

**РЕВИНА ДАРЬЯ БОРИСОВНА**

**ПЛАЦЕНТА-АССОЦИИРОВАННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ  
БЕРЕМЕННОСТИ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БЕЛКОВ  
СИСТЕМЫ УРОКИНАЗЫ**

**3.1.4. Акушерство и гинекология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**МОСКВА – 2022**

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Панина Ольга Борисовна**

**Научный консультант:**

Кандидат медицинских наук

**Балацкий Александр Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинский наук, профессор

**Игнатко Ирина Владимировна**

член-корреспондент РАН

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии, профессор

доктор медицинский наук, профессор

**Цахилова Светлана Григорьевна**

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, профессор

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2022 г в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.08 на базе ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

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

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор  **Хашукоева Асият Зульчифовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Плацента-ассоциированные осложнения беременности (задержка роста плода (ЗРП), преэклампсия и эклампсия) и сопутствующая им плацентарная недостаточность относятся к основным причинам материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. В основе плацента-ассоциированных осложнений беременности лежит аномальное формирование плаценты, дальнейшее снижение способности плаценты поддерживать адекватный обмен между организмом матери и плода, развитие дисбаланса вазоактивных факторов и системная эндотелиальная дисфункция у матери [Савельева Г.М., 1991; Smith G. C. S., 2010].

Гипертензивные расстройства беременности, включающие преэклампсию и эклампсию, занимают 3-е место в структуре материнской смертности в России и в мире и являются причиной смерти 76 000 женщин и 500 000 новорожденных ежегодно [Say L., 2014; Poon L. C., 2019; Коноплянников А. Г., 2020]. Наличие преэклампсии в анамнезе повышает риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета и снижает ожидаемую продолжительность жизни [Theilen L. H. et. al., 2018].

ЗРП приводит к повышению перинатальной смертности более чем в 8 раз. И ЗРП, и преэклампсия являются причинами индуцированных преждевременных родов. К отдаленным последствиям недоношенности и внутриутробной гипоксии при ЗРП и преэклампсии относятся нарушения нервно-психического развития, отклонения массо-ростовых показателей от нормы, сердечно-сосудистые заболевания, метаболические нарушения во взрослом возрасте [Osmond C. et. al., 2000; von Beckerath A.-K. et. al., 2013].

Выделение группы высокого риска плацента-ассоциированных осложнений, проведение прегравидарной подготовки и выбор адекватной тактики ведения беременности – это основа эффективной профилактики неблагоприятных перинатальных исходов при плацента-ассоциированных осложнениях.

Наличие в анамнезе преэклампсии, ЗРП является фактором риска их развития и в последующую беременность. Кроме того, неблагоприятное прогностическое значение имеет наличие семейного анамнеза плацента-ассоциированных осложнений беременности. Это, а также широкая распространенность в популяции, полиморфизм клинических проявлений по сроку возникновения и степени выраженности, свидетельствует в пользу того, что плацента-ассоциированные осложнения беременности являются

мультифакториальными заболеваниями: их этиология представляет собой реализацию генетических особенностей организма в условиях внешней среды.

В связи с этим изучение клинико-генетических ассоциаций является перспективной и обоснованной стратегией для поиска факторов риска развития плацента-ассоциированных осложнений. Не вызывает сомнения, что следует проводить поиск генетических факторов риска в том числе среди генов белков, задействованных в процессе плацентации: преэклампсия, ЗРП являются прямым следствием нарушения миграции и недостаточной инвазии клеток цитотрофобласта. К таковым относятся гены белков урокиназной системы, состоящей из урокиназы (uPA), ее рецептора (uPAR). Кроме того, в условиях растущей популярности и все более широкого использования методов изучения фетальной ДНК, актуальным является изучение вклада не только генетических маркеров матери, но и плода.

### **Степень разработанности темы исследования**

Отнесение в группу высокого риска плацента-ассоциированных осложнений возможно при наличии одного или нескольких из следующих факторов: возраст матери 35 лет и более, наличие в анамнезе преэклампсии или ЗРП, наступление беременности при помощи вспомогательных репродуктивных технологий, ожирение, наличие экстрагенитальных заболеваний, в том числе анемии, сахарного диабета, семейный анамнез и принадлежность к определенным народностям и расам [Боровкова Е. И. и соавт., 2011; Ananth S. V. et. al., 2011; Kenny L. S. et. al., 2014; Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2018; Шахбазова Н. А. и соавт., 2018;].

Широко распространены способы определения риска развития ЗРП и преэклампсии, с использованием различных комбинаций анамнестических факторов и показателей среднего артериального давления матери, пульсационного индекса в маточных артериях, уровня сывороточного фактора роста плаценты (PIGF), ассоциированного с беременностью протеина-А плазмы. Данные диагностические алгоритмы используются с 11 по 13 неделю, то есть уже после завершения первой волны инвазии трофобласта. Частота выявления ранней и поздней преэклампсии с использованием перечисленных показателей для европеоидной расы и точке отсечения 1:100 составляет 69% и 40% соответственно, таким образом, предложенные алгоритмы не являются абсолютными и окончательно отработанными [Шалина Р.И. и соавт., 2020; Roop L. S. et. al., 2019]. Наиболее точные способы прогнозирования ЗРП основываются на определении уровня различных ангиогенных факторов, в том числе PIGF, и имеют чувствительность около 38% и специфичность 71% [Gaccioli F. et. al., 2018]. В настоящее время поиск новых факторов риска и

способов прогнозирования развития плацента-ассоциированных осложнений продолжается.

Выявление носительства генетических полиморфизмов (SNP, single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм) матерью является перспективным подходом для определения риска развития акушерской патологии на этапе планирования беременности и ее ранних сроках. В качестве прогностических факторов патологической плацентации рассматриваются полиморфизмы генов системы свертывания, ангиогенеза, регуляции сосудистого тонуса и др. [Stonek F. et al., 2008; Song G. G. et al., 2013; Rodger M. A. et al., 2010; Andraweera P.H. et al., 2012; Said J. M. et al., 2012; Халфорд-Князева И.П. и соавт., 2013; Morgan J. A. et al., 2013;]. Тем не менее, накопленные данные нередко являются противоречивыми, в связи чем исследование генетических факторов риска плацента-ассоциированных осложнений продолжает быть актуальным.

### **Цель исследования**

Оценить роль полиморфизмов генов белков системы урокиназы в развитии плацента-ассоциированных осложнений беременности.

