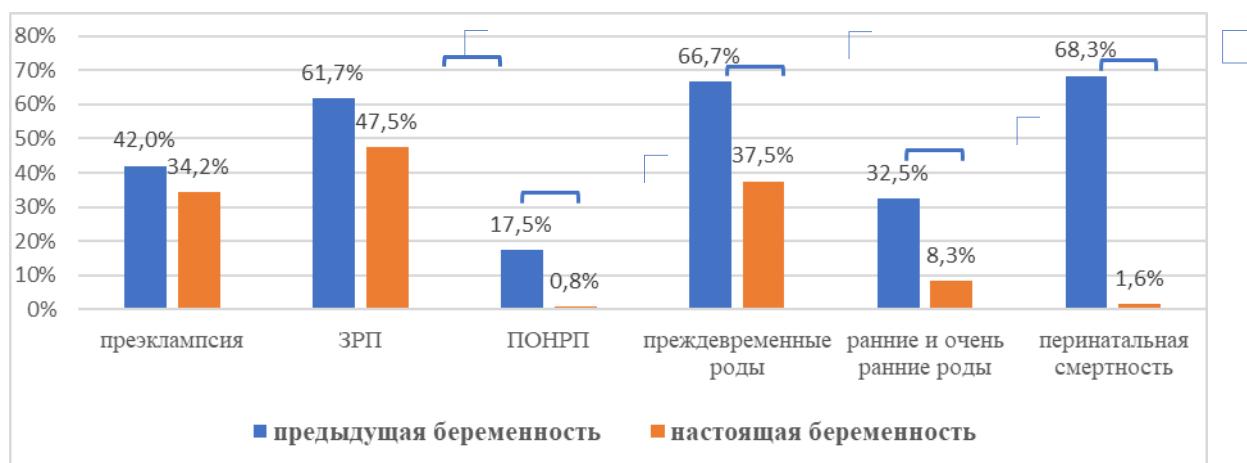
значение и стандартное отклонение; для сравнения групп – t-критерий Стьюдента, коэффициент корреляции Спирмена. Для количественных признаков, распределенных отлично от нормального, рассчитывались медиана и интерквартильный интервал, для сравнения групп – U-критерии Манна-Уитни. Для сравнения 3 групп по количественному признаку применялся критерий Краскелла-Уоллиса. Различия между категориальными показателями определяли критерием χ^2 . Рассчитывали отношение шансов и доверительный интервал. Различия считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования показано, что назначение НМГ (эноксапарин натрия или надропарин кальций в профилактической дозе, оттитрованной по весу пациентки) в группе пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе улучшает течение беременности и перинатальные исходы. Большинство пациенток (85,0%) были обследованы на АФС и генетическую тромбофилию (FV Leiden, FII G20210A). Частота встречаемости АФС составила 22,5%, мутации гена протромбина G20210A – 7,7%, мутации фактора V (Лейден) G1691A – 12,3%. По частоте встречаемости тромбофилий в группах различий выявлено не было.

Выявлено достоверное снижение частоты ЗРП и ПОНРП у обследуемых пациенток в сравнении с предыдущей беременностью. Встречаемость ЗРП снизилась и составила 47,5% (против 61,7%, $p=0,027$). Преждевременная отслойка normally расположенной плаценты диагностирована только у одной пациентки в настоящую беременность, хотя в анамнезе встречалась в 17,5% наблюдений ($p=0,00001$). По частоте развития преэклампсии (без учета степени тяжести и срока начала) не было выявлено достоверного снижения (34,2% против 42,0% в анамнезе, $p=0,08$). В результате снижения частоты плацента-ассоциированных осложнений, терапия НМГ привела к уменьшению доли преждевременных родов с 66,7% в предыдущую беременность до 34,2% в настоящую ($p=0,00001$). Перинатальная смертность снизилась в группе

обследуемых пациенток с 68,3% до 1,6% ($p=0,00001$, рис. 1). Важно отметить, что у 45,0% пациенток, которым проводилась терапия НМГ в настоящую беременность, плацента-ассоциированных осложнений не наблюдалось, перинатальный исход был благоприятным. Следует учесть, что в литературе не проводится сравнения эффективности терапии НМГ в снижении частоты развития плацента-ассоциированных осложнений в сравнении с анамнестическими данными, хотя доказано, что наличие данных осложнений в анамнезе значительно повышает риск их повторного развития [AnanthC.V., 2007; SamanthaE.P., 2014].

