

ГАЙСКАЯ ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
МАРКЕРОВ ПРИ УГРОЖАЮЩЕМ ВЫКИДЫШЕ У БЕРЕМЕННЫХ В  
ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ**

14.01.01 — Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

ВОРОНЕЖ— 2018 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Енькова Елена Владимировна** - доктор медицинских наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

**Андреева Маргарита Дарчоевна** - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Олина Анна Александровна** - доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по развитию ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета Д 212.015.16 на базе ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации и на сайте организации: <http://www.bsu.edu.ru/bsu>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета**

**Ярош Андрей Леонидович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время угрожающий выкидыш - важнейшая медицинская и социально - экономическая проблема, заслуживающая внимание ведущих научных школ мира. Научное сообщество не прекращает поиски новых причинно-следственных механизмов развития осложнений беременности. Актуальность и значимость проблемы невынашивания обусловлена высоким уровнем перинатальной заболеваемости и смертности.

Эмбриональный период беременности является наиболее уязвимым, особенно в основные критические этапы развития: имплантацию, органогенез, плацентацию (А.М. Торчинов, 2014; А.С. Zenclussen, 2013). Именно в этот период эмбрион наиболее чувствителен к неблагоприятным факторам внешней среды. Формирующаяся плацента еще не реализует защитные функции в полной мере, а темпы пролиферации и дифференцировки на этом этапе высоки, поэтому нарушения гестационной перестройки различных систем у матери могут привести к развитию осложнений или прерыванию беременности (А.Н. Стрижаков, 2012).

Современные знания о молекулярных процессах, происходящих в критические периоды развития беременности, демонстрируют, что отдельные показатели, вовлеченные в патогенез осложнений и неблагоприятных исходов беременности, могут служить потенциальными маркерами гестационного неблагополучия (Г.Т. Сухих, 2012; М.А. Левкович, 2012). Невзирая на достигнутые в последнее время успехи в профилактике и лечении угрожающего выкидыша, привычного невынашивания, частота самопроизвольного аборта остается высокой. Каждая пятая из числа диагностированных желанных беременностей завершается самопроизвольным выкидышем или, примерно в равной пропорции, останавливается в развитии. До 80% случаев невынашивания и неразвивающихся беременностей приходится на I триместр гестации (В.Н. Серов, 2014; Ed. S. Gupta, 2015).

При исключении генетического фактора риска невынашивания, а также эндокринологических, иммунных, анатомических, гемостазиологических нарушений, не всегда удается установить причину осложнений гестационного периода.

Улучшение репродуктивного здоровья женщин, выявление новых звеньев патогенеза осложненного течения беременности, поиск новых методов лабораторного мониторинга с целью выявления признаков

дестабилизации гомеостаза для оценки риска реализации осложнений гестационного периода, с учетом имеющихся достижений в различных направлениях акушерства и гинекологии, представляется весьма актуальным путем предупреждения возможного демографического кризиса.

**Степень разработанности темы исследования.** Изучением проблемы невынашивания беременности занимаются ведущие ученые РФ и мира. На первый триместр приходится до 85% выкидышей (В.Н. Серов, Г.Т. Сухих, 2014). Основная проблема, определяющая трудности в своевременной диагностике, обусловлена полиэтиологичностью невынашивания беременности. Причиной гестационной патологии могут быть генные мутации и хромосомные нарушения, наследственная предрасположенность, иммунные и эндокринные нарушения, инфекционные заболевания, тромбофилические нарушения, анатомические причины (пороки развития матки, генитальный инфантилизм, гипоплазия матки, истмико-цервикальная недостаточность, миома матки, синехии) (А.П. Момот, 2013; J. Calleja-Agius, 2012).

Стремление улучшить перинатальные исходы, в условиях развития осложнений беременности в первом триместре, послужило поводом для поиска дополнительных ранних информативных биомаркеров патологического течения беременности, разработки принципов ранней профилактики и терапии.

**Цель исследования:** улучшение клинических исходов у женщин с угрожающим выкидышем в первом триместре беременности путем совершенствования (индивидуализации) дифференцированных подходов к тактике ведения угрозы прерывания беременности.

**Задачи исследования:**

1. Проанализировать современное состояние проблемы угрожающего выкидыша в эмбриональном периоде развития в Воронеже и области в условиях стационара 2 уровня. Выявить особенности психологических, социальных и соматических факторов у беременных в I триместре с угрозой прерывания беременности.

2. Определить роль сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), витамина D и мелатонина в генезе угрозы прерывания в эмбриональном периоде первого триместра беременности, установив корреляционные взаимосвязи между исследуемыми показателями.

3. Изучить характеристику популяции тучных клеток эндометрия при нормальном и патологическом течении беременности первого триместра (неразвивающаяся беременность). Определить их прогностическую значимость.

4. Разработать алгоритм ведения беременных в эмбриональном периоде на основе определения 25(OH)D с целью профилактики гестационных осложнений.

**Научная новизна.** Изучены преморбидный фон и особенности течения беременности у женщин с угрозой прерывания беременности в эмбриональном периоде первого триместра.

Проведен анализ психологических, социальных и соматических факторов, определяющих развитие такого осложнения, как угрожающий выкидыш.

Выявлена прогностическая ценность определения уровня витамина D у матери, уровня мелатонина, VEGF, как факторов риска осложненного течения беременности.

Установлена корреляционная связь между уровнем 25-гидроксикальциферола плазмы крови и VEGF сыворотки крови, 25-гидроксикальциферола плазмы крови и уровнем мелатонина мочи.

Впервые дана оценка состоянию популяции тучных клеток в эндометрии при физиологической беременности и неразвивающейся беременности.

**Теоретическая и практическая значимость.** В результате проведенного исследования научно обосновано определение уровня витамина D в плазме крови, мелатонина мочи и VEGF в сыворотке крови у беременных женщин с угрозой прерывания в первом триместре, что позволяет своевременно выделить группу риска осложненного течения беременности. Выявлено, что около 48% госпитализаций и медикаментозной терапии на малых сроках являются необоснованными (Г.В. Дмитриенко, 2015). Выявление угрожающего выкидыша в первом триместре беременности с учетом объективных данных позволит исключить необоснованную госпитализацию и терапию. Углубленное изучение клеточного состава эндометрия при патологических состояниях в первом триместре беременности (неразвивающаяся беременность) позволит расширить имеющиеся представления о патогенезе неразвивающейся беременности и раскрыть новые возможности предгравидарной подготовки. Учитывая фенотипические признаки тучных клеток, возможно дать оценку состоянию местного гомеостаза в эндометрии при имплантации и прогнозировать особенности ремоделирования сосудов и трофобластической инвазии в первом триместре беременности.