### **Задачи исследования**

1. Определить у пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности (преэклампсия и задержка роста плода) частоту полиморфизмов генов белков системы урокиназы.
2. Исследовать у новорожденных детей пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности (преэклампсия и задержка роста плода) частоту полиморфизмов генов белков системы урокиназы.
3. Провести оценку сочетанного влияния полиморфизмов генов белков системы урокиназы матери и плода на риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности.
4. Оценить иммуногистохимическую экспрессию в ткани плаценты белков системы урокиназы при плацента-ассоциированных осложнениях и при нормальном течении беременности.
5. Изучить влияние полиморфизмов генов белков системы урокиназы на строение ворсин плаценты и степень их васкуляризации.

### **Научная новизна**

Прогностическая значимость ряда генетических маркеров (в гене урокиназы *PLAU* – rs4065 (C/T 3'-UTR) и rs2227564 (P141L), в гене ее

рецептора *PLAUR* – rs344781 (T(-516)C) и rs2302524 (A659G)) впервые была оценена в рамках акушерской патологии.

В результате проведенного анализа выявлена ассоциация материнского полиморфизма гена урокиназы *PLAU* rs4065 и полиморфизма гена ее рецептора *PLAUR* rs2302524 с развитием плацента-ассоциированных осложнений: прогностически неблагоприятным является наличие генотипа CC/CT и AA, соответственно. Негативное влияние также продемонстрировано для генотипа CC *PLAU* rs4065 и CC *PLAUR* rs344781 плода. По данным многофакторного анализа наибольший вклад в развитие плацента-ассоциированных осложнений вносит именно наличие однонуклеотидных замен у плода.

Кроме того, был применен подход, оценивающий не только влияние SNP на факт развития или отсутствия заболевания, но и их связь с патологическими изменениями в плаценте. Так, материнский генотип CC гена *PLAU* C/T 3'-UTR ассоциирован со снижением степени васкуляризации ворсин хориона, для генотипа TT, наоборот, характерно нормальное строение сосудистого русла плаценты.

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

Результаты проведенной работы дополняют патогенетическую картину развития плацента-ассоциированных осложнений беременности – плацентарной преэклампсии и ЗРП: изучен вклад генетических модификаций *uPA* и *uPAR* в процессы аномальной плацентации, ангиогенеза, проведен анализ уровней экспрессии белков при наличии плацента-ассоциированных осложнений и в норме.

На основании полученных данных определены дополнительные факторы риска плацента-ассоциированных осложнений беременности: генотип матери CC-CT *PLAU* rs4065 и AG-GG *PLAUR* rs2302524, генотип плода CC *PLAU* rs4065 и CC *PLAUR* rs344781. Определение данных генетических маркеров позволит своевременно начать прегравидарную подготовку и целенаправленное пренатальное наблюдение, оптимизировать профилактику данных состояний. Кроме того, согласно полученным результатам, преэклампсия и ЗРП имеют одни и те же генетические факторы риска, что подтверждает представления о едином патогенезе данных осложнений и необходимости одинаковых профилактических мероприятий.

В ходе настоящего исследования разработан способ прогнозирования развития плацента-ассоциированных осложнений и плацентарной недостаточности (патент №2703463) при помощи определения генетических маркеров плода в фетальной ДНК крови матери, методика компьютерной автоматической микроморфометрии в плаценте, компьютерной автоматической

количественной оценки интенсивности иммуногистохимической экспрессии в плаценте.

### **Методология и методы исследования**

Работа проводилась в формате продольного ретроспективного исследования типа случай-контроль с использованием наблюдения, сравнения, измерения данных, полученных клиническими, лабораторными методами, с соблюдением принципов доказательной медицины и этических принципов Хельсинкской декларации.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Плацента-ассоциированные осложнения беременности, а именно прэклампсия и ЗРП, являются мультифакториальными заболеваниями, в развитие которых, помимо факторов внешней среды, вносят свой вклад генетические полиморфизмы матери и плода. С развитием плацента-ассоциированных осложнений беременности ассоциированы генотип матери *CC PLAUC/T 3'-UTR* и генотип *AA PLAU A(659)G* и генотип плода *CC гена PLAUC/T 3'-UTR* и *CC PLAU T(-516)C*.
2. При единовременной оценке материнских и фетальных генетических маркеров наиболее значимым является наличие у плода генотипа *CC гена PLAUC/T 3'-UTR*. Определение наличия однонуклеотидных замен у плода является более релевантным.
3. Ассоциация генетических полиморфизмов с развитием плацента-ассоциированных осложнений обусловлена их влиянием на развитие ворсинчатого древа и строение сосудистой сети плаценты.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством включенных в исследование наблюдений, использованием оператор-независимых методов оценки, адекватной размеру и структуре выборки статистической обработкой. Статистическая обработка данных, объединенных в таблицы формата .xls при помощи программы Microsoft Office Excel® 2007, проводилась в программе Statistica 12, веб-программы SNP Stats.

### **Апробация диссертации**

Основные положения научно-исследовательской работы доложены и обсуждены на: XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (21–24 января 2019 года, Москва); XXI Всероссийском научно-образовательном

форуме «Мать и дитя» (28-30 сентября 2020 года, Московская область), Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (18–20 февраля 2021 года, Санкт-Петербург).

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры акушерства и гинекологии Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, сотрудников отдела репродуктивной медицины Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, сотрудников кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, сотрудников ГБУЗ ЦПСиР ДЗМ (протокол №2 от 16 сентября 2021 года).

### **Личный вклад автора**

Автором был создан дизайн исследования, собраны и обработаны большинство образцов биоматериалов, клинических данных, сформирована база данных, проведен статистический анализ и интерпретация полученных результатов. Написание и оформление основных публикаций по теме диссертации также выполнено автором.

### **Соответствие диссертации паспорту научной деятельности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3, 4 паспорта специальности «Акушерство и гинекология».

### **Реализация и внедрение результатов работы в практическое здравоохранение**

Результаты исследования внедрены и реализуются в работе ГБУЗ ЦПСиР ДЗМ и Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова.

### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 – в Scopus, в 3 тезисах докладов на международных и российских конференциях, а также в 1 патенте на изобретение, зарегистрированном в Государственном реестре РФ.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 135 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, главы, содержащей собственные результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 24 таблицами. Список литературы содержит 188 источников, из них отечественных – 25, зарубежных – 163.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Настоящая работа выполнена в период с 2015 по 2020 гг. на клинической базе кафедры акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова (зав. кафедрой – д.м.н., профессор О.Б. Панина), в ГБУЗ «Центр планирования семьи и репродукции ДЗМ» (главный врач – О.А. Латышкевич), в отделе лабораторной диагностики (руководитель – к.м.н., доцент Л.М. Самоходская) и отделе клинической патологии МНОЦ МГУ (руководитель – д.м.н., доцент П.Г. Мальков) Медицинского научно-образовательного центра ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа проводилась в формате продольного ретроспективного исследования типа случай-контроль. *Критерии включения в основную группу:* наличие плацента-ассоциированных осложнений (преэклампсии и/или ЗРП) в настоящую беременность и/или в анамнезе. *Критерии включения в контрольную группу:* неотягощенный акушерско-гинекологический анамнез, физиологическое течение беременности и родов, благоприятный перинатальный исход. *Критерии исключения:* тяжелая экстрагенитальная патология, гестационный сахарный диабет, многоплодная беременность, Rh-сенсбилизация, гемолитическая болезнь плода, внутриутробная инфекция, врожденные пороки развития и генетические аномалии плода, наркомания, табакокурение.

