

**БАРАБАШЕВА СОФЬЯ СЕРГЕЕВНА**

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПОВТОРНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ  
ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ**

3.1.4 – акушерство и гинекология (медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**ОРДИЯНЦ ИРИНА МИХАЙЛОВНА**

**Официальные оппоненты:**

**Зароченцева Нина Викторовна** – доктор медицинских наук, профессор РАН (Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии Министерства здравоохранения Московской области), заместитель директора по научной работе.

**Серова Ольга Фёдоровна** – доктор медицинских наук, профессор (федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» федерального медико - биологического агентства России) кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования, заведующая кафедрой.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита диссертации состоится 27 октября 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.016.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» МЗ РФ по адресу: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20 стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» МЗ РФ (127206, г. Москва, ул. Вучетича, д.10а) и на сайте <http://dissov.msmsu.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Акуленко Лариса Вениаминовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Невынашивание беременности – не только медицинская, но и социальная проблема, что особенно актуально в настоящее время, когда происходит снижение естественного прироста населения. Мир не имеет концепции предотвращения потерь беременности, особенно повторных [Радзинский В.Е., 2020; Lixin Wen, Rongfang Li, Ji Wang., 2019].

Поистине, «проблемой века» следует считать неразвивающуюся беременность (НБ). Международная Федерация акушеров-гинекологов (FIGO) в 2006 г. объявила НБ современной эпидемией. Американское общество акушеров и гинекологов (ACOG) считает, что это самая распространенная форма невынашивания беременности, до 26% всех беременностей заканчиваются самопроизвольным выкидышем и более 10% из них диагностируются как НБ; 80% ранних репродуктивных потерь происходит в первом триместре, а каждая пятая желанная беременность завершается самопроизвольным абортom или останавливается в развитии («замирает») примерно в равной пропорции [Радзинский В.Е., 2017; Dugas C, Gossman W.G., 2019].

В настоящее время нет единого предиктора НБ. Причины и механизмы НБ очень сложны и тесно связаны с инфекционным фактором, иммунной системой, наследственностью, эндокринными нарушениями, заболеваниями органов малого таза, образом жизни, окружающей средой и другими факторами. У 40-50% беременных точная причина НБ не установлена [Li X, Yin M, Gu J, Hou Y., 2018].

Не вызывает сомнений, что в основе НБ лежит дисфункция эндометрия. Именно способность эндометрия адекватно реагировать на циклические колебания уровня стероидных гормонов крови приводит к формированию необходимых ультраструктурных изменений в эндометрии для возникновения «окна имплантации» и в конечном результате обеспечивает имплантацию

оплодотворенной яйцеклетки, наступление и развитие беременности [Xing H, Luo Y, Wang S., 2018].

Существует множество доказательств, свидетельствующих о том, что патогенез ранних репродуктивных потерь тесно связан с окислительным стрессом (ОС) [Xu K, Liu G, Fu C., 2018], изменениями протеомного спектра [Xia L, Zhao X, Sun Y., 2014], нарушением липидного обмена [Nagirnaja L., Palta P., Kasak L., 2014], снижением активности ферментов дыхательной цепи, возникающими в митохондриях [Zhu L.J., Chen Y.P., Chen B.J., 2014]. Изменения в структуре и функциях митохондрий отмечены во всех случаях терминальной стадии гибели клеток, что служит основанием поиска фармакологических средств для предотвращения гибели клеток.

Являясь неотъемлемой частью системной биологии, метаболомика является собой новый научный метод выявления звеньев патогенеза [Xia L, Zhao X, Sun Y., 2014]. Исследование содержания органических кислот (ОК) и изменений в динамике нормальной и осложненной беременности приобретает все больший научный интерес, поскольку ОК играют особую важную роль в выработке клеточной энергии [Qiu C, Enqubahrie D.A., Frederick I.O., 2014]. ОК представляют широкий класс соединений, включающий жирные и карбоновые кислоты, некоторые азотсодержащие соединения, отражающие функционирование митохондрий и окисление жирных кислот [Li X, Yin M, Gu J, et al., 2019]. По данным Brelley J., Lord R. (2018), ОК являются самым чувствительным и специфическим тестом на митохондриальную дисфункцию, что позволяет рассматривать их в качестве возможных маркеров прогнозирования и ранней диагностики прерывания беременности.

### **Степень разработанности темы исследования**

Рецептивный эндометрий – сложная биологически активная среда, обеспечивающая, наряду с другими компонентами системы мать–плацента–плод, успешную имплантацию.

ОК эффективно используются эмбрионом как пластический материал, служат предшественниками биоактивных соединений, включаются в

энергетический обмен [Qiu C, Enquobahrie D.A., Frederick I.O., 2014]. Некоторые из них выполняют функции регуляторов ионного равновесия в клетках, индукторов синтеза стероидных гормонов и пролиферативных процессов, активных нейромедиаторов [Li X, Yin M, Gu J, et al., 2019]. Изменение соотношения метаболитов ОК в биологических жидкостях при осложненной беременности отражает состояние эмбриона [Souza RT, Mayrink J, Leite DF., et al., 2019], что позволяет исследовать их в качестве возможных маркеров имплантационных повреждений и прогностических критериев успешного/неуспешного развития беременности.

**Цель исследования:** определить значимость органических кислот в патогенезе и возможности прогнозирования неразвивающейся беременности.

**Задачи исследования:**

1. оценить репродуктивное здоровье женщин с эпизодами неразвивающейся беременности и выявить факторы её риска;
2. определить изменения в содержании низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови и эндометрии при неразвивающейся беременности;
3. выявить взаимосвязь низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови и эндометрии с морфологическими и иммуногистохимическими изменениями эндометрия;
4. создать алгоритм и обосновать комплекс мероприятий по профилактике неразвивающейся беременности

**Научная новизна исследования**

Впервые реализован новый подход к изучению функционального состояния биологической системы мать-плацента-плод. Расширены представления о патогенезе прекращения развития беременности.