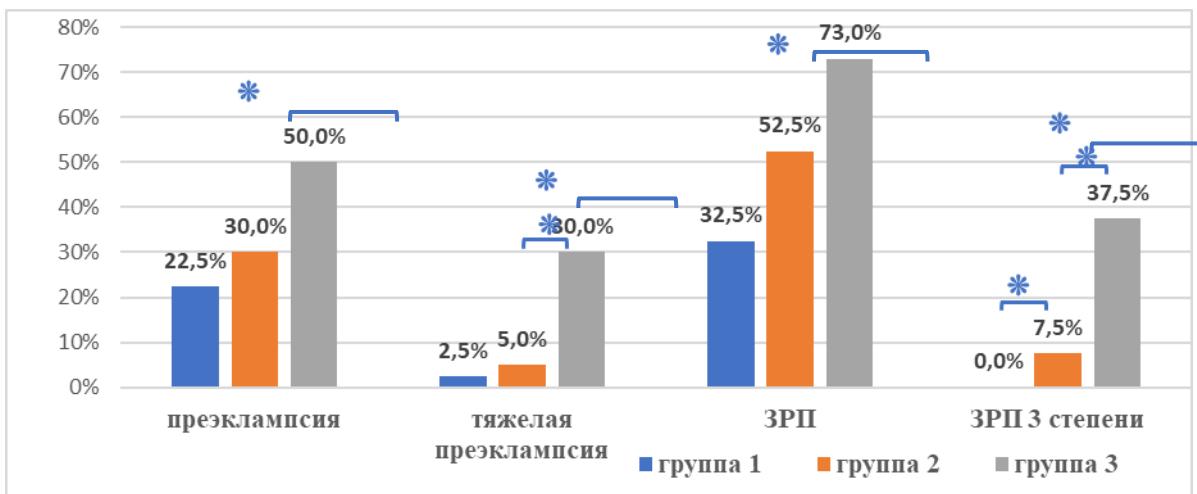


Примечание: $p<0,05$

Рис. 1. Частота осложнений в настоящую и предыдущую беременность.

В результате клинического анализа показана большая эффективность профилактического назначения НМГ (с прегравидарного этапа или I триместра беременности) в сравнении с назначением со II/III триместра. Так презклампсия (без учета степени тяжести) чаще развивалась у пациенток группы 3 (НМГ со II/III триместра), а реже всего - в группе 1 (НМГ с прегравидарного этапа). Встречаемость презклампсии достоверно различалась между группами ($p=0,0067$). Частота тяжелой презклампсии также была наивысшей у пациенток, получавших НМГ со II/III триместра и, при этом, достоверно отличалась от таковой в группе 1 ($p=0,003$) и в группе 2 ($p=0,003$). Задержка роста плода достоверно чаще встречалась в группах 2 и 3 (50,0% и 70,0% соответственно) в сравнении с группой 1 (22,5%, $p=0,011$ и $p=0,0001$ соответственно). Частота

ЗРП III степени подчинялась той же закономерности (37,5% в группе 3 в сравнении с 0,0% в группе 1 и 7,5% в группе 2, $p=0,00001$ и $p=0,001$ соответственно). Следует подчеркнуть, что при прегравидарном начале применения НМГ (в фертильном цикле) ЗРП III степени не было ни у одной из пациенток (рис. 2).



Примечание: \square $p<0,05$

Рис. 2. Частота преэклампсии и ЗРП, в исследуемых группах.

Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [Martinelli, 2012; deVriesJ., 2012; RodgerM., 2016] в том, что назначение НМГ с I триместра беременности не приводит к достоверному снижению частоты преэклампсии и ЗРП в сравнении с отсутствием лечения (в нашей работе с применением со II/III триместра). Вероятно, отсутствие прегравидарной подготовки в значимой степени нивелирует положительный эффект НМГ, в связи с чем указанные выше авторы считают нецелесообразным назначение НМГ для профилактики плацента-ассоциированных осложнений.