Биологический материал был собран у 156 пациенток и 78 новорожденных детей непосредственно после завершения родов. После выписки пациентов из стационара проводился анализ историй родов, амбулаторных карт и историй развития новорожденных.

Настоящее исследование включало в себя три этапа.

Первый этап (клинический) имел традиционный для клинико-генетических исследований формат. Была сформирована основная группа – группа плацента-ассоциированных осложнений (группа ПАО), состоящая из 66 человек, и контрольная группа, состоящая из 121 человека. В группе ПАО у 14

пациенток (21,21%) была выявлена преэклампсия, из них у 5 – тяжелая преэклампсия (35,7%), ЗРП – у 25 (37,88%), в том числе пациентки с размерами плода менее 3 перцентиля – 19 (76%), сочетание преэклампсии и ЗРП зафиксированы у 27% (40,9%). Путем анализа клинических данных был выявлен ряд традиционных факторов риска плацента-ассоциированных осложнений, которые было необходимо учесть на этапе оценки риска развития плацента-ассоциированных осложнений в зависимости от генотипа. При сборе анамнестических данных особое внимание было уделено поиску факторов риска развития плацента-ассоциированных осложнений: возраст пациенток более 35 лет, наличие экстрагенитальных заболеваний, нарушений жирового обмена, гинекологических заболеваний (в особенности – внутриматочной патологии) и проведенные по поводу них оперативные вмешательства, паритет, невынашивание беременности, его срок и причина, наличие в анамнезе преэклампсии и ЗРП, преждевременной отслойки нормально-расположенной плаценты (ПОНРП), антенатальной гибели плода на фоне плацентарной недостаточности. При изучении течения настоящей беременности проводился анализ частоты плацента-ассоциированных осложнений (ЗРП, преэклампсия, ПОНРП, антенатальная гибель плода) и связанных с ним состояний (нарушения кровообращения в системе «мать-плацента-плод», маловодие), срок их возникновения и степень тяжести. При анализе перинатального исхода учитывался срок родов и способ родоразрешения (самопроизвольные роды через естественные родовые пути/оперативное родоразрешение, вид операции), при наличии оперативного родоразрешения - показания к нему, состояние новорожденного сразу после рождения (масса при рождении, оценка по шкале Апгар) и течение его раннего неонатального периода (необходимость перевода в отделение интенсивной терапии и реанимации и далее на второй этап выхаживания, необходимость в дыхательной поддержке и ее тип).

На втором этапе методом полимеразной цепной реакции было проведено генетическое исследование ДНК, полученной из крови и пуповины, на наличие следующих SNP: C/T 3'-UTR (rs4065), C/T 7240 (rs2227564) гена *PLAU*, T(-516)C (rs344781), A659G (rs2302524) гена *PLAUR*, -675 5G/4G гена *SERPINE-1* (rs1799768), и проведена оценка частот генотипов у пациенток и их новорожденных в основной и контрольной группе. Таким образом были определены генетические полиморфизмы генов белков урокиназной системы, влияющие на риск развития плацента-ассоциированных осложнений.

Третий этап (морфологический) включал в себя проведение гистологического исследования (в том числе, автоматической морфометрии и исследования интенсивности экспрессии урокиназы и ее рецептора при помощи иммуногистохимии) 46 плацент пациенток вошедших в первый и второй этап

исследования (16 плацент пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями, 31 плацента пациенток контрольной группы). Для каждого образца путем анализа микрофотографий определяли площадь сосудов ворсин, площадь межворсинчатого пространства, площадь сосудов ворсин, сосудисто-стромальное соотношение, интенсивность иммуногистохимической экспрессии урокиназы и ее рецептора.

Наконец, данные клинического, генетического и морфологического этапов были сопоставлены между собой для выявления генетических факторов риска развития плацента-ассоциированных осложнений и их патоморфологического обоснования.

**Статистический анализ** выполняли с использованием программы Statistica 12 и веб-версии SNP Stats, разработанной для анализа исследований генетического полиморфизма генов [Solé X. et al., 2006].

Отличие распределения непрерывных переменных от нормального определяли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для признаков, характеризующихся нормальным распределением, указывали число наблюдений, среднее значение признака, среднее квадратичное отклонение. Для признаков, характеризующихся распределением отличным от нормального, дополнительно определяли медиану, 95%-й доверительный интервал. При сравнении групп в зависимости от вида распределения и числа групп использовали t-тест, критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса. Категориальные переменные оценивали при помощи  $\chi^2$ -теста Пирсона,  $\chi^2$ -тест Пирсона с поправкой Йетса, тест Спирмена.

В работе также приведены отношения шансов (ОШ) возникновения тех или иных признаков. Для построения 95%-х доверительных интервалов (95%ДИ) и точечной оценки ОШ применяли модель однофакторной бинарной логистической регрессии. ОШ считался статистически значимым, если 95%ДИ не включал единицу.

Для исследования веса и статистической значимости отдельных генотипов использовали логистическую регрессию. Для описания полученной при многофакторном анализе модели использовали точное значение p-уровня значимости для модели в целом, значение свободного члена, регрессионных коэффициентов и точных значений p-уровня значимости для каждого из них для каждого независимого признака.

Статистически достоверными считали результаты при  $p < 0,05$ , при множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони: значимыми считали только те результаты, для которых  $p < 0,05/n$ , где  $n$  – количество независимых статистических тестов.

### Результаты исследования и их обсуждение

По нашим данным средний возраст был выше в группе ПАО и составил  $32,21 \pm 5,12$  год (в контрольной группе –  $30,49 \pm 5,46$  лет), доля пациенток старше 35 лет составила 27,78% (в контрольной группе – 19,83%). Пациентки группы ПАО были достоверно старше пациенток контрольной группы ( $p = 0,04$ ), различия в доле пациенток старше 35 лет были статистически незначимыми ( $p = 0,23$ ). Эти данные согласуются с общепринятым в зарубежном и отечественном медицинских сообществах мнением о том, что с увеличением возраста матери риск развития плацента-ассоциированных осложнений, преэклампсии, ЗРП повышается [Акушерство: национальное руководство, 2019; Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, 2020].