Определена роль изменений низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови (гиппуровой, гидроксифенилмолочной, гидроксифенилпировиноградной, молочной (лактата), пировиноградной (пирувата), 4-гидроксифенилуксусной, глутаровой и гомогентизиновой кислот)

и эндометрии (лактата, пирувата, 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот) при НБ.

Впервые установлено, что изменение соотношения лактат/пируват 1:3 (в норме 10:1) при НБ является ранним индикатором тканевой гипоксии, а выявление 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот в эндометрии - митохондриальной дисфункции клеток, играющих немаловажную роль в развитии нарушений рецептивности в экстраэмбриональных структурах.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Разработаны критерии и предложен алгоритм прогнозирования нарушений развития беременности на основании изучения митохондриальной функции клетки.

Этими критериями могут служить нарушения уровня низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови: снижение уровня гиппуровой, гидроксифенилмолочной, гидроксифенилпировиноградной кислот, нарушение соотношения лактат/пируват 1:3 (норма 10:1). В эндометрии: изменение соотношения лактат/пируват – 1:4 (норма 10:1), определение 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот.

На основании полученного регрессионного уравнения была произведена кросс-проверка с высокими предсказательными результатами разработанного алгоритма. Полученные результаты могут служить прогностическими маркерами возможности концептуального восстановления фертильности после перенесенной НБ.

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

1. Прогнозирование служит эффективным инструментом выделения контингента риска НБ. Наиболее значимыми факторами риска являются клинические: предшествующие медицинские и самопроизвольные аборт, хронические воспалительные заболевания матки и ее придатков, внутриматочные манипуляции, а также математически рассчитанные количественные характеристики органических кислот: появление в эндометрии 4-гидроксифенилуксусной ( $<0,06$  ммоль/л) и

метилмалоновой кислот ( $<0,26$  ммоль/л), повышение уровня лактата ( $<6,31$  ммоль/л), изменение ее соотношения с пируватом (1:3), ниже/выше которых возможно развитие структурных изменений эндометрия и повторных репродуктивных потерь (НБ).

2. В основе патогенеза НБ лежат нарушения метаболизма в системе мать-плацента-плод. Изменения низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови: гиппуровой, гидроксифенилмолочной, гидроксифенилпировиноградной, лактата, пирувата, 4-гидроксифенилуксусной, глутаровой и гомогентизиновой кислот могут служить ранними индикаторами неадекватной перфузии клеток кислородом и тканевой гипоксии. Выявление 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот в эндометрии в сочетании с морфоиммуногистохимическими особенностями (выраженными очаговыми некрозами, венозным полнокровием, лимфогистиоцитарной инфильтрацией, повышенным уровнем экспрессии CD 16, CD20, снижением экспрессии VEGF и LIF) маркерами митохондриальной дисфункции клеток с нарушениями рецептивности в экстраэмбриональных структурах.
3. Показатели низкомолекулярных метаболитов в сыворотке крови и ткани эндометрия в сочетании с морфо- и иммуногистохимическими показателями могут служить прогностическими маркерами восстановления фертильности после перенесенной НБ.

#### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно разработал дизайн и программу исследования, принимал участие в обследовании и лечении 79 женщин с неразвивающейся беременностью. Автором разработан и внедрен в клиническую практику комплексный подход к ведению пациенток с неразвивающейся беременностью, освоены методы исследования, выполнена статистическая обработка и анализ полученных данных. Диссертантом лично сформулированы выводы, практические рекомендации и положения, выносимые на защиту.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Для создания базы данных и математической обработки статистического материала использовали программу Statsoft STATISTICA 10. Все полученные показатели были обработаны методами вариационной математической статистики. Для определения достоверности данных использовали критерий Стьюдента – при количественных нормально распределенных данных, метод Mann–Whitney (U–тест) – для непараметрических данных. Корреляционный анализ проводили при помощи непараметрического метода Спирмена (R). Для определения диагностической эффективности проводили ROC- анализ, который реализован в статистической программе SPSS.

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на V Общероссийской конференции с международным участием в Санкт-Петербурге (2019) и VI Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (2019). Основные положения диссертации, выводы и практические рекомендации внедрены в практическую работу гинекологического отделения государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница имени В.В.Виноградова Департамента здравоохранения города Москвы».

Клинические исследования, анализ и интерпретация данных произведены автором самостоятельно. Участие автора в сборе первичного материала и его обработке более 90%, обобщении, анализе и внедрении в практику результатов работы – 95%. Все научные выводы и положения, представленные в диссертации, автором получены лично.

Основные положения работы доложены на заседании кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (2019). Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии - 11 июня 2019 года, протокол «№17».

## **Внедрение в практическое здравоохранение**

Результаты, полученные при выполнении исследования, внедрены в деятельность специалистов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. В.В. Виноградова Департамента здравоохранения города Москвы», кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов.

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 1 - в базе данных научной периодики «Scopus», 5 - в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 91 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 16 рисунками. Указатель использованной литературы содержит 109 библиографических источника (42 – отечественных и 67 – иностранных авторов).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена в 2013-2019 гг. на кафедре акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ (зав. кафедрой – Член-корр. РАН, засл. деятель науки РФ, д.м.н., проф. В. Е. Радзинский), на клинической базе ГБУЗ «Городская клиническая больница им. Виноградова Департамента здравоохранения Москвы».

В соответствии с поставленными целью и задачами была разработана программа исследований, составлены индивидуальные карты, включающие 240 параметров.