**Методология и методы исследования.** Исследование проводилось на клинической базе кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ВГМУ им.

Н.Н. Бурденко, в гинекологическом отделении БУЗ ВО «Городская клиническая больница № 3» с 2013 по 2018 годы.

Методом случайной выборки в рамки исследования включены и обследованы 160 беременных женщин, проживающих в Воронеже и Воронежской области. Все обследованные женщины разделены на 3 клинические группы (Рисунок 1):

1 группа (основная группа) – беременные с угрожающим выкидышем в первом триместре, поступившие в гинекологическое отделение на стационарное лечение, беременность у которых была сохранена (n=80).

2 группа (группа сравнения) – беременные с угрожающим выкидышем, чья беременность, несмотря на проводимое лечение, остановилась в развитии (n=40).

3 группа (группа контроля) – беременные женщины (n=40), поступившие для прерывания беременности (аборт).

Критерии включения в исследование: женщины со сроком до 8 недель беременности.

Критерии исключения из исследования: возраст до 18 лет, наличие многоплодной беременности, аномалии развития органов малого таза, заболевания внутренних органов в стадии декомпенсации, ВРТ, острые инфекционные заболевания любой локализации, заболевания эндокринной системы (сахарный диабет 1 и 2 типов, гестационный сахарный диабет на инсулинотерапии, гипотиреоз, тиреотоксикоз, гиперпаратиреоз, болезнь и синдром Иценко-Кушинга), онкологические заболевания, ревматические заболевания, беременные с признаками эндометрита, подтвержденного иммуногистохимическим исследованием CD 138, хромосомная патология абортуса.

Пациенткам проведено клинико-диагностическое обследование для уточнения генеза осложнений беременности, полученные результаты заносились в специально разработанную компьютеризованную базу данных.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

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

1. Имеется тенденция к увеличению числа пациенток с угрозой прерывания беременности ранних сроков. Факторы риска развития угрозы прерывания беременности многочисленны: избыточная масса тела и ожирение, наличие хронических экстрагенитальных заболеваний, ВЗОМТ, последствия воспалительных и травматических повреждений матки, гиповитаминоз D.

2. Гиповитаминоз D повышает риск развития угрозы прерывания беременности. Изменение уровня витамина D коррелируют с величиной мелатонина и VEGF .

3. При повышении продукции VEGF выше критического порога значительно повышается риск замершей беременности.

4. Применение витамина D и белковой диеты, с включением в рацион беременной продуктов, с большим содержанием триптофана, а также принятием мер по улучшению качества и продолжительности сна, снижает риск невынашивания беременности.

5. Характеристики тучных клеток являются дополнительным диагностическим предикторным маркером состояния эндометрия для оценки репродуктивных потерь при неразвивающейся беременности.

**Степень достоверности и апробация результатов.** В основу математической обработки материала были положены как параметрические методы (t-критерий Стьюдента для нормально распределенных показателей), так и непараметрические методы прикладной математической статистики (U-критерии Манна-Уитни, Уилкинсона, Колмогорова-Смирнова, Фишера), которые позволяют оценить степень различия даже при малой численности групп, и не предполагают нормального распределения параметров. Различия распределений считали достоверными при  $p < 0.05$ . Вычисления проводили с помощью программного обеспечения ZEN 2.3 (Carl Zeiss), а также с использованием пакета стандартных статистических программ Statistica 6.0 for Windows all, Microsoft Office Excel 2013, Расчетно-Аналитической Системы «Статистика» (РАС «Статистика»), Уведомление о государственной регистрации отчуждения исключительного права по договору, №РД0182154 от 28.09.2015 г. Договор об уступке программ для ЭВМ от 03.07.2015 г.

Материалы диссертационной работы доложены на региональной образовательной конференции РОАГ «Охрана репродуктивного здоровья женщины», г. Воронеж, 2017 г.; международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике», г. Воронеж, 2017 г.; межрегиональной научно-практической конференции «Инновации в акушерстве и гинекологии с позиций доказательной медицины», г. Воронеж, 2017 г.

Апробация диссертации проведена на межкафедральном заседании кафедры акушерства и гинекологии №1, кафедры акушерства и гинекологии №2, кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ИДПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко 25.12.2017г.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на клинической базе кафедры хирургии, акушерства и гинекологии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, в гинекологическом отделении БУЗ ВО «Городская клиническая больница № 3» с 2013 по 2018 гг.

Методом случайной выборки в рамки исследования включены и обследованы 160 беременных женщин, проживающих в Воронеже и Воронежской области. Все обследованные женщины разделены на 3 клинические группы: 1 группа (основная группа) – беременные с угрожающим выкидышем в первом триместре, поступившие в гинекологическое отделение на стационарное лечение, беременность у



которых была сохранена (n=80), 2 группа (группа сравнения) – беременные с угрожающим выкидышем, чья беременность, несмотря на проводимое лечение, остановилась в развитии (n=40), 3 группа (группа контроля) – беременные женщины (n=40), поступившие для прерывания беременности (аборт).

Для выполнения поставленных задач в работе использовались следующие методы:

- сбор анамнеза и занесение сведений в специально разработанную компьютеризованную базу данных;

- определение психологического статуса по методике экспресс-диагностики невроза Хека и Хесса;

- оценка риска перинатальных осложнений, предложенная Радзинским В.Е. и Костиным И.Н. (2011 г.);

- клиничко-лабораторное обследование: определение ИМТ, общий анализ крови, тромбоциты периферической крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (глюкоза, амилаза, мочевины, креатинин, билирубин, АСТ, АЛТ, общий белок, коагулограмма (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза, электрокардиография, консультация терапевта, специальные методы исследования:

- уровень витамина D в плазме определяли, используя иммуноферментный тест для количественного определения 25-ОН витамина D (25-ОН Vitamin D ELISA). Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12311 от 07.06.2012.

- уровень сывороточного ангиогенного фактора роста VEGF A определяли, используя ThermoFisher Scientific «Human VEGF-A Platinum ELISA. Человеческий VEGF-A» - иммуноферментный набор для количественного определения фактора роста эндотелия сосудов человека-A (VEGF-A), ЗАО «БиоХимМак», Москва.