Группы и подгруппы значимо не различались между собой по показателю индекса массы тела, хотя в группе ПАО доля пациенток с избыточной массой тела, была больше (24,24% против 11,57%), что также соответствует современным представлениям о нарушениях жирового обмена, как о факторе риска плацента-ассоциированных осложнений беременности [Боровкова Е. И. и соавт., 2011].

Несмотря на то, что тяжелая соматическая патология до беременности служила критерием исключения из исследования, нами были выявлены различия в частоте и структуре заболеваемости между пациентками группы ПАО и контрольной группой. Выявленная в группе с плацента-ассоциированными осложнениями беременности более высокая частота сердечно-сосудистых заболеваний (хроническая артериальная гипертензия – 10,6% против 0,83%, в контрольной группе, ангиопатия сетчатки – 10,6% против 0%, тромботические осложнения – 3,03% против 0%) подтверждает связь плацента-ассоциированных осложнений с системной эндотелиальной дисфункцией у матери и ее последствиями – системными или органными нарушениями кровообращения, дисрегуляцией сосудистого тонуса и аномалиями реологических свойств крови [Oben J. et. al., 2014]. Плацентарная недостаточность также является своеобразным локальным проявлением нарушения гемодинамики, для которого областью скомпроментированного кровоснабжения является межворсинчатое пространство. Таким образом, плацента-ассоциированные осложнения беременности – это не следствие наличия сердечно-сосудистой патологии, это части одного и того же патологического процесса, в основе которого лежит реализация наследственного фактора в условиях внешней среды. В пользу этого, свидетельствует и тот факт, что отдаленный прогноз первично здоровых женщин, перенесших преэклампсию и ЗРП во время беременности,

характеризуется повышенной частотой развития ишемической болезни сердца, инсультов [Amaral L. M. et. al, 2015]. Дети этих матерей также чаще подвержены развитию сердечно-сосудистых заболеваний [Артымук Н. В. и соавт., 2013; Barker D. J. et. al., 1993].

Закономерной также является достоверно более высокая частота анемии в группе ПАО (37,88% против 18,18% в контрольной группе). Статистически достоверная разница в частоте анемии беременных между основной и контрольной группами подтверждает ее значимость как прогностически неблагоприятного фактора в плане развития плацента-ассоциированных осложнений [Tandu-Umba B. et al., 2015; Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2018]. Анемия матери и последующая долговременная гемическая гипоксия в межворсинчатом пространстве приводит к нарушению развития сосудистого дерева плаценты по типу избыточного разветвляющего ангиогенеза [Benirschke K. et. al, 2006].

Группа ПАО также характеризовалась высокой частотой гинекологических заболеваний: только 62,12% не имели заболеваний женской половой системы (в контрольной группе – 84,3%), достоверными были различия в частоте миомы матки ( $p = 0,04$ ). Также необходимо отметить, что у пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности частота бесплодия была выше ( $p = 0,0041$ ), чем у пациенток контрольной группы. Вероятно, более высокая частота гинекологических заболеваний, в том числе, бесплодия, обусловлена возрастными различиями между группами. Тем не менее, существует точка зрения, что как успех наступления, так и течения беременности, также определяется наличием в генотипе женщины тех или иных аллельных вариантов генов, которые значимы и для процессов оплодотворения, и для имплантации, и для плацентации [Самоходская Л.М. и соавт., 2009; Самоходская Л.М. и соавт., 2011). Таким образом, бесплодие и плацента-ассоциированные осложнения также могут иметь общие первопричины.

Помимо частоты гинекологических заболеваний, в каждой группе мы оценили частоту выскабливаний матки как фактора риска «скомпроментированного» эндометрия. Общепризнанной является роль состояния эндометрия в генезе плацента-ассоциированных осложнений беременности: неполноценный эндометрий может служить стартовой точкой осложнений беременности [Gunnarsdottir J. et. al, 2014]. Среди приобретённых причин повреждения эндометрия особое значение имеют травмы матки при остром кюретаже, присоединение воспалительных осложнений [Шестакова И. Г. и соавт., 2014; Озолия Л.А. и соавт., 2021]. Частота выскабливания матки в анамнезе в группе ПАО и контрольной группе была сопоставимой – до

наступления настоящей беременности кюретаж проводился хотя бы один раз у 40,9% пациентов группы ПАО и у 36,36% пациентов контрольной группы. Однако, если в контрольной группе основным поводом для проведения выскабливания был искусственный аборт, проводимый по желанию пациентки, в группе ПАО основной причиной для внутриматочного вмешательства служила неразвивающаяся беременность. Различия по количеству неразвивающихся беременностей в анамнезе (29,09% в группе ПАО против 6,93% в контрольной группе), а также частоте привычного невынашивания (14,28% против 4%) были статистически значимыми. Данная закономерность также была подтверждена в ряде исследований, а их авторами было высказано предположение, что нарушение имплантации и плацентации – это общий этап патогенеза привычного невынашивания беременности и осложнений беременности, связанных с плацентарной недостаточностью [Сидельникова В. М. и соавт., 2005; Brosens I. et. al, 2011; Меньшенина Т. А. и соавт., 2012; Sepidarkish M. et. al, 2017].

При сравнительном анализе течения настоящей беременности были выявлены достоверные различия в частоте маловодия (56,06% – в группе ПАО, 4,13% – в контрольной группе), что соответствует современным представлениям о маловодии, как о прямом следствии снижения скорости мочеобразования у плода в условиях ухудшения кровообращения в системе «мать-плацента-плод» и гипоксии. Кроме того, соответствует критериям включения в основную группу высокая частота в ней экстренных оперативных (48,48%), в том числе, преждевременных (36,36%), родов. Большинство преждевременных родов были индуцированными по показаниям со стороны матери и/или плода. Состояние почти 50% новорожденных требовало оказания неотложной помощи в раннем неонатальном периоде в связи с недоношенностью, гипотрофией и антенатальным воздействием гипоксии на фоне плацентарной недостаточности.

Таким образом, в ходе клинической характеристики включенных в исследование пациенток и их новорожденных, во-первых, было подтверждено соответствие групп критериям включения и исключения, во-вторых, подтверждена связь между «большими акушерскими синдромами», а также ими и некоторыми экстрагенитальными и гинекологическими заболеваниями, в-третьих, были выявлены традиционные факторы риска, которые было необходимо учесть при анализе вклада генетических маркеров в развитие плацента-ассоциированных осложнений беременности.

По результатам второго этапа настоящего исследования, при оценке распределения генотипов среди пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности, нами отмечена достоверно более высокая частота

генотипов СС и СТ rs4065 (С/Т 3'-UTR) гена урокиназы, более низкая – генотипов АG-GG rs2302524 (А659G) гена урокиназного рецептора.