Нарушения показателей допплерометрии кровотока в системе «мать-плацента-плод» встречались значительно чаще в группе 3 (НМГ со II/III триместра), чем в группах 1 и 2. Общая частота выявленных нарушений в группе 3 составила 80%, что достоверно выше в сравнении с группами 1 и 2 (соответственно 30% $p=0,00001$ и 37,5% $p=0,0001$). Важно отметить, что в группе зарегистрировано 6 наблюдений (15%) нулевого или реверсного кровотока в артерии пуповины в

диастолу, в отличие от пациенток в группах 1 и 2, где критические нарушения кровотока изменения отмечены только у одной пациентки из 40 (2,5%, $p=0,048$ при попарном сравнении групп 1 и 3 и групп 2 и 3 для обоих случаев).

При сравнении групп между собой по показателям коагулограммы в течение беременности достоверных различий не выявлено, что позволяет заключить, что профилактические дозы НМГ не приводят к значимому изменению показателей коагулограммы, а основное влияние этих препаратов на течение беременности обусловлено не их антикоагулянтным действием.

Большинство пациенток (80,0%) были родоразрешены путем операции кесарева сечения, различий между группами по данному показателю не выявлено. У пациенток, которым назначались НМГ только со II или III триместра (группа 3), более чем в половине наблюдений (57,5%) кесарево сечение было произведено экстренно по витальным показаниям со стороны пациентки или плода. Доля экстренных операций в группах 1 (НМГ с фертильного цикла) и 2 (НМГ с I триместра) была достоверно ниже (25,0% и 27,5% соответственно, $p=0,003$ при сравнении групп 3 и 1, $p=0,006$ при сравнении групп 3 и 2).

Преждевременные роды (в сроке от 22 до 37 недель) чаще встречались у пациенток с назначением НМГ со II или III триместра (57,5%) по сравнению с пациентками группы 1 (22,5%, $p=0,0014$) и группы 2 (25,0%, $p=0,0032$). При этом в группе 3 все преждевременные роды были индуцированы по тяжести преэклампсии и/или состояния плода. Важно отметить, что очень ранние преждевременные роды (до 28 недель гестации) наблюдались только у пациенток, получавших НМГ со II или III триместра (10%, $p<0,05$ в сравнении с группами 1 и 2). Таким образом, за счет снижения частоты преэклампсии и ЗРП назначение антикоагулянтной терапии с фертильного цикла или I триместра гестации снижает частоту индуцированных преждевременных родов в 4 раза по сравнению с пациентками, которым терапия была назначена позднее. Аналогичные данные представлены в исследованиях Rey E. et al (2009), Gris J. et al (2011), Dodd J.M. (2013).

Профилактическое назначение антикоагулянтов значимо снижает частоту развития осложнений раннего неонатального периода. При оценке массы новорожденных получены следующие данные: в группе 1 среднее значение массы составило $2955,7 \pm 600,0$ г; в группе 2 – $2790,1 \pm 650,1$ г; в группе 3 – $2150,4 \pm 898,6$ г. При сравнении групп между собой критерий Краскела-Уоллиса высоко значим ($p=0,0001$, рис. 3). Все новорожденных с экстремально низкой массой были в группе пациенток с поздним началом терапии НМГ, что для данной группы составило 15,0% и было достоверно выше, чем в группе 1 и 2 (против 0%, $p<0,05$).