- уровень мелатонина в моче определяли, используя тест системы BÜHLMANN 6-Sulfatoxymelatonin ELISA Kit для прямого количественного определения 6-сульфатоксимелатонина (6-SMT) в моче человека, ЗАО «БиоХимМак», Москва. Расчет результатов проводили на фотометре SunriseTecan (Австрия).

- гистологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия у женщин из группы сравнения и группы контроля проводилось на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава

РФ доктором медицинских наук, доцентом Атякшиным Д.А., исследование кариотипа абортуса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациенток сопоставим во всех группах наблюдения, не имел достоверных различий и составлял в основной группе\*  $31.31 \pm 0.50$  года, в группе сравнения\*\*  $33.37 \pm 0.5$  года, в группе контроля  $32.05 \pm 0.5$  года. Большую часть групп обследованных формировали женщины в возрасте старше 28 лет. Так, в 1 группе они составили 57.5 %, во 2 группе - 85%, в 3 группе - 70% ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.05$ ). Достаточно высокие цифры позволяют убедиться в более поздней реализации репродуктивных функций современной женщиной.

В основной группе большинство составили повторнбеременные - 67.5%, первобеременные – 32.5%, в группе сравнения 75% и 25%, соответственно, в группе контроля все женщины были повторнбеременными.

Была проведена социальная стратификация беременных. При анализе полученных данных установлено, что социальное положение обследуемых значительно различалось. Большая часть пациенток основной группы были специалистами (41.25%) или служащими (18.75%), в группе сравнения – 25% и 25%, соответственно, в группе контроля 75% женщин неработающие (Рисунок 2).

Были проанализированы условия труда работающих пациенток. Установлен факт сверхурочной работы у 5% и наличие ночных смен у 8.75% женщин из основной группы. У 15% и 5%, соответственно, женщин группы сравнения.

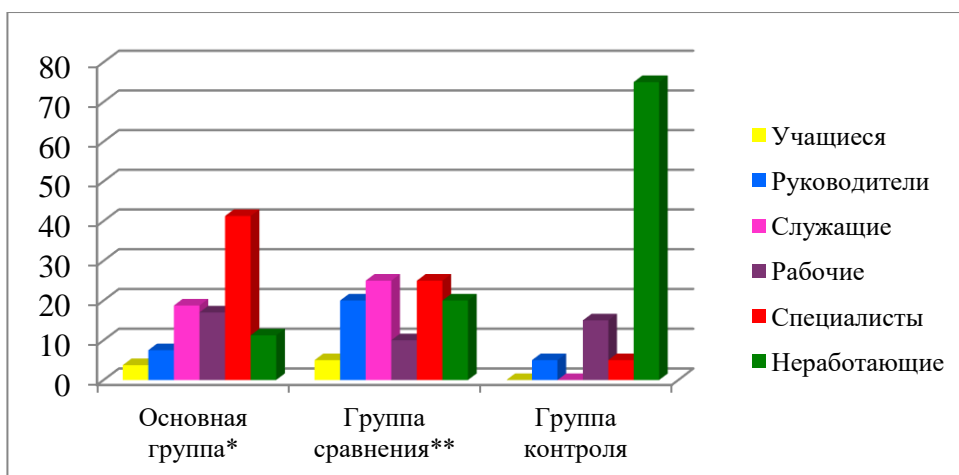


Рисунок 2 – Социальное положение обследованных женщин  
 $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.05$  – по сравнению с контролем

32.5% женщин из основной группы и 45% из группы сравнения указали на психоэмоциональное напряжение в течение рабочего времени. В группе контроля работающие женщины отметили оптимальные условия труда.

В связи с этим проведено анкетирование женщин по методике экспресс-диагностики невроза К. Хека и Х. Хесса, с целью определения уровня невротизации, эмоциональной неустойчивости. Низкий уровень невротизации выявлен у 38% женщин из основной группы, у 25% из группы сравнения и у 85% обследованных женщин в группе контроля. Низкий уровень невротизации демонстрирует положительный фон переживаний. У 62% обследованных 1 группы, 75% женщин из 2 группы и 15% из 3 группы выявлена высокая вероятность невроза (невротизации), что свидетельствует о выраженных негативных переживаниях (раздражительность, тревожность, страх).

При анализе анамнестических данных экстрагенитальные заболевания были выявлены у 80% - в основной группе, у 90% - в группе сравнения и у 35% беременных контрольной группы. Наиболее часто встречались заболевания ССС (расстройство вегетативной нервной системы (ВСД по гипотоническому, гипертоническому и смешанному типам), гипертоническая болезнь, варикозная болезнь вен нижних конечностей): в 41.25% случаев у беременных из 1 группы, в 30% случаев у женщин из 2 группы и в 20% случаев из группы контроля. Ожирение или избыточная масса тела выявлена у 23.75% женщин в основной группе и у 20% в группе сравнения, не наблюдалось в группе контроля. Заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, хронический панкреатит, хронический холецистит, дискинезия желчевыводящих путей) выявлены у 22.5% женщин 1 группы, у 10% - 2 группы, у 5% - 3 группы. Анемия установлена у 18.75% (практически у каждой пятой) обследуемых основной группы, у 5% - в группе контроля, не диагностирована в группе сравнения. Заболевания мочевыделительной системы (хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, хронический цистит) – у 15% женщин 1 группы, у 30% женщин из 2 группы, у 5% женщин из 3 группы. Заболевания органов дыхания (хронический бронхит, хронический тонзиллит, хронический гайморит, аллергический ринит, бронхиальная астма) наблюдались у 10% обследуемых из 1 группы и у 25% из 2 группы, не были выявлены в 3 группе. Отмечена высокая инфекционная заболеваемость в детстве – 46.25% в основной группе, 80% женщин группы сравнения отметили этот факт и 75% женщин из группы контроля. Нужно отметить, что большая часть женщин имела сочетание тех или иных заболеваний. Таким образом, обследованные пациентки имели отягощенный соматический анамнез, следовательно,

низкий индекс здоровья, на фоне которого женщины реализуют свою репродуктивную функцию. В основной группе здоровые женщины составили 20%, в группе сравнения - 10%, в группе контроля - 65% (Рисунок 3).