При совместной оценке клинических и генетических факторов, все полиморфизмы, значимость которых была выявлена первоначально, сохранили свою прогностическую значимость. Риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности при генотипе СТ rs4065 (С/Т 3'-UTR) превышает таковой при генотипе ТТ в 4,28 раз, при генотипе СС – в 16,71 раз. Риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности при генотипе АG/GG rs230254 ниже, чем при генотипе АА – в 3,125 раз.

Значимость генотипа rs4065 гена *PLAU* как фактора риска также была подтверждена для ЗРП: наличие генотипа ТТ 3'-UTR rs4065 в гене *PLAU* у матери сопровождается снижением риска развития ЗРП в 4,87 раза. При этом, в отсутствие ЗРП не только чаще встречается генотип ТТ, но и случаи ЗРП при данном генотипе характеризуются более поздним началом отставания фетометрических показателей от гестационной нормы. Аналогичные данные были получены для преэклампсии: замена С/Т 3'-UTR гена *PLAU* rs4065 снижает риск развития преэклампсии в 2,15 раза, свое протективное влияние в плане степени тяжести и срока манифестации гипертензивных осложнений беременности также подтвердил генотип ТТ.

По результатам нашего исследования масса новорожденного при условии родов на доношенном сроке, как косвенный показатель качества кровообращения в системе «мать-плацента-плод» и важнейший фактор, определяющий течение неонатального периода, также была максимальной при генотипе ТТ у матери и составила 3450 граммов (медиана, 95% ДИ 3360,15 – 3555,8,49) против 3115 граммов при генотипе СС (медиана, 95% ДИ 3072,35 – 3547,1) и против 3050 граммов при генотипе СТ (медиана, 95% ДИ 2865,28 – 3500,18).

В группе ПАО 93,02% относились к группе высокого риска в связи с наличием в анамнезе ранней и/или тяжелой преэклампсии, ЗРП. В течение беременности, исход которой учитывался в ходе настоящего исследования, данным пациенткам была назначена ацетилсалициловая кислота в низких дозах с целью профилактики. Из них 30% имели генотип ТТ *PLAU* rs4065, 70% – генотип СТ-СС. Эффективность профилактики с использованием ацетилсалициловой кислоты зависела от генотипа: профилактика была эффективна у 66% пациенток с генотипом ТТ и у 25% – с генотипом СС-СТ ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, генотип СТ-СС *PLAU* rs4065 не только увеличивает риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности, но и снижает вероятность того, что профилактические мероприятия будут эффективными.

Установлено, что для пациенток группы высокого риска по данным генетического анализа первоочередной задачей является коррекция модифицируемых факторов риска (исключение железодефицита на этапе планирования беременности, рациональная контрацепция во избежание нежелательной беременности и ее искусственного прерывания), так как проведение у них медикаментозной профилактики с применением низких доз ацетилсалициловой кислоты требует дальнейшего изучения и оптимизации.

Протективная роль в плане развития ЗРП также была доказана для замены аденина на гуанин rs2302524 *PLAUR*. Наличие генотипов GG-GA снижает риск развития ЗРП в 3,03 раза.

Далее, в ходе нашей попытки оценить риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности в зависимости от наличия однонуклеотидных замен в генах плода было показано, что наиболее высокому риску развития плацента-ассоциированных осложнений беременности также соответствует CC генотип, а наиболее низкому – TT генотип гена *PLAU* rs4065 (C/T 3'-UTR): появление генотипа TT приводит к снижению риска развития плацента-ассоциированных осложнений беременности в 3,84 раза. Также негативное влияние было продемонстрировано для мутантной гомозиготы CC гена *PLAUR* rs344781 (T(-516)C – ее наличие сопровождается увеличением риска развития плацента-ассоциированных осложнений беременности в 6,38 раз, хотя ее наличие у матери не являлось прогностически неблагоприятным.

ОШ и ДИ для генетических маркеров матери и плода и традиционных факторов риска суммированы на Рисунке 1 (отрезки обозначают ДИ, точки – ОШ).

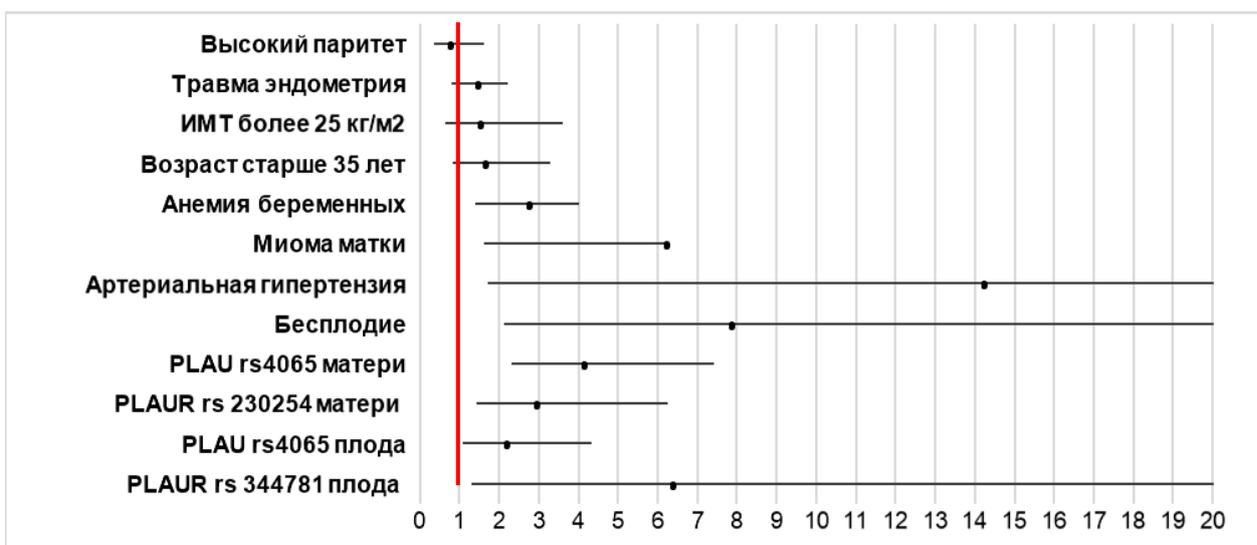


Рисунок 1 – Генетические полиморфизмы матери и плода и традиционные факторы риска плацента-ассоциированных осложнений

В дальнейшем, по результатам многофакторного анализа было показано, что более значимым является наличие аллели Т замены rs4065 именно в гене плода. За исключением редких случаев плацентарного мозаицизма генотип плаценты совпадает с генотипом плода. Таким образом, выявленные для генотипа плода закономерности можно экстраполировать на генотип плаценты – генотип клеток трофобласта, эндотелиоцитов ворсин хориона.

По полученным нами результатам можно предположить, что замена С/Т является функциональной, наличие генотипа ТТ усиливает процессы миграции и пролиферации клеток, носит проангиогенный характер, тем самым снижая риск развития плацента-ассоциированных осложнений беременности.