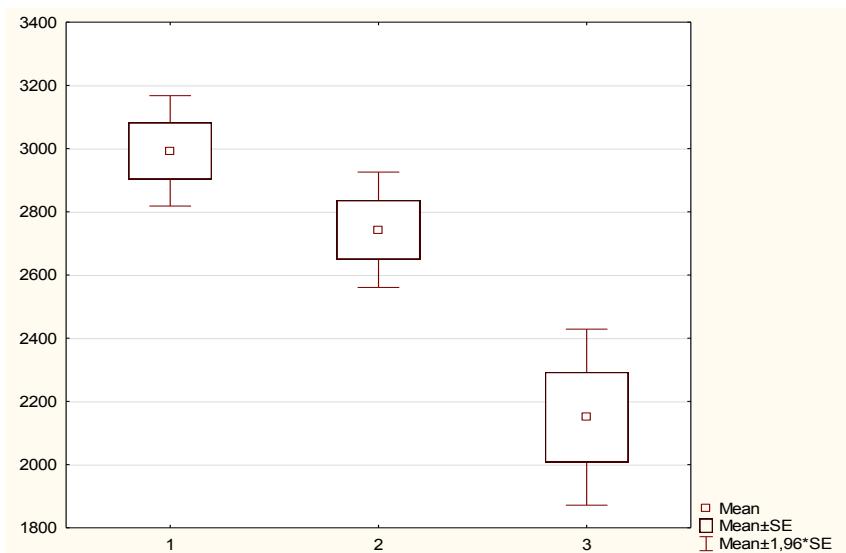


Рис. 3. Масса новорожденных в обследуемых группах.

Асфиксия легкой степени при рождении (баллы по шкале Апгар 6-7 на первой минуте жизни) выявлена более чем в половине наблюдений (57,5%) в группе 3, в 22,5%—в группе 2 и только в 15,0% наблюдений в группе 1. Достоверные различия были выявлены при попарном сравнении между группами 1 и 3 ($p=0,0001$) и группами 2 и 3 ($p=0,0014$). Асфиксия средней степени (оценка по шкале Апгар 4-5 на 1 минуте) была выявлена только у одного ребенка в первой группе (НМГ с прегравидарного этапа), во второй группе (НМГ с I триместра) – у двух детей, а в третьей группе (НМГ со II или III триместра) у трех. Тяжелой асфиксии при рождении не выявлено ни у одной из наблюдавшихся пациенток. В отделение реанимации и интенсивной терапии после рождения была переведена большая часть новорожденных в группе 3

(65,0%); 35,0% детей в группе 2; только 17,5% в группе 1. Различия при попарном сравнении выявлены между всеми тремя группами ($p<0,05$).

При нейросонографическом исследовании только в группе 3 (терапия со II или III триместра) были диагностированы внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) различной степени тяжести у 4 новорожденных (10,0%). Во всех наблюдениях ВЖК имеют гипоксический генез и обусловлены недоношенностью.

Несмотря на то, что достоверных различий по частоте указанных осложнений между группами 1 (прегравидарная подготовка) и 2 (НМГ с I триместра) не было, наименьшее количество патологии неонatalного периода выявлено при назначении терапии с фертильного цикла. Сопоставить полученные нами данные с литературными сложно, так как в доступных источниках анализ течения раннего неонатального периода не проводился.

В результате анализа клинических данных была показана эффективность НМГ в рамках профилактики плацента-ассоциированных осложнений беременности у пациенток с данными патологиями в анамнезе, вне зависимости от наличия у них генетической или приобретенной тромбофилии. Эффективность данной терапии зависит от сроков ее начала, оптимально назначение НМГ в профилактических дозах с прегравидарного этапа (с фертильного цикла).

Принципиально новым в нашей работе явилась оценка влияния антикоагулянтной терапии, назначенной с прегравидарного этапа, так как мы не нашли подобных данных в других источниках. При этом, именно терапия НМГ с фертильного цикла позволяет максимально снизить частоту развития плацента-ассоциированных осложнений и улучшить перинатальные исходы.

В рамках исследования проведено сравнение течения беременности, родов и состояния новорожденных у пациенток, получавших только НМГ ($n=44$) и тех, кому было назначено комплексное лечение НМГ и препаратами ацетилсалициловой кислоты ($n=36$). В результате проведенного анализа показано, что комплексная терапия препаратами аспирина и НМГ является более эффективной только для профилактики тяжелой преэклампсии (0% при

монотерапии НМГ в сравнении с 11,3% при комплексной терапии, $p<0,05$). Частота ЗРП, плацентарной недостаточности, преждевременных родов, а также патологии состояния новорожденного достоверно между группами не различается.

На втором этапе исследования с целью оценки влияния антикоагулянтной терапии на строение плаценты изучено 56 последов пациенток, включенных в первую часть работы. Аналогично первому этапу исследования, были сформированы 3 группы в зависимости от сроков назначения НМГ. Анализ строения последов позволил выявить определенные особенности в каждой исследуемой группе.

