

*На правах рукописи*

**АФАНАСЬЕВА**

Марина Хивалиевна

**ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ ИЗЛИТИЕ ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОД:  
ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ И  
РОДОВОЗБУЖДЕНИЮ**

14.01.01–акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт - Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук

**Болотских Вячеслав Михайлович**

Профессор РАН, доктор биологических наук,  
профессор

**Полякова Виктория Олеговна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский  
государственный педиатрический  
медицинский университет» Минздрава России,  
профессор кафедры акушерства и гинекологии  
с курсом гинекологии детского возраста

**Гайдуков Сергей Николаевич**

доктор медицинских наук,  
ФГБОУ ВО «Северо-Западный  
государственный медицинский  
университет им. И.И. Мечникова»  
Минздрава РФ, профессор кафедры  
акушерства и гинекологии №2

**Савицкий Алексей Геннадьевич**

**Ведущая организация** ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 001.021.01 при ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им.  
Д.О. Отта» (199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, дом 3).  
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ««Научно-  
исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им.  
Д.О. Отта».

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**Ученый секретарь**  
**диссертационного совета**  
доктор медицинских наук

**Кузьминых Татьяна Ульяновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность проблемы.* Преждевременное излитие околоплодных вод (ПИОВ), способствует росту осложнений в родах и в послеродовом периоде со стороны матери, плода и новорожденного (Вдовиченко Ю.П., 2001, Дворянский С.А., Арасланова С.Н., 2002). Роды, осложненные ПИОВ при доношенной беременности, составляют по разным данным от 8,2% до 19,3% и не имеют тенденции к снижению (Romero R., Athaude N., 1999 Носарева С. В., 2003, Максимович О.Н., 2007). К осложнениям при ПИОВ относятся аномалии родовой деятельности, преждевременная отслойка плаценты, хориоамнионит, гипоксия плода и асфиксия новорождённого (Радзинский В.Е., Ордянец И.М., 2011).

При доношенном сроке беременности и отсутствии биологической готовности к родам у женщин с ПИОВ традиционный подход к родоразрешению включает проведение родовозбуждения в течение 2-4 часов от момента излития околоплодных вод, чтобы не допустить развитие длительного безводного промежутка. Активное ведение родов с ПИОВ характеризуется высоким процентом аномалий родовой деятельности, вследствие "незрелости" шейки матки и неполноценности нейроэндокринных механизмов регуляции маточной активности. Как следствие - часто отмечены в высоком проценте случаев гипоксия плода и кровотечение при преждевременной отслойке плаценты (Berghella V.,1996, Стрижаков А.Н.,1999, Чернуха Е.А.,2001). Попытки родовозбуждения у беременных с отсутствием биологической готовности к родам при ПИОВ малоэффективны и в 40-70% случаев диагностируется «отсутствие эффекта от родовозбуждения» (Romoff A., 2000, Джумалиева А.Д., 2006). Таким образом, весьма актуальной является разработка новых подходов к проведению родовозбуждения у беременных с ПИОВ.

Прогнозирование ПИОВ является важным этапом подготовки к родам, выбора тактики ведения беременных.

Единой точки зрения относительно патогенеза преждевременного излития околоплодных вод не существует. Возможной причиной морфологических изменений плодных оболочек являются нарушения в метаболизме коллагена (Vadillo-Ortega F., et al. 1990). Menon R., Fortunato S. et al. в 2006 г. проводили исследования активности матричных металлопротеиназ (ММП) в слюне с целью выявления пациенток с риском ПИОВ. В результате исследования установлено, что активность ММП9 выше в образцах слюны женщин с ПИОВ перед преждевременными родами по сравнению со всеми другими группами.

Буккальный эпителий - один из наиболее мобильных и активных видов ткани целостного организма, реагирующий на внешние воздействия и внутренние изменения метаболических процессов. Состояние клеток буккального эпителия отражает развитие в организме болезней органов кроветворения, периферической и центральной нервной системы, эндокринных органов и др. (Шахбазов В.Г., Григорьева Н.Н., Колупаева Т.Е., 1996). При разработке способов прогнозирования слабости родовой деятельности в 2011 году Дмитриева С.Л. и Хлыбова С.В. установили, что диагностическими признаками первичной слабости родовой деятельности являются снижение концентрации SH-групп в клетках буккального эпителия, повышение концентрации малонового диальдегида, снижение активности каталазы в слюне.