Определение органических кислот осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на базе лаборатории хроматографических исследований Chromolab.

Состояние эндометрия и базального слоя миометрия осуществляли путем морфологического и иммуногистохимического исследований на базе патологоанатомического отделения ПМГМУ им. И.М. Сеченова (зав. отделением – д.м.н., профессор Коган Е.А., зав. кафедрой патологической анатомии ПМГМУ им. И.М. Сеченова).

Всего было обследовано 100 женщин репродуктивного возраста, из них 79 - с диагностированной неразвивающейся и 21 - с прогрессирующей беременностью, поступивших на искусственный аборт.

Критерии включения: женщины репродуктивного возраста с неразвивающейся беременностью, подтвержденной УЗИ.

Критерии исключения - возраст пациенток менее 22 и более 40 лет; сопутствующие или перенесенные гинекологические, онкологические и аутоиммунные заболевания (СКВ, аутоиммунный тиреоидит, антифосфолипидный синдром); сахарный диабет; вирусный гепатит.

Настоящее исследование проводилось в соответствии с открытым проспективным дизайном в три этапа.

На первом этапе при поступлении устанавливался диагноз НБ на основании результатов  $\beta$ -ХГЧ и ультразвукового исследования (когда эмбрион не визуализировался при размерах плодного яйца не менее 25мм при исследовании трансабдоминальным датчиком и 18мм и более - трансвагинальным датчиком, отсутствие сердцебиения при копчико-теменном размере не менее 5мм)

На втором этапе с целью своевременной диагностики возможных ранних репродуктивных потерь, всем исследуемым женщинам мы определяли в

сыворотке крови и эндометрии молочную, пировиноградную, 4-гидроксифенилуксусную и метилмалоновую кислоты.

На третьем этапе по результатам морфологического и иммуногистохимического исследований эндометрия выделяли женщин групп высокого и низкого риска НБ.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Клинико-статистический анализ подтвердил сопоставимость групп в момент обследования по возрасту, менархе, возрасту начала половой жизни, социальному положению.

Средний возраст пациенток с НБ в момент обследования составил  $29,8 \pm 5,8$  лет, четверть из них находилась в позднем репродуктивном возрасте (старше 35 лет). Средний возраст женщин контрольной группы был несколько ниже и составил  $24,3 \pm 3,7$  года. По соматическому и акушерскому анамнезу группы были сопоставимы, а основными факторами, предрасполагающими к остановке развития беременности, были статистически значимые: предсуществующие медицинские и самопроизвольные аборты, хронические воспалительные заболевания матки и ее придатков, внутриматочные манипуляции.

Нами были проанализированы 17 ОК в сыворотке крови и эндометрии, разделенные на четыре группы:

- клеточного гликолиза (лактат, пируват, гликолевая кислота);
- $\beta$  - окисления жирных кислот (адипиновая, этилмалоновая, субериновая, сукциновая кислоты);
- цикла Кребса (метилмалоновая, этилмалоновая, 3-метилглутаровая, 3-гидрокси-3-метилглутаровая, глутаровая кислоты);
- окислительного стресса (гомогентизиновая, 4-гидроксифенилпировиноградная, 4-гидроксифенилуксусная, гидроксифенилмолочная и гиппуровая кислоты).

В таблице 1 представлены ОК, определенные в сыворотке крови обследованных женщин.

Таблица 1 – Органические кислоты в сыворотке крови

Показатели	I группа (ммоль/л)	II группа (ммоль/л)	P
<b>Клеточного гликолиза</b>			
Молочная	10,01±0,06	8,16±0,04	0,050
Пировиноградная	27,71±0,04	34,1±0,4	0,051
Гликолевая	5,80±4,78	4,78±3,24	0,102
<b>В - окисления жирных кислот</b>			
Адипиновая	0,11±0,30	0,24±0,50	0,101
Изовалериановая	0,18±0,30	0,18±1,20	0,106
<b>Цикла Кребса</b>			
Глутаровая	0,15±2,04	-	0,101
<b>Окислительного стресса</b>			
Гиппуровая	0,19±0,08	0,23±0,09	0,052
Гидроксифенилмолочная	0,11±0,04	0,17±0,02	0,051
4-гидроксифенилуксусная	0,06±0,3	-	0,051
4-гидроксифенилпировиноградная	0,14±0,7	0,17±0,2	0,052
Гомогентизиновая	0,01±0,4	-	0,052

( $p \geq 0,05$ ) достоверно значимые различия между группами

В сыворотке крови были обнаружены статистически значимые различия в I и II группах в уровнях лактата и пирувата. Наши исследования согласуются с данными Li X, Yin M, Gu J, et al. (2019), которые отмечали у женщин с НБ нарушение соотношения лактат/пируват в сыворотке крови в сравнении с женщинами с прогрессирующей беременностью.

По данным Semerago M, Boenzi S, Carozzo R, et al. (2016), лактат является ранним индикатором неадекватной перфузии клеток  $O_2$  и используется в качестве «количественной» оценки тканевой гипоксии. Повышенный уровень лактата у женщин с НБ в сравнении с группой контроля (Lactic acid: 10,01±0,06 ммоль/л и 8,16±0,04 ммоль/л соответственно,  $p=0,050$ ) в наших исследованиях может указывать на сниженную оксигенацию тканей, ишемию и снижение митохондриальной функции. Согласно данным литературы [Zhu L.J., Chen Y.P., Chen B.J., 2014], на образование клеточного лактата также влияет

«окислительно-восстановительное состояние» клетки. Одной из таких клеточных окислительно-восстановительных реакций является равновесие лактат/пируват. В норме соотношение лактат/пируват 10:1, в то время как, в нашем исследовании - 1:3. Сдвиг соотношения лактат/пируват ингибирует образование митохондриального АТФ и ведет к сдвигу цитоплазматического окислительно-восстановительного состояния клетки: НАДН накапливается, а  $\text{НАД}^+$  падает, что вызывает окислительный стресс [Qiu C, Enquobahrie D.A., Frederick I.O., 2014].