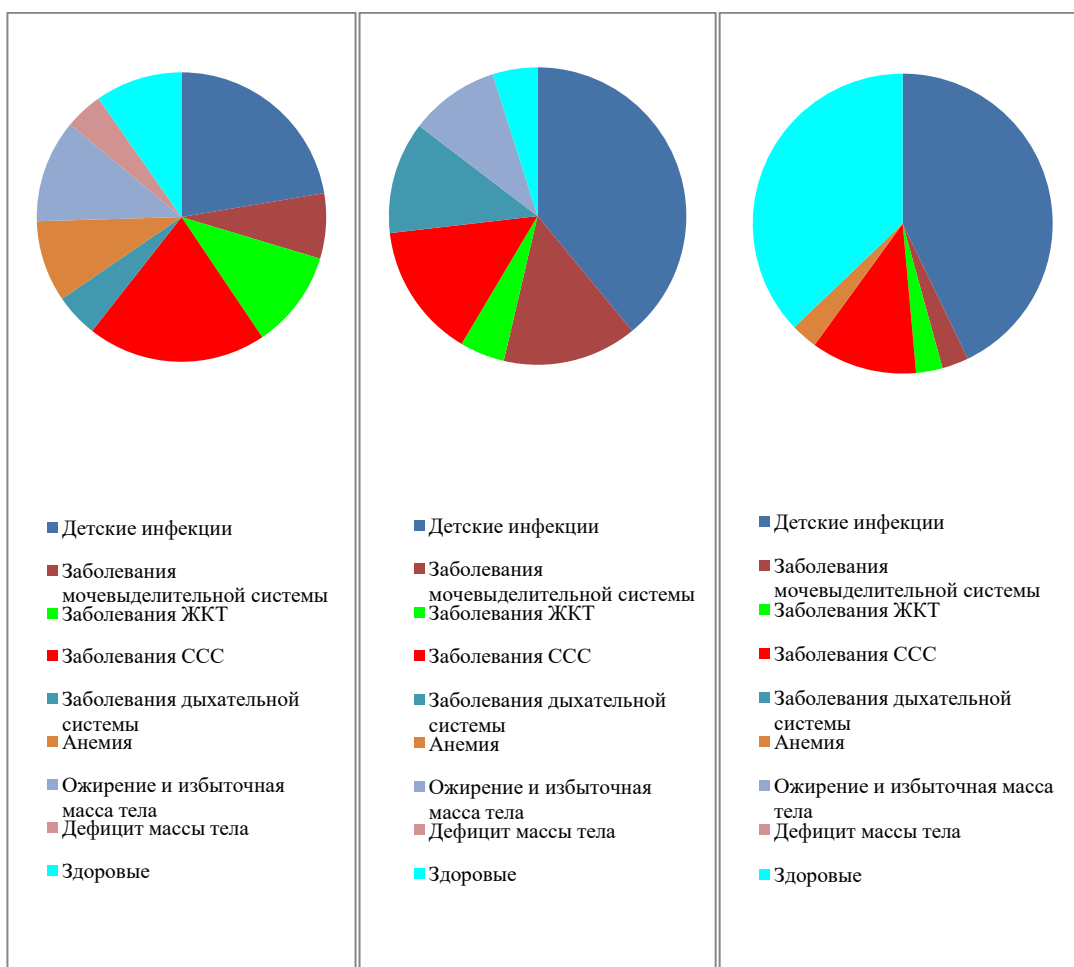


Рисунок 3 – Структура экстрагенитальных заболеваний у обследованных женщин основной группы\*, группы сравнения\*\* и группы контроля

$p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.05$  – по сравнению с контролем

При анализе структуры гинекологической заболеваемости в анамнезе выявлена высокая частота встречаемости воспалительных заболеваний репродуктивной системы в анамнезе - 55%, 45%, 25%, соответственно группам. Чаще всего беременные отмечали смешанную урогенитальную инфекцию, что является провоцирующим фактором для развития угрожающего выкидыша. Беременные отмечали наличие миомы матки и аденомиоза, в основной группе 3.7%, 8.7%, соответственно, в группе сравнения на наличие миомы матки указало 5%, аденомиоза - 35% женщин, в группе контроля – 10%, 5%, соответственно. Первичное или вторичное бесплодие наблюдалось у 12.5% обследуемых женщин из основной группы, у

5% из группы сравнения, в группе контроля не выявлено. Доброкачественные новообразования яичников, а также оперативное лечение по этому поводу (цистэктомия), отметили 10% женщин 1 группы и 5% женщин 2 группы (Рисунок 4).

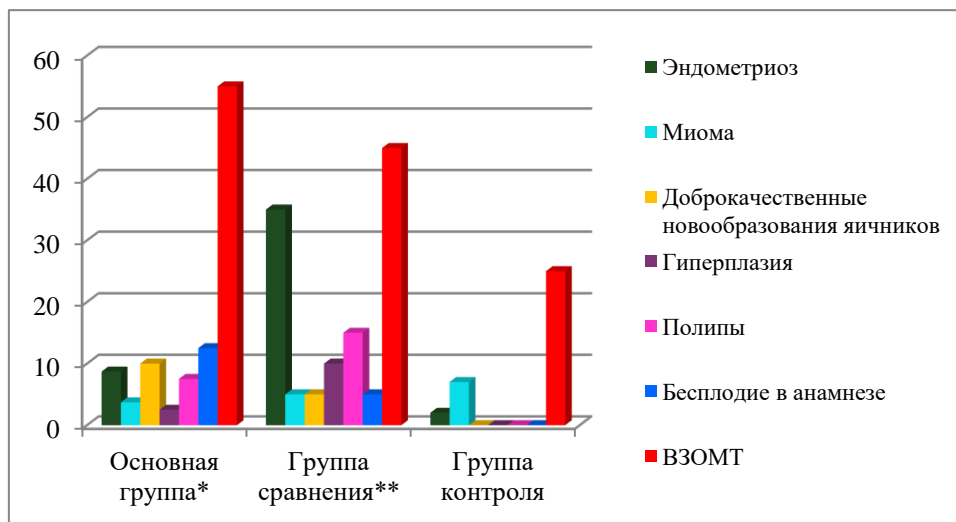


Рисунок 4 – Структура гинекологической заболеваемости  
 $p^* > 0.05$ ,  $p^{**} > 0.05$  – по сравнению с контролем

Учитывая, что большинство женщин являлись повторнобеременными, мы проанализировали исходы предшествующих беременностей. При анализе акушерского анамнеза установлено: 46.25% - основной группы, 60% - группы сравнения и 80% женщин группы контроля имели роды в анамнезе. Самопроизвольный выкидыш или неразвивающуюся беременность в анамнезе в основной группе имели 13.75% и 21.25% женщин, соответственно, в группе сравнения - 5% и 25%, соответственно. В контрольной группе данный факт не выявлен. Учитывая большой выбор контрацептивных средств, женщины по-прежнему считают аборт методом планирования семьи. В основной группе аборт в анамнезе имели 22.5% женщин, в группе сравнения - 30%, в группе контроля - 65%.