Особый интерес представляет разработка неинвазивных методов прогнозирования ПИОВ. В связи с вышеуказанными обстоятельствами актуальным является изучение сигнальных молекул, участвующих в регуляции клеточного гомеостаза плодных оболочек, как возможных биомаркеров прогнозирования ПИОВ, с целью определения тактики ведения беременных с угрозой ПИОВ.

**Целью исследования** явилась разработка неинвазивного метода прогнозирования преждевременного излития околоплодных вод посредством верификации ключевых сигнальных молекул, обеспечивающих целостность

плодных оболочек, и оптимизация тактики родовозбуждения беременных с ПИОВ.

***Задачи исследования:***

1. Уточнить факторы риска ПИОВ.
2. Верифицировать в плодных оболочках ключевые сигнальные молекулы, обеспечивающие их целостность.
3. Провести сравнительное изучение экспрессии верифицированных сигнальных молекул в буккальном эпителии беременных женщин при физиологическом течении беременности и при ПИОВ с последующей оценкой прогностической ценности сигнальных молекул, участвующих в регуляции гомеостаза плодных оболочек, а также верификация маркеров прогнозирования ПИОВ.
4. Разработать алгоритм прогнозирования ПИОВ по оценке экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии.
5. Разработать схему применения антигестагенов при родовозбуждении у пациенток с ПИОВ на фоне отсутствия биологической готовности к родам.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы**

Впервые проведен сравнительный анализ экспрессии сигнальных молекул в плодных оболочках и буккальном эпителии беременных женщин при физиологическом течении беременности и при ПИОВ. Для определения и возможности использования сигнальных молекул буккального эпителия в качестве иммуногистохимических маркеров прогнозирования ПИОВ проведен расчет коэффициентов корреляций оптической плотности экспрессии молекул в буккальном эпителии и плодных оболочках. Получены достоверные корреляции оптической плотности экспрессии в буккальном эпителии и плодных оболочках ММП9 как в группе с ПИОВ, так и в группе контроля.

Впервые сигнальные молекулы ММП9, коннексин 37 и коннексин 40 определены в качестве иммуногистохимических маркеров неинвазивного прогнозирования ПИОВ при оценке их экспрессии в буккальном эпителии.

### **Практическая значимость работы**

На основании анализа клинико-анамнестических данных уточнены факторы риска ПИОВ: повторнобеременные, повторнородящие, два искусственных аборта и более в анамнезе, два самопроизвольных аборта и более в анамнезе, анемия беременных, гестоз, угроза прерывания беременности на разных роках.

Предложен алгоритм иммуногистохимической верификации сигнальных молекул – маркеров ПИОВ, в буккальном эпителии.

Обоснована возможность прогнозирования ПИОВ с целью коррекции тактики ведения беременных с угрозой ПИОВ.

Разработана схема применения антигестагенов за 6 часов до родовозбуждения у беременных с ПИОВ на фоне отсутствия биологической готовности к родам, которая позволяет улучшить показатели исхода родов.

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

1. Ряд показателей акушерско-гинекологического анамнеза и особенностей течения беременности являются факторами риска развития ПИОВ: повторнобеременные, повторнородящие, два искусственных аборта и более в анамнезе, два самопроизвольных аборта и более в анамнезе, анемия беременных, гестоз, угроза прерывания беременности на разных роках.
2. Белки ММП9, коннексин 37 и коннексин 40 являются ключевыми сигнальными молекулами для обеспечения целостности плодных оболочек.
3. Верификация указанных молекул в буккальном эпителии позволяет рассматривать их в качестве неинвазивных маркеров ПИОВ.
4. Применение антигестагенов при родовозбуждении позволяет улучшить исход родов у пациенток с ПИОВ.

### **Апробация и внедрение результатов работы в практику**

Материалы диссертации доложены на XVI Всероссийском научном форуме «Мать и дитя», Москва, 2015; на IV Междисциплинарном медицинском конгрессе «Эффективное здравоохранение - залог здоровья общества», Пермь, 2015; на конференции «Репродуктивная медицина. Взгляд молодых», Санкт-Петербург, 2016; на IV Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства», Санкт-Петербург, 2017.

Результаты исследования внедрены в работу II отделения патологии беременных и родильного отделения ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», родильных отделений ГБУЗ «Родильный дом №18», ГБУЗ «Родильный дом №16», в учебный процесс кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии СПбГУ.