При исследовании ОК, маркеров  $\beta$  - окисления жирных кислот и маркеров цикла Кребса в сыворотке крови определялась, но не имела достоверно значимых различий в исследуемых группах адипиновая кислота (Adipic acid:  $0,1 \pm 0,3$  ммоль/л и  $0,24 \pm 0,50$  ммоль/л соответственно,  $p=0,101$ ), глутаровая кислота (Glutaric acid:  $0,15 \pm 2,04$  ммоль/л) определялась только у женщин с НБ. Этилмалоновая, субериновая, сукциновая метилмалоновая, этилмалоновая, 3-метилглутаровая и 3-гидрокси-3-метилглутаровая кислоты выявлены не были в исследуемых группах.

Определение глутаровой кислоты в сыворотке крови, по данным Saral NY, Aksungar FB, Aktuglu-Zeybek C. Et al., 2018, может указывать на блок синтеза CoQ10 – вещества, необходимого для утилизации кислорода, с целью получения большого количества энергии, что приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК) и ОС.

Показатели ОК, маркеров окислительного стресса, имели статистически значимое ( $p \geq 0,05$ ) снижение в уровнях гиппуровой (Hypuric acid:  $0,19 \pm 0,08$  ммоль/л и  $0,23 \pm 0,09$  ммоль/л соответственно), гидроксифенилмолочной (Hydroxiphenyl lactic:  $0,11 \pm 0,04$  ммоль/л и  $0,17 \pm 0,02$  ммоль/л соответственно), 4-гидроксифенилпировиноградной (4-hydroxiphenylpyruvic acid:  $0,14 \pm 0,7$  ммоль/л и  $0,17 \pm 0,2$  ммоль/л соответственно) кислот. 4-гидроксифенилуксусная (4-hydroxiphenylacetic acid  $0,06 \pm 0,3$  ммоль/л) и гомогентизиновая (Homogentisic acid  $0,01 \pm 0,4$  ммоль/л) кислоты определялись только у женщин с НБ.

Согласно данным Stec DF, Wang S, Stothers C, et al. (2015), 4-гидроксифенилуксусная кислота является промежуточным метаболитом в процессе катаболизма аминокислоты тирозина, поэтому выявленные нами гомогентизиновая и 4-гидроксифенилуксусная кислоты у женщин с НБ могут свидетельствовать о нарушении реакции катаболизма тирозина.

Таким образом, в сыворотке крови статистически значимые изменения у женщин с НБ были в уровнях гиппуровой, гидроксифенилмолочной, гидроксифенилпировиноградной, молочной и пировиноградной кислот, а 4-гидроксифенилуксусная, глутаровая и гомогентизиновая кислоты определялись только у женщин с НБ.

Таблица 2 - Органические кислоты в эндометрии

Показатели	I группа (ммоль/л)	II группа (ммоль/л)	P
<b>Клеточного гликолиза</b>			
Молочная	8,28±0,2	7,57±0,2	0,05
Пировиноградная	23,72±0,9	24,60±0,8	0,05
Гликолевая	2,14±0,5	6,39±2,3	0,11
<b>β - окисления жирных кислот</b>			
Адипиновая	0,15±0,3	0,17±0,5	0,201
<b>Цикла Кребса</b>			
Метилмалоновая	0,025±0,2	-	0,05
<b>Окислительного стресса</b>			
Гиппуровая	0,19±0,7	0,13±1,9	0,132
Гидроксифенилмолочная	0,08±0,4	0,05±0,2	0,122
4-гидроксифенилуксусная	0,08±0,3	-	0,05
4-гидроксифенилпировиноградная	0,04±0,7	0,10±0,2	0,131

( $p \geq 0,05$ ) достоверно значимые различия между группами

Исследование ОК в эндометрии представлены в таблице 2. Из представленных данных следует, что при изучении маркеров клеточного гликолиза статистически значимые различия также имели лактат (Lactic acid: 8,28±0,2 ммоль/л и 7,57±0,2 ммоль/л) и пируват (Pyruvic acid: 23,72±0,9 ммоль/л и 24,60±0,8 ммоль/л).

ОК, маркеры  $\beta$  - окисления жирных кислот: этилмалоновая, субериновая и сукциновая кислоты не определялись, адипиновая кислота не имела значимых изменений ( $p \geq 0,05$ ). В то время как, 4-гидроксифенилуксусная кислота - маркер окислительного стресса ( $0,08 \pm 0,3$  ммоль/л) и метилмалоновая кислота – ОК цикла Кребса ( $0,025 \pm 0,2$  ммоль/л), определялись только в эндометрии женщин с НБ.

Таким образом, сопоставив результаты в сыворотке крови и эндометрии, мы выявили статистические изменения в маркерах клеточного гликолиза, цикла Кребса и окислительного стресса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что возврат к нормальному метаболизму в этих условиях практически невозможен, что объясняет отсутствие эффективных способов профилактики гестационных потерь на ранних сроках.

С целью определения статистически значимых показателей ОК в сыворотке крови и эндометрии, ниже/выше которых возможно развитие структурных изменений эндометрия, нами на основании ROC-анализа были построены ROC-кривые ОК, как возможных маркеров прогнозирования.