Согласно анализу имеющейся информации, используя шкалу риска перинатальных осложнений, предложенную Радзинским В.Е. и Костиним И.Н. (2011 г.), группу низкого риска перинатальных осложнений составили 36.3% женщин из основной группы, среднего риска - 61.2% пациенток, высокого риска - 2.5%. В группе сравнения - 33%, 65%, 2%, соответственно. В группе контроля - 72%, 28%, 0%.

Резюмируя данные, большинство обследованных нами беременных были служащими или специалистами с руководящей должностью и без руководящих функций, имели высокий уровень невротизации с выраженными негативными переживаниями, особенно это прослеживалось в

группе сравнения у женщин с неразвивающейся беременностью. В группе контроля 75% женщин – неработающие, с низким уровнем невротизации в 85% наблюдений. Большую долю составили пациентки в возрасте старше 28 лет. В основной группе и группе сравнения все они имели различные экстрагенитальные заболевания в анамнезе. У 35% беременных контрольной группы, клинически здоровых, также выявлены экстрагенитальные заболевания, что свидетельствует о низком уровне соматического здоровья женщин репродуктивного возраста. Большинство пациенток с осложненным течением беременности имели соматические заболевания (80% - в основной группе и 90%- в группе сравнения), что подчеркивает важность этого фактора в развитии гестационных осложнений. Именно поэтому проблемы невынашивания, проблемы неудовлетворительных перинатальных исходов должны быть решены с участием специалистов других профилей.

С учетом поставленных задач, принимая во внимание клинические рекомендации по гиповитаминозу D у взрослых Российской ассоциации эндокринологов ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Дедов И.И., Мельниченко Г.А., 2015), обследуемым беременным был исследован уровень 25-гидроксикальциферола в плазме крови. Согласно критериям, изложенным в клинических рекомендациях, для оценки степени насыщенности организма беременной витамином D за норму принимается уровень 25-гидроксикальциферола в крови более 30 нг/мл (75 нмоль/л), за недостаточность - концентрация 25(OH)D от 20 до 30 нг/мл (от 50 до 75 нмоль/л), за дефицит - ниже 20 нг/мл (50 нмоль/л). Для предупреждения развития осложнений во время беременности и лактации, связанных с дефицитом витамина D, рекомендуется поддержание уровня 25(OH)D в крови более 30 нг/мл.

В клинических рекомендациях 2015 года беременным и кормящим женщинам для профилактики дефицита витамина D рекомендуется получать не менее 800-1200 МЕ витамина D в сутки (уровень доказательности B I). Рекомендуемым препаратом для лечения дефицита витамина D является колекальциферол (D3) (уровень доказательности AI).

Исследования показали, что дефицит витамина D является распространенным явлением во время беременности и ассоциируется с увеличением частоты преэклампсии, неразвивающейся беременности, кесаревым сечением, бактериальным вагинозом и гестационным сахарным диабетом (L.Värebring, 2016). Имеются данные о статусе витамина D во время беременности и риске развития рассеянного склероза у потомства (A.Ascherio, 2012).

Полученные нами результаты демонстрируют высокую частоту встречаемости гиповитаминоза D: 67% - в основной группе, 92% - в группе сравнения, 37% - в группе контроля. Установленные результаты свидетельствуют о важности исследования этого показателя, важности профилактики недостаточности и дефицита витамина D (Рисунок 5).

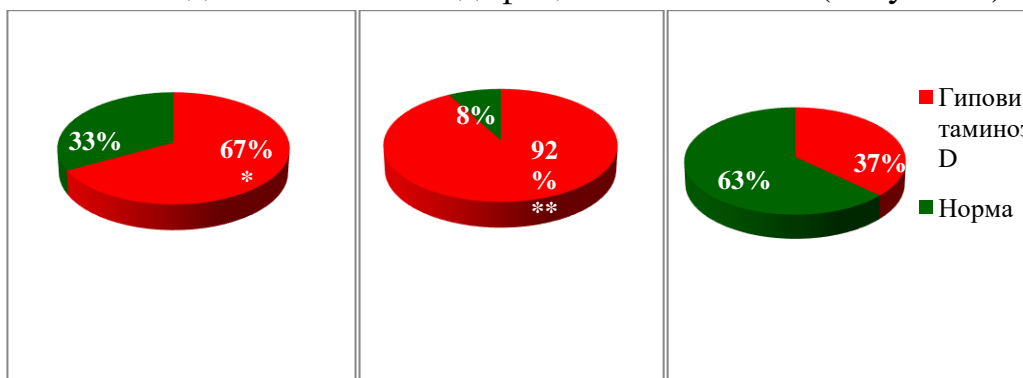


Рисунок 5 – Частота встречаемости гиповитаминоза D у женщин основной группы, группы сравнения, группы контроля

$p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.05$  – по сравнению с контролем

Нормальное развитие плацентарной ткани зависит от процессов васкулогенеза и ангиогенеза. В процессе васкулогенеза новые капилляры образуются из мезодермальных клеток-предшественников путем миграции и дифференцировки. Этот процесс находится под контролем таких сосудистых факторов, как эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) сосудистой системы зародыша и плаценты, который является ключевым фактором, регулирующим ангиогенез гестационного периода. В исследовании уровень VEGF у пациенток с угрожающим выкидышем был повышен в 1.6 раз. Наблюдаемый высокий уровень VEGF при угрожающем выкидыше в первом триместре беременности является маркером гипоксии. У женщин из основной группы составил 70.65 пг/мл, из группы сравнения – 132.68 пг/мл, из группы контроля – 28.9 пг/мл ( $p < 0.05$ ) (норма 2.5 – 42.6 пг/мл). Повышенная экспрессия VEGF говорит об аномальной ангиогенной активности, вызванной недостаточной перфузией. Для угрозы прерывания беременности с неблагоприятным исходом характерно также достоверное повышение VEGF.

Установлена корреляционная взаимосвязь между уровнем витамина D и VEGF, уровнем витамина D и мелатонином мочи у беременных с угрожающим выкидышем и неразвивающейся беременностью (Таблица 1).