По теме диссертации опубликованы 10 научных работ, в том числе 4 статьи – в рецензируемых научных журналах и изданиях; получен патент на изобретение: «Способ подготовки к родовозбуждению беременных женщин с преждевременным излитием околоплодных вод на фоне отсутствия биологической готовности к родам при доношенном сроке» (Патент РФ № 2617536 от 25.04.2017).

#### **Личный вклад автора в исследование**

Автор участвовал в планировании исследования, составлении его дизайна. Сбор материала, проведение фундаментальных и клинических исследований, обобщение результатов исследования и статистическую обработку данных диссертант выполнил самостоятельно.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и указателя литературы. Глава 1 (обзор литературы) представляет собой анализ данных литературы по этиологии и патогенезу ПИОВ, особенностям строения буккального эпителия, диагностике и тактике ведения беременных с ПИОВ. Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, используемых в диссертационном исследовании. Глава 3 представляет изложение

собственных данных по изучению экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии и плодных оболочках, изучению особенностей течения родов у пациенток с ПИОВ в зависимости от выбранной тактики ведения. Глава 4 - обсуждение полученных результатов. Текст диссертации изложен на 115 страницах, содержит 10 таблиц, иллюстрирован 49 рисунками. Список литературы содержит 129 источников, из них отечественных – 59, зарубежных – 70.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования.**

С целью разработки методов прогнозирования ПИОВ и выявления факторов риска данной патологии изучены особенности соматического и акушерско-гинекологического анамнеза, течение и характер осложнений настоящей беременности и родов, исходы для матери и плода у беременных, проходивших обследование и лечение в ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта» в период с 2013 по 2015 гг. Всего были изучены особенности беременности, родов и послеродового периода у 70 женщин с ПИОВ (основная группа – I) и у 70 женщин со своевременным излитием околоплодных вод (контрольная группа – II).

Критерии включения в основную группу: преждевременное излитие околоплодных вод; срок беременности 37-40 недель.

Критерии исключения из основной группы: признаки восходящей инфекции (лейкоцитоз  $>15 \times 10^6$ , повышение температуры тела); тяжелая акушерская патология (субкомпенсированная и декомпенсированная плацентарная недостаточность, тяжелый гестоз и т.д.); тяжелые формы хронических соматических заболеваний (бронхиальная астма, сахарный диабет, надпочечниковая недостаточность, хронический пиелонефрит и т.д.).

Критерии включения в группу контроля: своевременное излитие околоплодных вод; срок беременности 37-40 недель.

Критерии исключения из группы контроля: преждевременное излитие околоплодных вод; признаки гнойно-септических заболеваний (лейкоцитоз



$>15 \times 10^6$ , повышение температуры тела); тяжелая акушерская патология (субкомпенсированная и декомпенсированная плацентарная недостаточность, тяжелый гестоз и т.д.); тяжелые формы хронических соматических заболеваний (бронхиальная астма, сахарный диабет, надпочечниковая недостаточность, хронический пиелонефрит и т.д.).

В лаборатории клеточной биологии, отдел патоморфологии ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта» проведено изучение экспрессии маркеров: VEGF, ММП 9, коннексина 37, коннексина 40, эндорфинов, энкефалинов, актина, миозина в буккальном эпителии и плодных оболочках у 70 пациенток основной группы (с ПИОВ при доношенном сроке беременности) и у 70 пациенток контрольной группы (со своевременным излитием околоплодных вод).

С целью верификации ключевых сигнальных молекул в основной группе производился забор буккального эпителия после преждевременного излития околоплодных вод, после рождения последа - забор плодных оболочек в месте разрыва. В контрольной группе производился забор буккального эпителия при вступлении в роды, после рождения последа - забор плодных оболочек в месте разрыва. Образцы буккального эпителия получали стерильными одноразовыми микрощетками, предварительно прополоскав рот водой. После взятия соскоба щеточку помещали в стерильную одноразовую пробирку «Эппендорф» с физиологическим раствором и интенсивно вращали, чтобы смыть клетки со щеточки. После рождения последа стерильными ножницами вырезали образцы плодных оболочек в месте их разрыва. Фрагменты плодных оболочек фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (pH 7,20), проводили проводку материала с помощью автоматической станции Leica TP1020 (Leica, Германия) и заливали в парафин согласно стандартной гистологической схеме. Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин.

Иммуноцитохимическое и иммуногистохимическое исследование буккального эпителия и плодных оболочек проводили с использованием

первичных и вторичных моноклональных мышинных антител к ММП9 («Novocastra»), к эндорфинам, энкефалинам, VEGF, актину, миозину, коннексинам 37,40 («Dako»).