Средняя масса плаценты в группе 3 (терапия со II или III триместра) составила $290,5\pm91,8$ г и была достоверна ниже, чем в группе 1 ($432,0\pm99,9$ г $p=0,0005$) и 2 ($397,7\pm107,5$ г $p=0,006$). Группы 1 (прегравидарная подготовка) и 2 (начало терапии в 1 триместре гестации) достоверно между собой по данному параметру не различались, хотя имеется тенденция к увеличению массы плацент в группе 1. Чтобы нивелировать различия масс, обусловленные сроком родов, мы сравнили частоту встречаемости гипоплазии плаценты. В большинстве наблюдений (83,3%) при проведении прегравидарной подготовки НМГ масса плаценты соответствовала должной. В группе 2 (НМГ с I триместра гестации) гипоплазия плаценты была выявлена примерно в трети наблюдений (38,1%). В группе 3 (НМГ со II или III триместра) – в большинственаблюдений (64,7%) масса плаценты была меньше, чем должностная.

Краевое и оболочечное прикрепление пуповины встречалось с одинаковой частотой во всех трех группах. Инфаркты плаценты (составившие 10,0% и более от общей площади) при макроскопическом исследовании встречались достоверно реже в группе 1, по сравнению с группой 3 (11,1% против 52,9% $p=0,008$).

Таким образом, при прегравидарном назначении НМГ плаценты в подавляющем большинстве наблюдений соответствуют по массе и размерам нормальным значениям, не имеют крупных инфарктов и патологических

участков. Назначение НМГ со II или III триместра не может скомпенсировать сформировавшуюся плацентарную недостаточность, что проявляется выраженной гипоплазией размеров плаценты, наличием крупных инфарктов. При сравнении групп между собой были выявлены отличия морфологической картины каждой группы, а также достоверные различия при статистической обработке данных морфометрического анализа.

В настоящее время большое значение придается типу преобладающего ангиогенеза в развитии плацента-ассоциированных осложнений. Наиболее тяжелые формы ЗРП и преэклампсии клинически ассоциированы с преобладанием неразветвляющегося ангиогенеза в плацентарной ткани. Картина преобладания разветвляющегося ангиогенеза соответствует поздней преэклампсии и ЗРП, свидетельствует о наличии компенсаторных процессов в плаценте.

В большинстве плацент пациенток, получавших НМГ с прегравидарного этапа или с I триместра (94,0% и 71,4% соответственно), отмечалось нормальное развитие ворсинчатого дерева, представленного большим количеством специализированных терминальных ворсин с развитыми синцитио-капиллярными мембранными, широкими синусоидами и не выраженным стромальным компонентом (рис. 4).

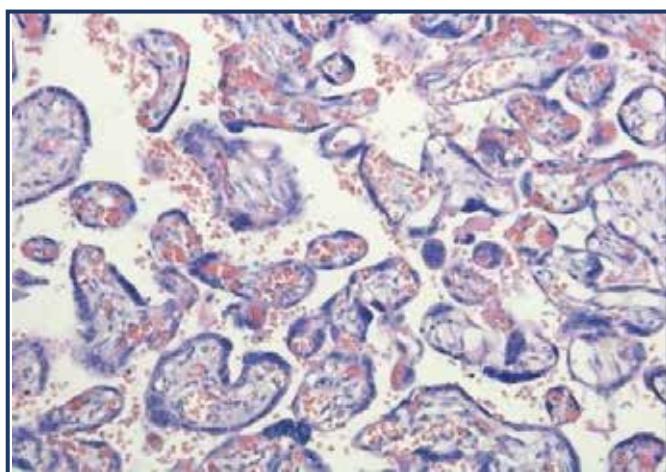


Рис. 4. Многочисленные специализированные терминальные ворсины с широкими синусоидами, синцитиальными почками. Н&Е, ув. об. х20.

Среди плацент группы 3 напротив часто выявлялась картина преобладания неразветвляющего ангиогенеза (70,6% наблюдений). При данном морфотипе ворсинчатое древо преимущественно представлено длинными, узкими ворсинами с плотной стромой, а межворсинчатое пространство значительно расширено. Концевые ветви ворсинчатого дерева преимущественно представлены промежуточными дифференцированными ворсинами с единичными сосудами. Узкие немногочисленные капилляры отмечались преимущественно в центральной части ворсин, что снижает возможность диффузии кислорода и других веществ (рис. 5).