Таблица 1

**Корреляционная взаимосвязь между витамином D плазмы, VEGF сыворотки крови, мелатонином мочи у обследованных беременных**

Исследуемые показатели	Основная группа n = 80	Группа сравнения n = 40	Группа контроля n = 40
Витамин D, нг/мл	23.26±0.87	17.17±1.30	30.90±1.26
VEGF, пг/мл	70.66±2.79	132.69±7.78	28.98±3.46
Мелатонин мочи, нг/мл	44.84±1.92	45.65±2.90	39.32±2.95

F – Точный критерий Фишера, p – уровень значимости, t – критерий достоверности, r – коэффициент корреляции.

Сравнение уровня витамина D и VEGF (основная группа):  $r=0.79$  – изменение уровня витамина D существенно влияет на уровень VEGF. В 62.45% изменение уровня витамина D приводит к изменению уровня VEGF,  $F=3.92$ ;  $t<0.05$ ;  $p<0.05$ .

Сравнение уровня витамина D с уровнем мелатонина (основная группа):  $r=0.63$  – изменение уровня витамина D умеренно влияет на изменение уровня мелатонина, в 39.83% изменение витамина D приводит к изменению уровня мелатонина,  $F=0.66$ ;  $t<0.05$ ;  $p<0.05$ .

Сравнение витамина D и VEGF (группа сравнения):  $r=0.82$  – изменение витамина D существенно влияет на VEGF, в 68.04% изменение витамина D приводит к изменению VEGF,  $F=2.13$ ;  $t<0.05$ ;  $p<0.05$ .

Сравнение витамина D 1 и 3 групп:  $r=0.28$ ;  $F=0.66$ ;  $p<0.05$ .

Таким образом, при гиповитаминозе D наблюдалась отрицательная направленность корреляционной связи с уровнем VEGF у женщин с угрожающим выкидышем ( $r=0.79$ ;  $p<0.05$ ) и у женщин с замершей беременностью ( $r=0.82$ ;  $p<0.05$ ), а также с уровнем мелатонина ( $r=0.63$ ;  $p<0.05$ ).

Мелатонин, вырабатываемый эпифизом, осуществляющий многочисленные важные физиологические функции, действуя как антиоксидант, нейтрализатор свободных радикалов, оказывая противовоспалительное, противоопухолевое действие, является регулятором циркадного ритма в организме, возможно, вовлечен в патофизиологические



механизмы беременности, например, при преэклампсии, при выкидышах, при поражении мозга плода. В доступной литературе не обнаружено норм, тем более региональных, уровня 6 – сульфат-оксимелатонина мочи у женщин, поэтому ориентировались на показатели, полученные у женщин с физиологически протекающей беременностью, сравнивая их с показателями, полученными у женщин с осложненным течением беременности (Рисунок 7).

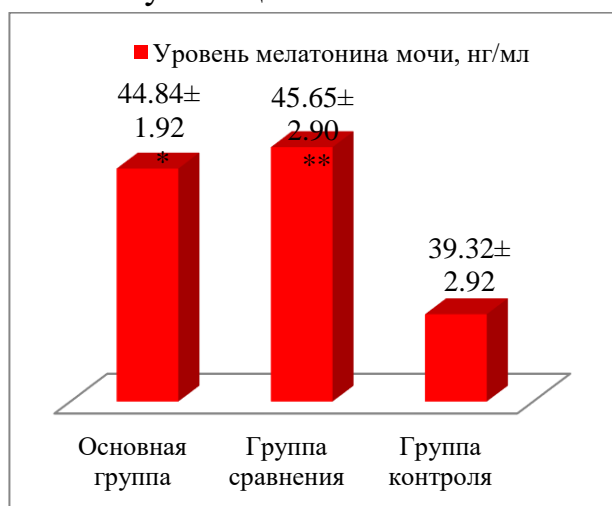


Рисунок 7 – Уровень мелатонина мочи у обследованных женщин  
 $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.05$  – по сравнению с контролем

В нашем случае возможно предположить осуществление протекторной роли гормона путем активации антиоксидантных систем: на фоне состояния гипоксии, высокого уровня VEGF, гиповитаминоза D наблюдается более высокий уровень мелатонина мочи у женщин с осложненным течением беременности, по сравнению с контролем.

Любые знания о патогенезе должны быть расширены за счет исследования местных клеточно-молекулярных взаимодействий. Данные литературы свидетельствуют, что изучение биологической роли тучных клеток, весьма актуальное направление. В настоящее время доказано их участие в аллергических реакциях, адаптивном иммунитете, ангиогенезе, ремоделировании тканей, противоопухолевой защите, заживлении ран (Атякшин Д.А., 2017). Актуальным представляется вопрос изучения участия тучных клеток в иммунологических и воспалительных процессах в структуре эндометрия при физиологической беременности и при неразвивающейся беременности.

Одной из протеаз секрета тучных клеток является триптаза. Биологические эффекты триптазы имеют важное значение в развитии аллергии, воспаления, в формировании защитных реакций. В ряде случаев триптаза - инициатор воспалительных реакций, сопровождающихся повышением интенсивности рекрутинга гранулоцитов и повышением

проницаемости капилляров. Триптаза и химаза участвуют в ангиогенезе, высвобождении факторов роста, деградации аморфного и волокнистого компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани.

С целью идентификации тучных клеток проводили традиционное метакроматическое окрашивание толуидиновым синим (Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М., 2016). Для анализа состояния популяции тучных клеток в каждом поле зрения при использовании объектива x20 оценивали число тучных клеток и соотношение недегранулированных и дегранулированных форм (Atiakshin D.A. et al., 2017). Иммуногистохимический анализ использовался для идентификации триптазы и химазы тучных клеток. При исследовании децидуальной ткани женщин с неразвивающейся беременностью наблюдалось возрастание количества тучных клеток (Рисунок 8).

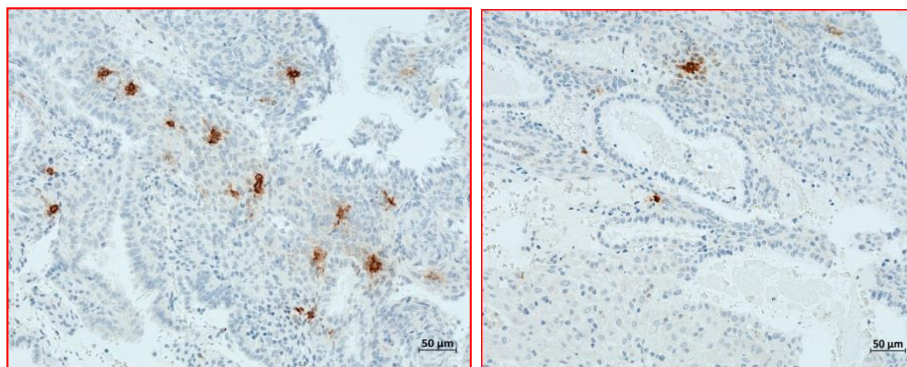


Рисунок 8 – Количество триптаза-позитивных тучных клеток в децидуальной ткани у женщин с неразвивающейся беременностью и физиологически протекающей беременностью

Возрастание количества тучных клеток в децидуальной ткани женщин с неразвивающейся беременностью. Фиксация – 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (abcam, ab2378, разведение 1:2000). Срезы докрашены гематоксилином Майера.