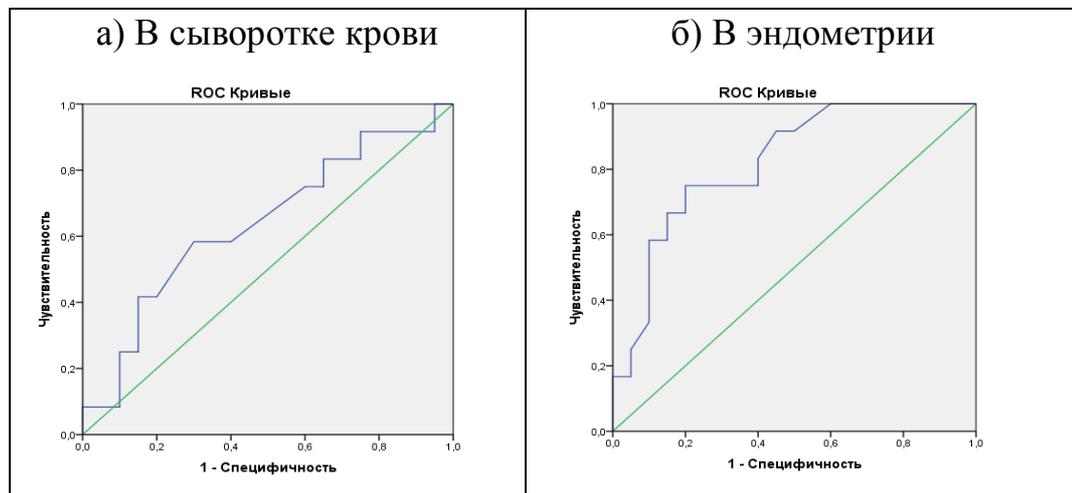


Рисунок 1 – ROC-кривая показателя уровня молочной кислоты в сыворотке крови (а) и эндометрии (б)

ROC-кривая, построенная на основе данных об уровне содержания молочной кислоты в сыворотке крови представлена на рисунке 1а. Пороговое

значение cut off составило 8,31 (h-score),  $AUC=0,638\pm0,104$ , что позволяет оценить результат, как хороший. Чувствительность составила 85,5%, специфичность – 80,7%

ROC-кривая, построенная на основе данных об уровне содержания молочной кислоты в эндометрии, представлена на рисунке 1б. Величина площади под ROC-кривой составила  $0,821\pm0,074$ . Чувствительность и специфичность метода составили: 91,9% и 91,1% соответственно, пороговое значение cut off равно 6,31.

В результате ROC-анализа было выявлено, что определение уровня пировиноградной кислоты в сыворотке крови обладает также высокой диагностической ценностью. Чувствительность и специфичность метода составила 94,7% и 74,6% соответственно, cut-off составил 24,4 (рисунок 2а).

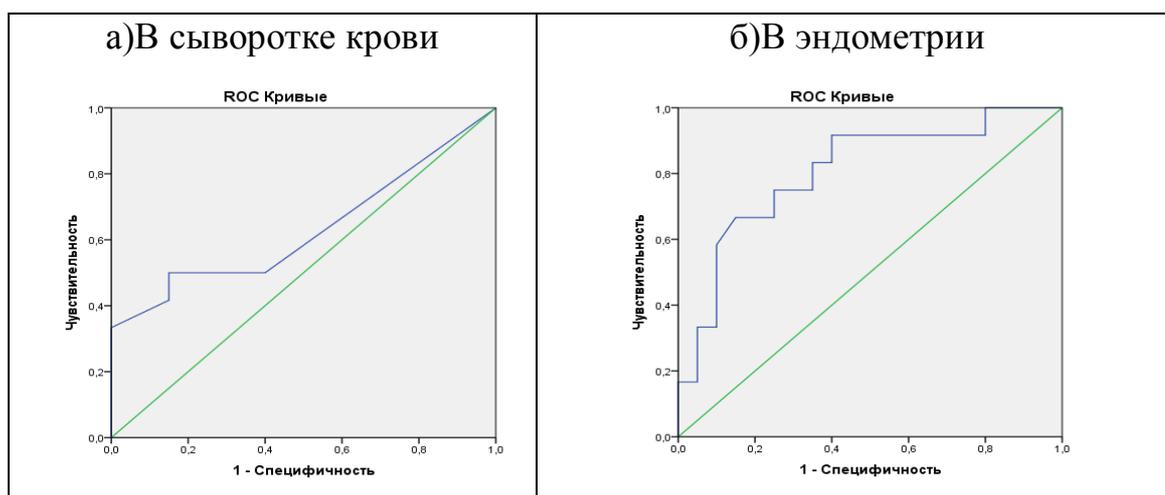


Рисунок 2 – ROC-кривая показателя уровня пировиноградной кислоты в сыворотке крови (а) и эндометрии (б)

ROC-кривая, построенная на основе данных об уровне содержания пировиноградной кислоты в эндометрии представлена на рисунке 2б. Площадь под кривой составила  $0,806\pm0,082$ . Чувствительность и специфичность метода составила 94,7% и 86,2% соответственно, cut-off составил 20,3.

ROC-кривая уровня 4-гидроксифенилуксусной кислоты показала свою хорошую диагностическую ценность только в сыворотке крови (Рисунок 3а). Площадь под кривой составила  $0,681\pm0,103$ . Чувствительность и

специфичность метода составила 85,45% и 74,62% соответственно, cut-off составил 0,06.

Таким образом, на основании результатов ROC-анализа выявлено, что уровень молочной кислоты в сыворотке крови и эндометрии составили 8,31 и 6,31 соответственно, пировиноградной кислоты – 24,4 и 20,3; уровень 4-гидроксифенилуксусной кислоты в сыворотке крови – 0,06. Данные значения приняты за пороговые, что позволило использовать их в качестве прогностических показателей.