Это предположение подтверждает факт влияния этого полиморфизма на опухолевую прогрессию и опухолевый ангиогенеза. Существуют данные о значительном увеличении риска развития злокачественных новообразований, быстрого распространения первичной опухоли при наличии аллели Т и генотипа ТТ [Duffy M. J. et. al., 2004, Xu Z. et. al., 2015].

Вероятно, замена А на G в 6-ом экзоне (rs2302524) гена урокиназного рецептора так же, как и замена С/Т 3'-UTR в гене урокиназы, к увеличению активности соответствующего белка: наличие аллели G ассоциировано с более высокой концентрацией растворимой версии рецептора в плазме крови [Ierodiakonou D. et. al., 2016]. В плане развития плацента-ассоциированных осложнений беременности, как следствия нарушения процессов миграции и неполноценного ремоделирования спиральных артерий, более высокая концентрация урокиназного рецептора носит протективный характер, что подтверждают результаты нашего исследования: среди пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности нами была отмечена достоверно более низкая частота генотипов AG-GG rs2302524 гена урокиназного рецептора.

Замена аллели Т на мутантную аллель С в области промотора (rs344781) гена *PLAUR* провоцирует снижение экспрессии uPAR. Генетически обусловленное снижение экспрессии рецептора, как основного регулятора активности самой урокиназы, ингибирует процессы миграции и пролиферации клеток, протеолиза внеклеточного матрикса, находящиеся под контролем всего комплекса uPA-uPAR. Это подтверждают результаты ряда клинических исследований, в которых было продемонстрировано ингибирующее влияние данной мутации uPAR на развитие и скорость прогрессии злокачественных опухолей [Xu Z. et. al., 2015]. Для ранних стадий плацентации и ангиогенеза в ворсинах хориона, снижение функциональной активности урокиназного комплекса за счет уменьшения экспрессии рецептора носит негативный характер, что и было продемонстрировано в нашем исследовании: наличие у

плода генотипа CC rs344781 гена *PLAUR* ассоциировано с развитием плацента-ассоциированных осложнений беременности.

Таким образом, генетическими факторами риска плацента-ассоциированных осложнений беременности являются однонуклеотидные замены в ДНК матери и плода, приводящие к снижению функциональной активности урокиназы и ее рецептора, что соответствует современным представлениям о роли урокиназной системы в процессе плацентации в норме и о патогенезе плацента-ассоциированных осложнений беременности.

Далее нами была исследована реализация генетических факторов риска: различается ли экспрессия урокиназы и ее рецептора в плаценте в норме и при плацента-ассоциированных осложнениях беременности, если да, то определяются ли эти различия наличием генетических полиморфизмов, как влияют генетические маркеры на строение плаценты на микроуровне.

Микрофотографии ткани плаценты при окрашивании антителами к урокиназе и ее рецептору представлены на Рисунке 2.

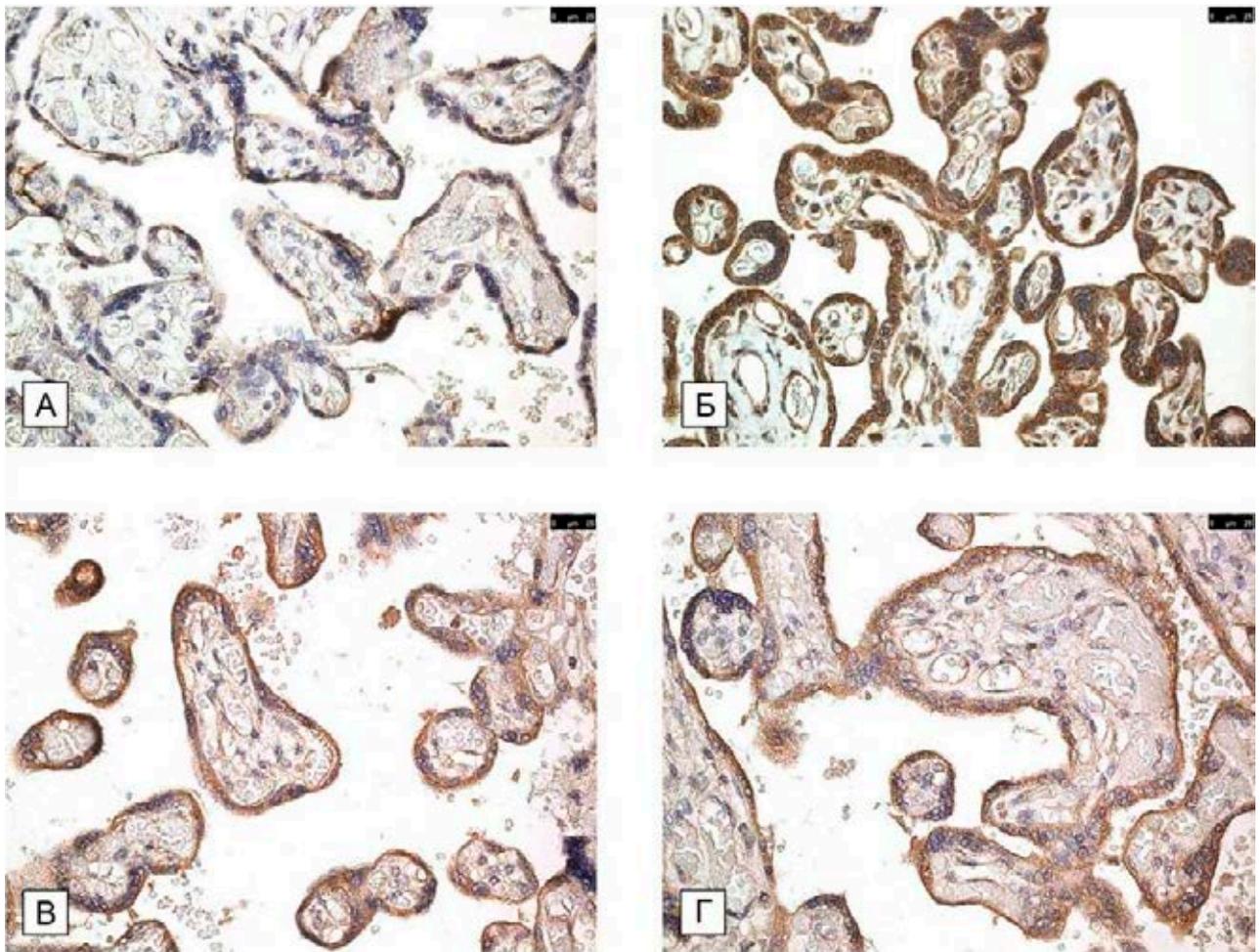


Рисунок 2 – Экспрессия uPA (А, Б) и uPAR (В, Г) ворсинами хориона в контрольной группе (Б, Г) и группе ПАО (А, В) при иммуногистохимическом выявлении. Масштабный отрезок – 25 мкм

В ткани плаценты при плацента-ассоциированных осложнениях (Рисунок 2, А) выявлено менее интенсивное uPA-окрашивание синцитиотрофобласта по сравнению с контрольной группой (Рисунок 2, Б). Разницы в экспрессии uPAR при ее иммуногистохимической оценке между группами выявлено не было (Рисунок 2, В, Г). Таким образом, уровень экспрессии самой урокиназы при плацента-ассоциированных осложнениях беременности был достоверно ниже такового, чем при нормально протекающей беременности. При иммуногистохимической оценке в III триместре уровни экспрессии урокиназного рецептора в ткани плаценты не отличались в норме и у пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности.