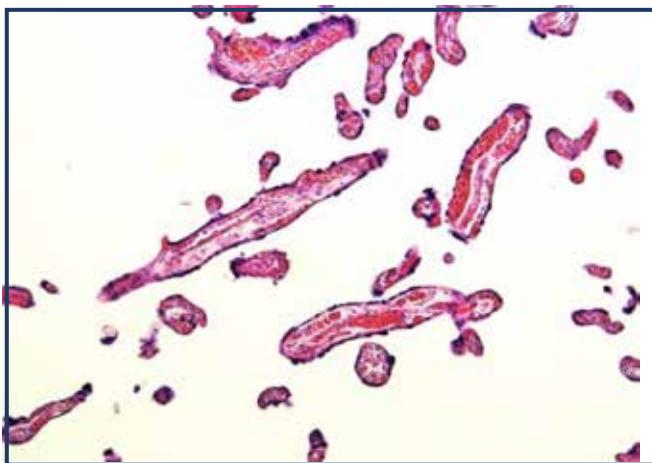


Рис. 5. Мелкие ворсины с плотной стромой, расширенное межворсинчатое пространство, картина преобладания неразветвляющего ангиогенеза. Н&Е, ув. об. х 20.

Преобладание неразветвляющего ангиогенеза в плацентарной ткани всегда ассоциировалось с развитием тяжелой плацентарной недостаточности, клинически проявляющейся в синдроме ЗРП и преэклампсии. Учитывая данную клинико-морфологическую параллель, важно отметить, что данный морфотип в группе 1 отмечен только в 6,0%, в группе 2 – в 28,6%, в группе 3 – 70,6% ($p \leq 0,05$ при сравнении групп 1 и 2 с группой 3).

Морфометрический анализ подтвердил полученные при гистологическом изучении данные. Удельная площадь ворсин достоверно различалась между всеми тремя группами при попарном сравнении и составила в группе 1 – $0,69 \pm 0,07$, в группе 2 – $0,63 \pm 0,08$, в группе 3 – $0,53 \pm 0,09$. Значения удельной

площади межворсинчатого пространства подчинялись обратной зависимости. Наибольший показатель выявлен в группе 3 (НМГ со II или III триместра) – $0,43\pm0,1$, наименьший в группе 1 (НМГ с прегравидарного этапа) – $0,28\pm0,07$. Сочетание высокой удельной площади ворсин и низкой площади межворсинчатого пространства говорит о наиболее разветвленном ворсинчатом древе плаценты при проведении прегравидарной подготовки.

При оценке сосудистой сети плаценты путем компьютерной морфометрии на уровне терминальных ворсин выявлено, что удельная площадь сосудов была наибольшей в группе 1 (прегравидарная подготовка) $0,13\pm0,04$, а в группе 2 (НМГ с I триместра) - $0,11\pm0,04$, в группе 3 (НМГ со II/III триместра) - $0,88\pm0,03$. При попарном сравнении групп достоверные различия ($p=0,025$) выявлены только между группой 1 и группой 3.

По результатам полуколичественного анализа доля патологических изменений в плацентарной ткани достоверно различалась между всеми тремя группами (критерий Манна-Уитни), и была наибольшей в группе 3 (НМГ со II или III триместра, $1,63\pm0,04$) и наименьшей в группе 1 (прегравидарная подготовка, $0,78\pm0,18$). Гемодинамические нарушения в плацентарной ткани были представлены тромбозами в межворсинчатом пространстве, инфарктами плаценты, тромбозами и стазами в сосудах ворсин. Все данные маркеры преимущественно отмечались в плацентах группы 3. Так агрегация эритроцитов в межворсинчатом пространстве встречалась в плацентах группы 3 в большинстве (76,5%) наблюдений и сочеталась с выраженными нарушениями гемодинамики в маточных артериях. Тромбозы и стазы сосудов ворсин также чаще наблюдались в группе 3 в сравнении с группами 1 и 2 (70,6% против 16,7% и 28,6% соответственно, $p=0,001$ и $p=0,01$). Подобное влияние антикоагулянтной терапии на строение плаценты описано и в других работах [Дробинская А.Н., 2014, FrancoC., 2011] хотя авторы рассматривали НМГ только в рамках коррекции тромбофилии у беременных.