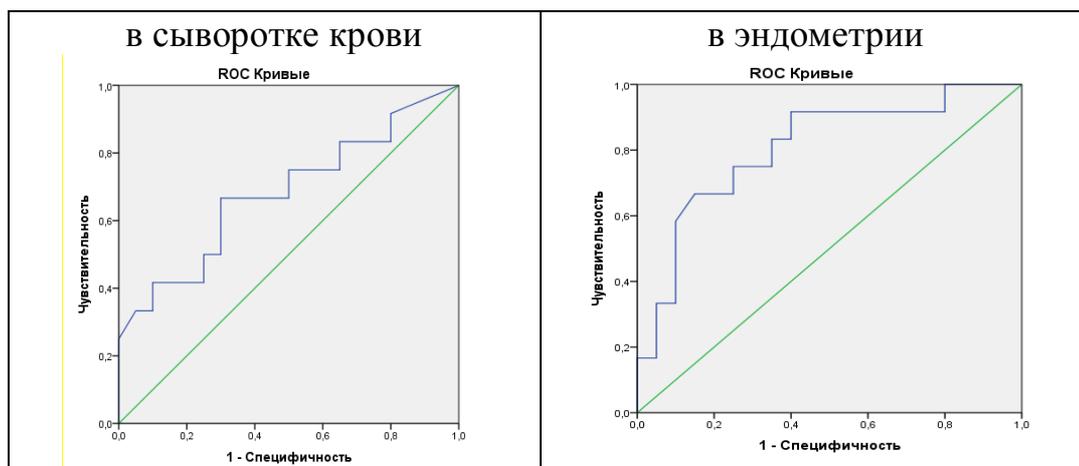


Рисунок 3 – ROC-кривая показателя уровня 4-гидроксифенилуксусной кислоты в сыворотке крови (а) и эндометрии (б)

При морфологическом исследовании у всех (79) пациенток с НБ оценивались следующие гистологические критерии: стадия гестации, состояние децидуальной ткани и гравидарного эндометрия, воспалительная инфильтрация, склероз, состояние ворсин хориона. Плодное яйцо содержало бессосудистые ворсины хориона с дисциркуляторными расстройствами, лимфогистиоцитарной очаговой инфильтрацией и очагами некроза (рисунок 4 А, Б).

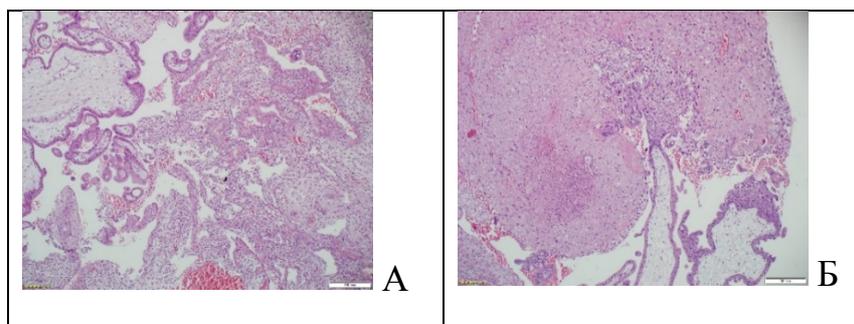


Рисунок 4. Бессосудистые ворсины хориона с дисциркуляторными расстройствами, лимфогистиоцитарной очаговой инфильтрацией и очаги некроза.

В эндометрии - регрессивные изменения в сочетании с диффузной и очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток (рисунок 5 А,Б), а в отдельных случаях с образованием лимфоидных фолликулов, имелись также небольшие очаги склероза стромы со склерозированными сосудами.

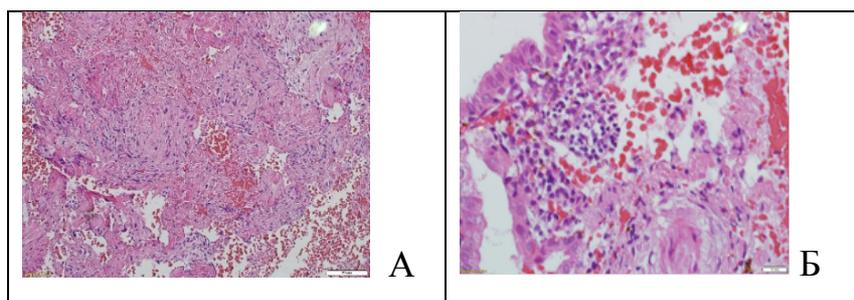


Рисунок 5. Очаги склероза стромы со склерозированными сосудами.

Исследование иммуногистохимических маркеров показало, что в эндометрии I-II стадии обратного развития отсутствовала экспрессия ER, PR, LIF, выявлена умеренная экспрессия EGF-b и сохранялась повышенная экспрессия маркеров хронического эндометрита – HLA-DR, CD16, CD 20 (рисунок 6).

Отмечен низкий уровень экспрессии ER и PR рецепторов, как в эпителии желез, так и в стромальных клетках. В количественном выражении экспрессия рецепторов к прогестерону обнаруживалась в среднем в большем числе клеток, чем экспрессия рецепторов к эстрогенам. Соотношение стероидных рецепторов ER/PR в эпителии составило 0,31. Соотношение ER/PR в клетках стромы – 0,10. Наличие в эндометрии изменений в соотношении стероидных

рецепторов свидетельствовало, прежде всего, о дисфункциональных нарушениях тканевой рецепции на фоне хронического воспаления. Оценен экспрессирующий маркер активации HLA–DR, участвующий в распознавании антигена, а также количество клеток с CD<sub>16</sub> и CD<sub>20</sub>.