Сравнение интенсивности иммуногистохимической экспрессии урокиназы и ее рецептора в норме и при плацента-ассоциированных осложнениях беременности было проведено в настоящем исследовании впервые. Исследования, проведенные с использованием иммуноферментного анализа, свидетельствуют об отсутствии различий в концентрации урокиназы в плаценте при преэклампсии, HELLP-синдроме, изолированными нарушениями кровотока в системе «мать-плацента-плод» и в норме [M. Kolben et. al., 1996].

Нам не удалось продемонстрировать, что изменения уровня uPA в плаценте при плацента-ассоциированных осложнениях беременности обусловлены наличием исследованных однонуклеотидных замен в ее гене у плода: при соотнесении данных иммуногистохимического исследования и генетического анализа каких-либо закономерностей выявлено не было. Наиболее вероятно, что различия в уровне экспрессии урокиназы при плацента-ассоциированных осложнениях беременности и в норме могут быть объяснены активацией оксидативного стресса, стресса эндоплазматического ретикулула и последующего общего снижения синтеза белка в плаценте [Burton G. J. et. al., 2009].

Однако, при соотнесении результатов микроморфометрии с результатами генотипирования были выявлены интересные закономерности: было обнаружено влияние замены С/Т rs4065 в гене *PLAU* матери на степень васкуляризации ворсин. В зависимости от генотипа удельная площадь сосудистого русла и величина сосудисто-стромального соотношения достигали наибольших значений при генотипе ТТ, значения данных параметров достоверно превышали таковые при генотипе СС: для удельной площади сосудистого русла – в 1,4 раза, для сосудисто-стромального соотношения – в 1,3 раза. Данные результаты представлены на диаграмме размахов на Рисунке 3.

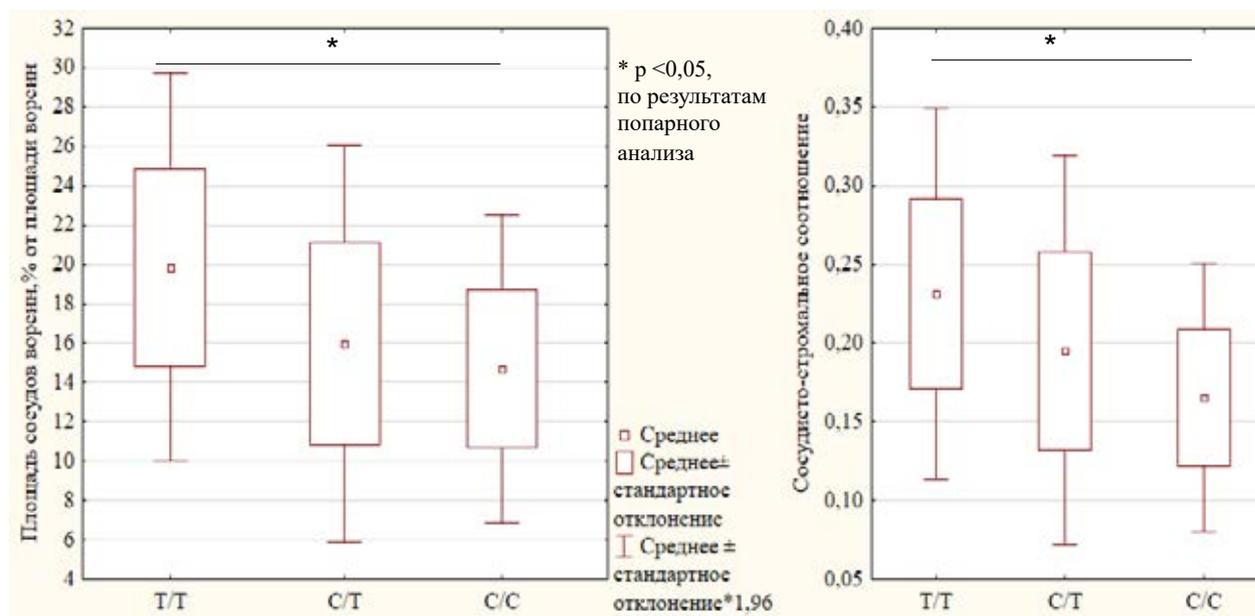


Рисунок 3 – Генотип матери (rs4065 PLAU) и степень васкуляризации ворсин плаценты

Таким образом, ассоциация материнского генотипа ТТ rs4065 гена урокиназы с большей площадью сосудистого компонента ворсин подтверждает выявленный при оценке риска развития плацентарной недостаточности и плацента-ассоциированных осложнений беременности феномен протективного влияния генотипа ТТ rs4065 гена урокиназы, негативного влияния – генотипа СС.

Объединяя клинические, морфологические и генетические данные, можно предполагать, что полиморфизм генов белков урокиназной системы матери и плода вносит вклад в развитие плацентарной недостаточности и плацента-ассоциированных осложнений беременности.

В ходе выполнения работы нами было показано, что для развития плацентарной недостаточности наиболее значимым является наличие у матери генотипа СС гена *PLAU* (rs4065, C/T 3'-UTR), АА гена *PLAUR* (rs2302524, A659G), наличие у плода генотипа СС гена *PLAU* (rs4065, C/T 3'-UTR) и СС гена *PLAUR* (rs344781, T(-516)C). При учете как материнского, так и плодового генотипа прогностическое значение наличия у плода негативного генотипа СС гена *PLAU* преобладает над значением материнских полиморфизмов. Влияние мутаций на перинатальный исход, наиболее вероятно, обусловлено изменениями в активности соответствующих белков в процессах клеточной инвазии и дифференцировки на ранних и основополагающих этапах плацентации. В дальнейшем, в зависимости от генотипа, сохраняется правильное соотношение про- и антиангиогенных факторов либо наблюдается патологический ангиогенез в плаценте. Морфологически это подтверждается

взаимосвязью генотипа с особенностями строения плаценты на микроуровне, в том числе, со степенью васкуляризации ворсин. Таким образом, определение генотипа матери и фетального генотипа на наличие мутаций в генах урокиназной системы является клинически и морфологически обоснованным способом выделения группы риска плацента-ассоциированных осложнений.