В результате проведенного патологоанатомического исследования показано, что назначение НМГ с прегравидарного этапа или I триместра

беременности приводит к нормальному формированию ворсинчатого древа, преобладанию разветвляющего ангиогенеза, развитой сосудистой сети плаценты. В свою очередь данная морфологическая картина говорит о высокой диффузионной способности плаценты, что приводит к большей массе новорожденного.

По результатам проведенного анализа уровень иммуногистохимической экспрессии VEGF-A в группах 1 и 2 в плацентарной ткани в подавляющем большинстве наблюдений (89,0% и 90,0% соответственно) отмечалась выраженная или умеренная экспрессия. Напротив, при назначении НМГ только со II или III триместра гестации (группа 3) в плацентарной ткани в 76,5% отмечена слабая или отрицательная экспрессия VEGF-A (рис. 6).

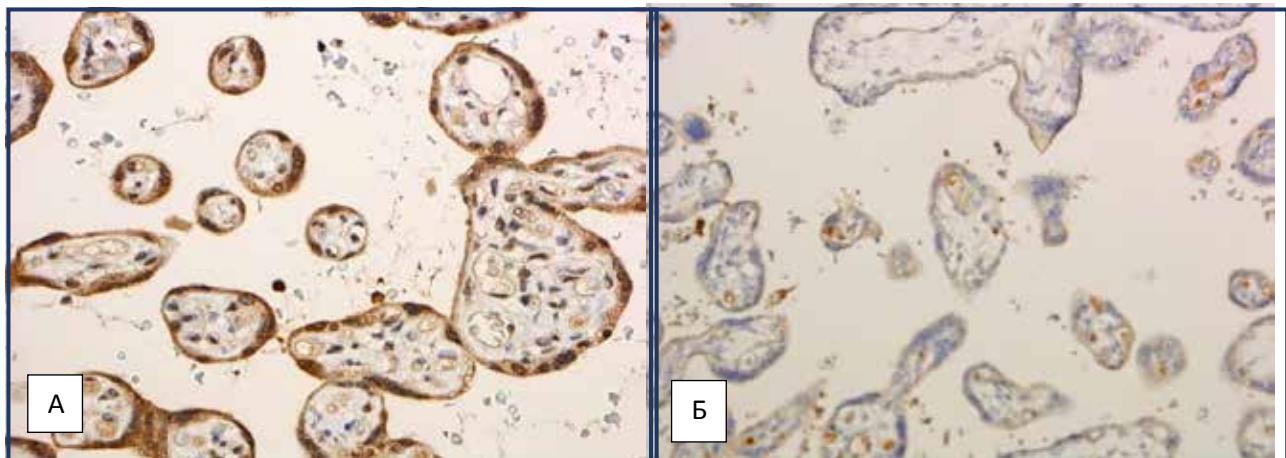


Рис. 6. Экспрессия VEGF-A в эндотелии сосудов и синцитиотрофобласте ворсин. Ув. об. X 40.

А – выраженная экспрессия;

Б – слабая экспрессия.

Впервые показано, что профилактическое назначение НМГ во время беременности влияет на уровень экспрессии VEGF-A в плацентарной ткани, что приводит к преобладанию разветвляющего ангиогенеза в плаценте. По данным нашего исследования уровень экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста в плацентарной ткани коррелирует с удельной площадью ворсин плаценты (коэффициент корреляции Спирмена 0,51, средняя сила корреляции) степенью васкуляризации ворсин (коэффициент корреляции средней силы

0,48). Как следствие, уровень экспрессии VEGF-A коррелирует и с развитием и степенью тяжести таких осложнений беременности как преэклампсия и ЗРП. На третьем этапе исследования проводилась оценка вклада полиморфизмов гена VEGF в развитие осложнений беременности, ассоциированных с плацентарной недостаточностью (ЗРП, преэклампсия, антенатальная гибель плода, ПОНРП). Было исследовано 80 образцов венозной крови: 40 – основной группы (пациентки с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе) и 40 – контрольной группы (здоровые повторнородящие женщины с физиологическим течением беременности). Исследовались 4 полиморфных маркера гена VEGFA: C(-2578)A (rs699947), C(-936)T (rs3025039), G(-634)C (rs2010963), G(-1154)A (rs1570360) в 80 образцах венозной крови методом ПЦР в реальном времени.