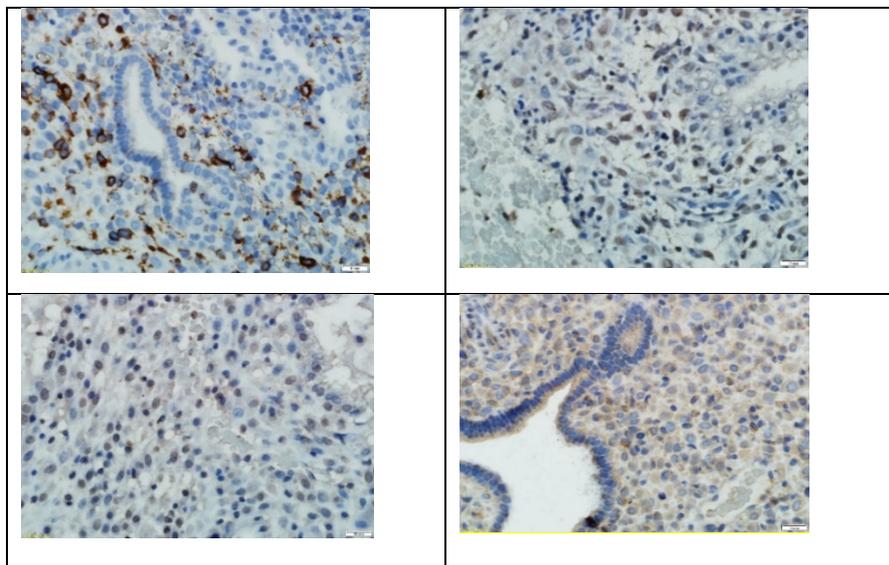


Рисунок – 6. Регрессивные изменения обратного развития с признаками хронического эндометрита. Условные обозначения: А -HLA-DR, Б- CD16, В- CD 20, Г- EGF-b

При количестве клеток, экспрессирующих CD<sub>16</sub>, CD<sub>20</sub> и HLA–DR от 0 до 10 в поле зрения, в строме подтверждено наличие аутоиммунного хронического эндометрита, а экспрессирующих HLA–DR - 25 и выше – его обострение. Выявлена низкая экспрессия VEGF как в строме (0,57), так и в эпителии желез (0,57). В подтверждение хронического эндометрита после НБ продемонстрировано снижение митотической активности клеток эпителия желез и клеток стромы эндометрия, т.е. уменьшение экспрессии ki-67 до 0,42 в строме и до 0 – в эпителии. Деление клеток в присутствии эпидермального фактора роста происходит быстрее, чем без него. VEGF в строме составил 0,92, а в эпителии – 0,52. Т.е. у женщин с гистологически подтвержденным диагнозом «хронический эндометрит» после НБ снижалась

экспрессия эпидермального фактора роста, индуцирующего пролиферацию клеток эпителия, стромы и эндотелия сосудов.

Можно предположить, что в основе патогенеза НБ лежат детерминанты нарушенного метаболизма организма: выявление 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот, изменение соотношения лактат/пируват ( $>1:3$ ) в сыворотке и эндометрии в сочетании с морфоиммуногистохимическими особенностями (выраженные очаговые некрозы, венозное полнокровие, лимфогистиоцитарная инфильтрация, повышенные уровни экспрессии HLA-DR, CD 16, CD20, экспрессии VEGF и LIF, снижающих имплантационный потенциал эндометрия и препятствующих успешному развитию беременности).

Для оценки характера и степени влияния различных факторов на риск возникновения повторной НБ был использован метод бинарной логистической регрессии. В ходе построения математической модели был использован многофакторный анализ возможного влияния следующих факторов на развитие повторной НБ: возраста, данных анамнеза, антропометрических характеристик, органических кислот и иммуногистохимических показателей. В результате данного анализа в модели остались только факторы, статистически значимо оказывающие влияние на развитие НБ. С помощью регрессионного анализа нами была построена достоверная модель ( $\chi^2=54,676$   $p<0,001$ ). Модель бинарной логистической регрессии представлена в таблице 3.

С целью улучшения прогнозирования НБ нами разработаны мероприятия, снижающие частоту повторных репродуктивных потерь.

I этап - всех женщин с НБ в анамнезе является ультразвуковое исследование органов малого таза и определение уровня  $\beta$ -ХГЧ с целью диагностики беременности.

II этапом, с целью прогнозирования возможных ранних репродуктивных потерь, определение в сыворотке крови и эндометрии молочной, пировиноградной, 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот.

III этапом, по результатам морфологического и иммуногистохимического исследований эндометрия выделение женщин групп высокого и низкого риска развития НБ.

Таблица 3 - Модель бинарной логистической регрессии

Факторы	Результаты логистического регрессионного анализа		
	Коэффициент В	Стандартная ошибка	Значимость коэффициента В (p)
Свободный коэффициент В0	-6,43	2,395	0,009
Аборты	-1,407	0,784	0,076
Внутриматочные манипуляции	-1,351	0,766	0,081
ВЗОМТ	-3,027	1,399	0,033
Пировиноградная (эндометрий)	0,554	0,17	0,002
Молочная кислота (эндометрий)	-1,92	0,947	0,046
4-гидроксифенилуксусная кислота (эндометрий)	-2,22	0,718	0,003
Метилмалоновая (эндометрий)	-1,305	0,734	0,079
CD16 строма	0,2	0,075	0,0089
CD 20 строма	0,17	0,071	0,0195

На основании полученного регрессионного уравнения была произведена кросс-проверка, в результате которой были получены достаточно высокие предсказательные результаты разработанного алгоритма мероприятий – чувствительность 95,94%, специфичность – 78,95% (Таблица 4).