Установлено, что в группе женщин с замершей беременностью количество тучных клеток в децидуальной ткани с признаками мастоцитоза в 2.1 раз выше, по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Содержание триптаза – позитивных тучных клеток в группе с замершей беременностью в 4.2 раза превышает контроль ( $p < 0.05$ ) (Рисунок 9).

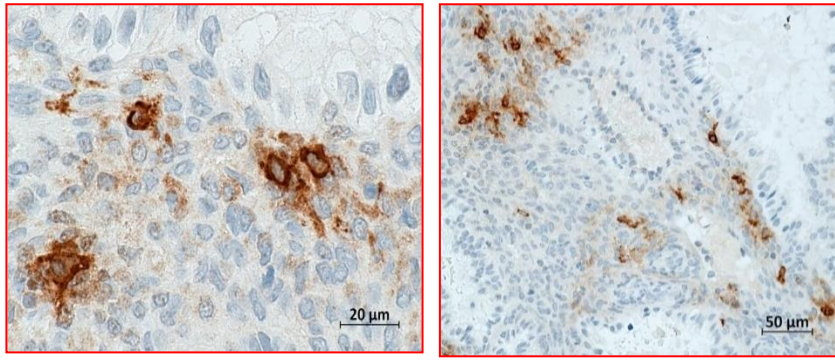


Рисунок 9 – Децидуальная ткань женщин с неразвивающейся беременностью

Фиксация – 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (abcam, ab2378, разведение 1:2000). Срезы докрашены гематоксилином Майера. Активная секреция триптазы в межклеточный матрикс эндометрия и микроокружение децидуальных клеток. Высокое содержание триптазы в области базальной мембраны эпителия маточных желез.

Существенные изменения состояния популяции тучных клеток децидуализированного эндометрия были обнаружены также при исследовании экспрессии протеаз – триптазы и химазы. В тучных клетках эндометрия группы женщин с замершей беременностью усиливалась экспрессия химазы. При этом, несмотря на общее увеличение количества триптаза-содержащих тучных клеток, результаты множественного иммуномаркирования свидетельствовали о снижении доли тучных клеток с экспрессией триптазы (Рисунок 10).

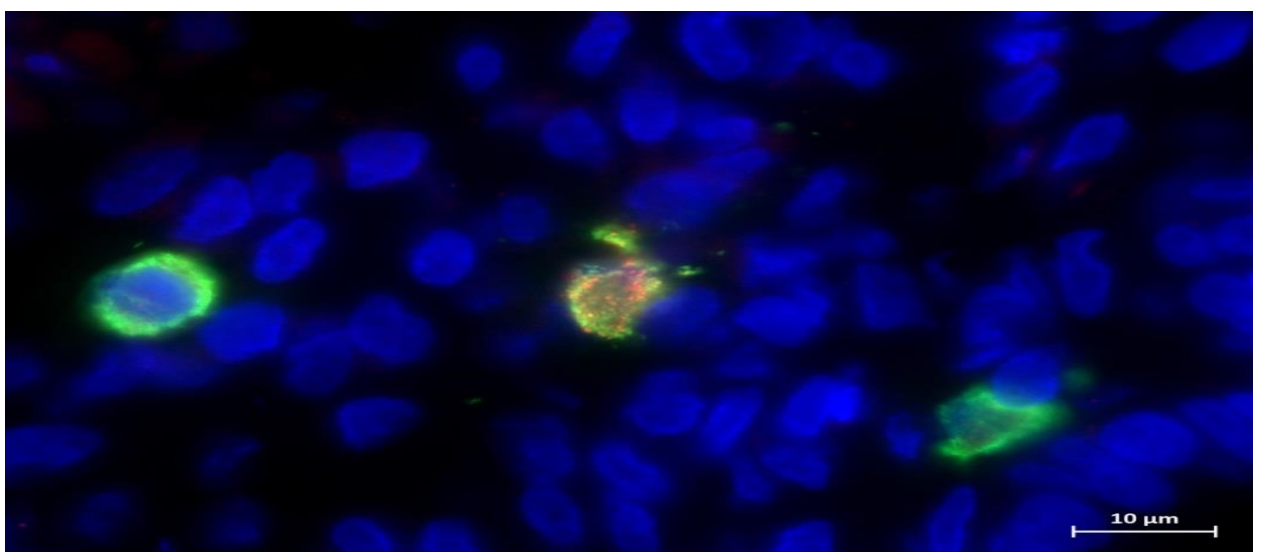


Рисунок 10 - Тучные клетки в эндометрии. Множественное

иммуномаркирование на триптазу и химазу. Иммуногистохимическое окрашивание с флуоресцентной детекцией триптазы и химазы

Происходило достоверное возрастание тучных клеток с одновременной экспрессией триптазы и химазы, а также увеличивалась доля тучных клеток, экспрессирующих исключительно химазу.

Химаза-позитивные гранулы часто локализовались в строме эндометрия, представляя собой автономный запас фермента вне цитоплазмы тучных клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило акцентировать внимание на проблеме недостаточности и дефицита витамина D как фактора, приводящего к невынашиванию беременности. Установлена взаимосвязь между уровнем 25(OH)D и VEGF, 25(OH)D и мелатонином, а также риском развития угрожающего выкидыша и невынашивания беременности. Научно обосновано определение уровня витамина D и VEGF в сыворотке крови у беременных женщин с угрозой прерывания в I триместре, что позволяет своевременно выделить группу риска осложненного течения беременности. Учитывая фенотипические признаки тучных клеток, возможно дать оценку состоянию местного гомеостаза в эндометрии при имплантации и прогнозировать особенности ремоделирования сосудов и трофобластической инвазии в I триместре беременности.