Исследуемые группы не различались по частоте генотипов изученных однонуклеотидных полиморфизмов гена VEGF-A: ни один из предполагаемых маркеров не ассоциирован с развитием плацентарной недостаточности. Нарушение экспрессии VEGF-A при плацентарной недостаточности не связано с каким-либо из минорных полиморфизмов его гена, а недостаточность данного фактора роста при осложнениях беременности является вторичной.

ВЫВОДЫ

- 1)Профилактическое назначение НМГ пациенткам группы высокого риска преэклампсии, ЗРП, ПОНРП позволяет снизить частоту повторного развития плацента-ассоциированных осложнений.
- 2)Эффективность НМГ зависит от срока назначения препаратов: прегравидарная подготовка снижает частоту и тяжесть плацента-ассоциированных осложнений; применение с I триместра, существенно не влияя на частоту осложнений, снижает развитие тяжелых форм; терапия со II/III триместра малоэффективна.
- 3)Применение НМГ и ацетилсалicyловой кислоты с прегравидарного этапа/I триместра более эффективно в профилактике тяжелой формы преэклампсии, чем монотерапия НМГ.

- 4) Профилактическое назначение антикоагулянтов способствует формированию разветвленного ворсинчатого древа и капиллярной сети плаценты, наиболее выраженному при прегравидарном назначении НМГ. Срок начала терапии коррелирует с удельной площадью ворсин и сосудисто-стромальным соотношением (коэффициенты корреляции 0,51 и 0,48 соответственно).
- 5) Профилактическое назначение НМГ с прегравидарного этапа/I триместра беременности способствует выраженной или умеренной экспрессии VEGF-A. Минорные аллели VEGF (G(-1154)A, C(-2578)A, C(-936)T, G(-634)C) не являются факторами риска плацента-ассоциированных осложнений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наличии у пациентки в анамнезе ранней преэклампсии, ЗРП II-III степени, ПОНРП показано проведение терапии профилактическими дозами НМГ с прегравидарного этапа вне зависимости от наличия врожденной и/или приобретенной тромбофилии и показателей гемостазиограммы (за исключением гипокоагуляции). В случае невозможности назначения НМГ с прегравидарного этапа показано назначение терапии с наиболее раннего срока гестации – с момента первой явки.
2. При наличии у пациентки в анамнезе тяжелой ранней преэклампсии профилактику повторного развития данного осложнения целесообразно проводить комплексной терапией препаратами аспирина и НМГ.
3. Рутинное обследование пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе на полиморфизмы гена VEGF-A не целесообразно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ларина, Е.Б. Применение низкомолекулярных гепаринов для профилактики плацентарной недостаточности: клинико-морфологические параллели / Ларина Е.Б., Олейникова Н.А., Ревина Д.Б. и др. // Клиническая фармакология и терапия. — 2017. — Т. 26, № 1. — С. 35–40.
2. Ларина, Е.Б. Использование низкомолекулярных гепаринов в профилактике плацентарной недостаточности / Ларина Е.Б., Лозинская Д.Б., Бугеренко Е.Ю.,

Панина О.Б. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2016. — Т. 15, № 5. — С. 32–37.

3. Ларина, Е.Б. Роль системы урокиназного активатора плазминогена в развитии плаценты и патогенезе плацентарной недостаточности / Лозинская Д.Б., Балацкий А.В., Ларина Е.Б. и др.// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2017. — Т. 16, № 3. - С. 61–67.

4. Ларина, Е.Б. Перинатальные исходы при беременности, осложненной задержкой роста плода / Мамедов Н.Н., Ларина Е.Б., Алексеенкова М.В. и др.// Врач-аспирант. — 2013. — № 5. — С. 356-364.

5. Ларина, Е.Б. Синдром задержки роста плода: клинико-морфологические параллели / Ларина Е.Б., Мамедов Н.Н., Нефедова Н.А. и др.// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2013. — № 1. — С. 22-27.