Разработанный и внедрённый в практику алгоритм ведения пациенток после НБ, учитывающий уровни метаболитов (молочной, пировиноградной и 4-гидроксифенилуксусной кислот) в сыворотке крови и эндометрии, позволяет улучшить прогнозирование НБ.

Таблица 4 - Чувствительность и специфичность разработанного алгоритма

Прогноз модели	Показатель	95%	
		от	До
Чувствительность, %	95,95%	88,75 %	98,61 %
Специфичность, %	78,95%	56,67 %	91,49 %
Положительное прогностическое значение – вероятность обнаружения болезни у лиц с положительным результатом теста, %	94,67%	87,07 %	97,91 %
Отрицательное прогностическое значение – вероятность отсутствия болезни у лиц с отрицательным результатом теста, %	83,33%	60,78 %	94,16 %
Точность, %	92,47%	84,91 %	96,41 %

### ВЫВОДЫ

1. Факторами, предрасполагающими к прекращению развития беременности, являются: предшествующие медицинские и самопроизвольные аборты (32,9%), хронические воспалительные заболевания матки и ее придатков (24,0%), внутриматочные манипуляции (38,1%).
2. Выявление 4-гидроксифенилуксусной кислоты, изменение соотношения лактат/пируват (>1:3) в сыворотке крови и эндометрии являются чувствительными маркерами тканевой гипоксии и митохондриальной дисфункции при НБ.
3. Нарушение соотношения лактат/пируват (1:3), выявление 4-гидроксифенилуксусной (<0,06 ммоль/л) кислот в сыворотке крови и определение в эндометрии метилмалоновой кислоты (<0,26 ммоль/л) в эндометрии высоко коррелируют с морфоструктурными изменениями, характерными для хронического эндометрита (регрессивные изменения в сочетании с диффузной и очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток – 96,2%, очаги склероза стромы со склерозированными сосудами - 89,9% и венозное полнокровие с выраженными тромбозами - 68,3%) и

иммуногистохимическими изменениями в эндометрии (снижение экспрессии VEGF, LIF и повышение экспрессии CD16, CD20 и HLA-DR).

4. Разработанный алгоритм реабилитации женщин с ранними потерями беременности в анамнезе, позволяет восстановить фертильность женщин после перенесенной НБ и обосновать адекватную преконцепционную подготовку. На основании полученного регрессионного уравнения была произведена кросс-проверка, в результате которой получены высокие предсказательные результаты разработанного алгоритма – чувствительность 95,94%, специфичность – 78,95%.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Пациентки с предшествующими медицинскими и самопроизвольными абортами, хроническими воспалительными заболеваниями матки и ее придатков, внутриматочными манипуляциями, составляют группу риска по нарушению развития беременности.
2. Всем пациенткам с НБ в анамнезе необходимо обследование, включающее: определение лактата, пирувата, 4-гидроксифенилуксусной и метилмалоновой кислот в сыворотке крови и эндометрии в преконцепционный период; ультразвуковое исследование органов малого таза; морфологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия с определением экспрессии VEGF, LIF, HLA-DR, CD20 и CD16.
3. При выявлении нарушений в метаболическом профиле (нарушение соотношения лактат/пируват ( $>1:3$ ), определение 4-гидроксифенилуксусной кислоты в сыворотке крови и эндометрии и мевалоновой кислоты в эндометрии) в сочетании с морфоиммуногистохимическими признаками хронического эндометрита (очаги склероза стромы со склерозированными сосудами, лимфогистиоцитарная инфильтрация, очаги некроза и венозного полнокровия, снижение экспрессии VEGF, LIF и повышение экспрессии CD16, CD20 и HLA-DR) необходимо назначение реабилитационных

мероприятий, направленных на коррекцию митохондриальной дисфункции и окислительного стресса.

4. Своевременные реабилитационные мероприятия позволяют планировать следующую беременность с минимальным риском неблагоприятного исхода.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Перспективны дальнейшие исследования по вопросам патогенеза развития НБ, возможности использования выявленных предикторов как маркеров остановки гестации.

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

1. Неразвивающаяся беременность: взгляд на проблему / И. М. Ордиянц, С.С. Барабашева // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение – 2018 – Т.6, №3. С. 92-96**
2. Саногенез против патогенеза / И.М. Ордиянц, Е.А.Коган, С.С.Барабашева // *Status Praesans* – 2018 – Т6, №12. С. 79 – 82
3. Профиль органических кислот у женщин с неразвивающейся беременностью / И.М. Ордиянц, С.С. Барабашева, А.М. Савичева // **Фундаментальная и клиническая медицина – 2019 – Т4, №3. С. 22 – 26**
4. Роль органических кислот и морфоиммуногистохимических изменений эндометрия в патогенезе неразвивающейся беременности / И.М. Ордиянц, О.С. Побединская, С.С. Барабашева // **Ульяновский медико-биологический журнал, 2020; 1: 63-71.**
5. Органические кислоты в оценке гемостаза женщин с неразвивающейся беременностью / И. М. Ордиянц, С.С. Барабашева, О. К. Молчанова // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение – 2020**
6. Органические кислоты и их метаболиты в прогнозировании перспектив восстановления фертильности после перенесенной неразвивающейся беременности / Ордиянц И.М., Барабашева С.С., Молчанова О.К. // **Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение, №3 - 2020**
7. Возможности системной энзимотерапии хронического эндометрита после неразвивающейся беременности / И.М. Ордиянц, Е.А. Коган, С.С. Барабашева // **Акушерство и гинекология №12 / 2020**

---

Подписано в печать: 23.06.2021  
Формат А5  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Тираж 100 Экз.  
Заказ №21957  
Типография ООО "Цифровичок"  
117149, г. Москва, ул. Азовская, д. 13