На основании результатов, полученных при исследовании, разработан алгоритм ведения женщин на предгравидарном этапе и беременных в эмбриональном периоде беременности на основе определения 25(OH)D. При выявлении концентрации 25(OH)D в плазме крови  $\leq 19.95$  нг/мл следует относить этих женщин к группе высокого риска развития неразвивающейся беременности. На предгравидарном этапе необходимо назначать лечебные дозы витамина D до восстановления его нормального уровня, во время беременности назначать максимальную профилактическую дозу (1200 МЕ). При неразвивающейся беременности в анамнезе профилактика гиповитаминоза D + иммуногистохимическое исследование эндометрия на предгравидарном этапе с целью идентификации химаза- и триптаза-положительных тучных клеток.

При концентрации у беременной 25(OH)D в плазме крови  $\leq 24.76$  нг/мл следует относить этих женщин к группе высокого риска развития угрожающего выкидыша. Целесообразно рекомендовать препараты витамина D в максимальной профилактической дозе (1200 МЕ).

## **ВЫВОДЫ:**

1. В период с 2016 года по 2017 год имеется тенденция к увеличению числа госпитализированных пациенток с угрозой прерывания беременности ранних сроков на 122.7% (в 2016г – 523 женщины, в 2017г – 1165 женщин) в БУЗ ВО «ВГКБ№3».

Факторами риска развития угрозы прерывания беременности являются: высокий уровень невротизации с выраженными негативными переживаниями, руководящая должность беременной, избыточная масса тела и ожирение, наличие хронических экстрагенитальных заболеваний, ВЗОМТ, последствия воспалительных и травматических повреждений матки. Фактором риска развития угрожающего выкидыша является снижение уровня 25-гидроксикальциферола в плазме крови ниже 24.76 нг/мл.

2. При снижении уровня 25-гидроксикальциферола в плазме крови ниже 24.76 нг/мл риск развития угрожающего выкидыша повышается в 1.2 раза. При снижении уровня 25-гидроксикальциферола в плазме крови ниже 19.95 нг/мл риск неразвивающейся беременности повышается в 1.5 раза. При повышении продукции VEGF выше 110 пг/мл риск неразвивающейся беременности повышается в 2.3 раза. Установлена отрицательная корреляционная связь между уровнем 25-гидроксикальциферола в плазме крови и уровнем VEGF ( $r=0.79$ ;  $p<0.05$ ), между уровнем 25-гидроксикальциферола в плазме и уровнем мелатонина в моче ( $r=0.63$ ;  $p<0.05$ ). Установлен высокий уровень 6- сульфат - оксимелатонина мочи у женщин с осложненным течением беременности.

3. При неразвивающейся беременности определяется высокая концентрация триптаза-позитивных (в 4.2 раза\*), химаза-позитивных тучных клеток (в 9.5 раз\*) и триптаза / химаза-позитивных тучных клеток (в 3.7 раз\*) в децидуальной ткани, и более интенсивная дегрануляция (в 2.1 раз\*) триптазы и химазы во внеклеточный матрикс, что приводит к инициации воспалительных реакций (по результатам иммуногистохимического окрашивания, \* -  $p<0.05$  по сравнению с контролем).

4. Разработан алгоритм ведения женщин на предгравидарном этапе и беременных в эмбриональном периоде беременности на основе определения 25(OH)D.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В комплекс обследования беременных женщин из группы риска должно быть включено исследование уровня витамина D плазмы и сывороточного VEGF.

2. При выявлении на предгравидарном этапе концентрации 25-гидроксикальциферола в плазме крови ниже 19.95 нг/мл следует применять лечебные дозы витамина D до восстановления его нормального уровня.

3. При выявлении беременных женщин из группы риска по развитию осложнений беременности в первом триместре необходимо рекомендовать Колекальциферол в максимальной профилактической дозе. Профилактика гиповитаминоза у беременных должна включать 800 – 1200 МЕ витамина D в сутки.

4. Необходима профилактика депривации ночного сна с целью предупреждения снижения продукции мелатонина с применением немедикаментозных методов (белковой диеты, с включением в рацион беременной продуктов, с большим содержанием триптофана, а также принятием мер по улучшению качества и продолжительности сна).

5. У женщин с репродуктивными потерями в анамнезе, ВЗОМТ, с наличием внутриматочных вмешательств необходимо иммуногистохимическое исследование эндометрия для характеристики популяций тучных клеток на этапе предгравидарной подготовки.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Дальнейшее изучение влияния уровня 25-гидроксикальциферола, VEGF, мелатонина на гестационный процесс позволит своевременно выделить группу риска осложненного течения беременности и улучшить перинатальные исходы. Изучение клеточного состава эндометрия при патологических состояниях в I триместре беременности (неразвивающаяся беременность) позволит расширить имеющиеся представления о патогенезе неразвивающейся беременности и раскрыть новые возможности предгравидарной подготовки. Полифункциональность триптазы и химазы позволяет выступать ключевыми объектами при исследовании роли тучных клеток в формировании фенотипа физиологических и патологических состояний, в том числе во время беременности, а также представлять собой информативный диагностический маркер невынашивания и перспективную мишень для фармакотерапии.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Проблемы формирования женского репродуктивного здоровья в подростковом возрасте / О.В. Гайская, О.В. Сарычева, Э.Ю. Петрова, Н.И. Краснова // Сборник материалов III всероссийской научно-практической

конференции с международным участием «Новой школе – здоровые дети» (Воронеж, 23-25 октября 2014 года) – Воронеж, 2014. – С. 170.

2. Гайская, О.В. Выявление комплекса маркеров для прогнозирования преэклампсии / О.В. Гайская, Е.В. Енькова, И.А. Тюркин, О.В. Хоперская // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2017. – Т.16. – № 1. – С. 88 – 94.

3. Гайская, О.В. Методы диагностики угрозы прерывания беременности в первом триместре / О.В. Гайская, Е.В. Енькова, И.А. Тюркин, О.В. Хоперская // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2017. – Т.16. – № 1. – С. 44 – 48.

4. Гайская, О.В. Мужской фактор невынашивания беременности / О.В. Гайская, Е.В. Енькова, А.В. Кузьменко, О.В. Хоперская // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2017. – Т.16. – №3. – С. 555 – 564.

5. Гайская, О.В. Методы медикаментозной коррекции патологического течения первого триместра беременности / О.В. Гайская, Е.В. Енькова, О.В. Хоперская // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2017. – Т.20. – № 1. - С. 135 – 143.

6. Гайская, О.В. Перспективы изучения тучных клеток эндометрия / О.В. Гайская, Е.В. Енькова, Д.А. Атякшин, О.В. Хоперская // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2017. – Т.20. – № 4. – С. 111 – 116.