Генетически обусловленное снижение активности урокиназной системы носит негативный характер и увеличивает риск развития преэклампсии и ЗРП, предположительной причиной этому служит нарушение процессов инвазии клеток трофобласта и неполное ремоделирование спиральных артерий на раннем сроке беременности. Единые генетические факторы риска преэклампсии и ЗРП еще раз подтверждают возможность использования термина «плацента-ассоциированные осложнения беременности» и позволяют рассматривать преэклампсию и ЗРП как следствия одного патологического процесса. Таким образом, становится возможным применять единую стратегию профилактики данных состояний и применять низкие дозы ацетилсалициловой кислоты не только, для предотвращения преэклампсии, но и ЗРП.

На основании полученных результатов становится возможным использовать определение генотипа матери и фетального генотипа по SNP, чья прогностическая значимость была доказана в настоящем исследовании, для выделения группы риска преэклампсии и ЗРП на доклинической стадии.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Проведенное исследование дает основу для дальнейшего повышения точности прогнозирования развития плацента-ассоциированных осложнений беременности; создания новых математических моделей, учитывающих при автоматическом подсчете риска преэклампсии и риска ЗРП, и анамнестические, и клинические, и генетические факторы, в том числе тех, чья значимость которых была доказана в работе.

Кроме того, учитывая выявленную зависимость эффективности профилактических мероприятий от генотипа, необходимо разработать дифференцированный подход к ведению пациенток с ранней и/или тяжелой преэклампсией и ЗРП в анамнезе.

### **Выводы**

1. У пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями достоверно чаще, чем при нормально протекающей беременности, встречаются: генотип CC PLAUC/T 3'-UTR – в 7,11 раз, генотип AA PLAU A(659)G – в 1,54 раз. Однонаправленность распределения генотипов характерна для ЗРП и преэклампсии: при ЗРП частота выявления генотипа CC PLAUC/T 3'-UTR

наблюдается в 2,92 раза чаще, генотип AA PLAUR A(659)G – в 1,58 раза чаще; при преэклампсии частота выявления генотипа CC PLAU C/T 3'-UTR наблюдается в 1,98 раза чаще, при нормальном течении беременности.

2. У детей пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями беременности достоверно чаще, чем при нормально протекающей беременности, встречается генотип CC гена PLAU C/T 3'-UTR (в 1,75 раза), генотип CC PLAUR T(-516)C (в 5,02 раза).

3. По данным многофакторного анализа с учетом как генотипа матери, так и генотипа плода, наиболее значимым фактором риска развития плацента-ассоциированных осложнений является наличие фетального генотипа CC гена PLAU C/T 3'-UTR.

4. В плацентах пациенток с преэклампсией и ЗРП интенсивность иммуногистохимической экспрессии урокиназы снижена на 10,5% по сравнению с нормально протекающей беременностью. Взаимосвязи снижения экспрессии урокиназы с наличием генетических полиморфизмов C/T 3'-UTR, P141L в ее гене у плода выявлено не было.

5. Снижение степени васкуляризации ворсин плаценты, приводящее к плацентарной недостаточности, обусловлено наличием материнского генотипа CC гена PLAU C/T 3'-UTR. Генотип TT гена PLAU C/T 3'-UTR определяет нормальное строение сосудистого русла плаценты, то есть является протективным в отношении плацента-ассоциированных осложнений.

### **Практические рекомендации**

1. Для оценки риска развития плацента-ассоциированных осложнений беременности целесообразно определение полиморфизма генов PLAU и PLAUR матери и плода.

2. Пациенткам группы высокого риска плацента-ассоциированных осложнений по данным молекулярно-генетического анализа необходима коррекция модифицируемых факторов риска: исключение железодефицита на этапе планирования беременности, контрацепция во избежание нежелательной беременности и ее искусственного прерывания.

3. Учитывая общую генетическую предрасположенность к развитию преэклампсии и ЗРП, правомочно объединять их в группу в плацента-ассоциированных осложнений и проводить профилактику ЗРП так же, как и преэклампсии, путем назначения низких доз ацетилсалициловой кислоты.

4. Тактика ведения пациенток с ранней и/или тяжелой преэклампсией и ЗРП в анамнезе должна быть дифференцированной в зависимости от результатов генотипирования, так как эффективность профилактики с использованием ацетилсалициловой кислоты зависит от генотипа.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лозинская, Д.Б. Роль системы урокиназного активатора плазминогена в развитии плаценты и патогенезе плацентарной недостаточности / А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 61-67.
2. Ревина, Д.Б. Снижение экспрессии урокиназы в плаценте и наличие однонуклеотидных замен в гене урокиназы ассоциировано с развитием плацентарной недостаточности / А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Н.А. Олейникова, Н.Н. Маммедов, Г.А. Мишуровский, П.Г. Мальков, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина, В.А. Ткачук // **Материалы XIII Международный конгресса по репродуктивной медицине.** – 2019. – С. 191-192.
3. Ревина, Д. Б. Ассоциация SNP генов белков урокиназной системы с развитием плацентарной недостаточности / А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Н.А. Олейникова, Г.А. Мишуровский, П.Г. Мальков, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина, В.А. Ткачук // **Вестник Российского государственного медицинского университета.** – 2019. – № 6. – С. 53-60.
4. **Патент на изобретение «Способ прогнозирования развития плацентарной недостаточности»** А.В. Балацкий, Д.Б. Ревина, М. Джайн, О.Б. Панина, Л.М. Самоходская от 17 октября 2019 г.
5. Ревина, Д.Б. Ассоциация SNP генов белков урокиназной системы с развитием плацента-ассоциированных осложнений беременности и их влияние на гистоморфологию плаценты (устный) // **Материалы XXI Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и Дитя – 2020»**, Московская область, г. Красногорск, Россия, 28-30 сентября 2020. – С. 73.
6. Ревина, Д. Б. Плацента-ассоциированные осложнения беременности: влияние полиморфизма rs4065 гена урокиназы / А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Н.Н. Мамедов, Л.М. Самоходская, О.Б. Панина // **Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.** – 2021. – Т. 20, № 1. — С. 5-10.
7. Ревина, Д. Б. Влияние полиморфизма rs4065 гена урокиназы на риск развития и степень тяжести преэклампсии, задержки роста плода / Д.Б. Ревина, О.Б. Панина // **Материалы VII Общероссийской конференции с международным участием Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству (18–20 февраля 2021 года, г. Санкт-Петербург).** – Т. 16. – Изд-во журнала StatusPraesens Москва, 2021. – С. 51-52.