Визуализацию иммуноцитохимической реакции (буккальный эпителий) проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином («Novocastra»). Конфокальная иммунофлуоресцентная лазерная микроскопия проводилась на фиксированных клетках буккального эпителия (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 585).

С целью разработки методов прогнозирования ПИОВ была набрана группа беременных с угрозой ПИОВ - 47 пациенток (группа III), на основании уточненных ранее факторов риска ПИОВ. Критерии включения в группу: срок беременности 37-40 недель; повторнбеременные; повторнородящие; два искусственных аборта и более в анамнезе; два самопроизвольных аборта и более в анамнезе; анемия беременных; гестоз; угроза прерывания беременности.

В группе пациенток с угрозой ПИОВ производился забор буккального эпителия при поступлении на дородовое отделение. После родов эти пациентки были распределены на 3 подгруппы: с преждевременным излитием околоплодных вод (IIIa- 38 пациенток), ранним излитием околоплодных вод (IIIb- 3 пациентки), своевременным излитием околоплодных вод (IIIc-6 пациенток). В полученных образцах буккального эпителия проведено изучение экспрессии VEGF, ММП9, коннексина 37, коннексина 40, эндорфинов, энкефалинов, актина, миозина. Проведён сравнительный анализ экспрессии указанных молекул во всех трёх группах.

С целью разработки новых способов проведения родовозбуждения при ПИОВ проведено изучение исхода родов у пациенток с ПИОВ при доношенном сроке на фоне отсутствия биологической готовности к родам («созревающая шейка матки»), наличием противопоказаний к активно-

выжидательной тактике и отсутствием показаний для оперативного родоразрешения на момент ПИОВ. В основной группе, в 67 случаях, женщинам после ПИОВ назначался однократно мифепристон 200 мг и через 6 часов, при отсутствии родовой деятельности, проводилось родовозбуждение. В группе сравнения, в 63 случаях, проводилось родовозбуждение через 6 часов после излития околоплодных вод.

По возрасту, паритету, особенностям акушерско-гинекологического и соматического анамнезов данные группы были сопоставимы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических и непараметрических методов статистики. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли t-критерий Стьюдента, а при сравнении частотных величин –  $\chi^2$ -критерий Пирсона и точный метод Фишера. Многомерный факторный анализ был применен для верификации ключевых сигнальных молекул в результате оценки комплексного характера изменений. Проведено вычисление факторных нагрузок ( $a$ ), которые интерпретируются как корреляции между соответствующими исследуемыми показателями и отдельными факторами. Для выявления прогностической ценности исследованных параметров, вывода формулы расчета вероятности ПИОВ и проверка работы алгоритма его прогнозирования использовали линейный дискриминантный анализ. Статистическая обработка материала выполнялась с использованием стандартного статистического пакета программ Statistica 10.0 (Statistica for Windows v.6.0). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### ***Клиническая характеристика обследованных пациенток***

У 70 пациенток основной группы (с ПИОВ при доношенном сроке беременности) и у 70 пациенток контрольной группы (со своевременным излитием околоплодных вод) был произведён сравнительный анализ

акушерско-гинекологического, соматического анамнеза, особенностей родового акта и послеродового периода. При анализе анамнестических данных отмечено, ПИОВ достоверно чаще встречается у повторнобеременных (в основной группе –  $62,9 \pm 5,8\%$ , в контрольной –  $32,9 \pm 5,6\%$ ,  $p < 0,01$ ) и у повторнородящих (в основной группе –  $48,6 \pm 5,97\%$ , в контрольной –  $24,3 \pm 5,1\%$ ,  $p < 0,01$ ). Достоверно реже ПИОВ встречается у первобеременных (в основной группе –  $37,1 \pm 5,8\%$ , в контрольной –  $67,1 \pm 5,6\%$ ,  $p < 0,01$ ) и у первородящих (в основной группе –  $51,4 \pm 5,97\%$ , в контрольной –  $75,7 \pm 5,1\%$ ,  $p < 0,01$ ). Также при ПИОВ встречаются достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) женщины, у которых было 2 и более аборт (24,3±5,1% и 5,7±2,8%), а также 2 и более самопроизвольных выкидышей (27,1±5,3% и 8,6±3,4%). При анализе особенностей соматического анамнеза установлено, что в основной группе с ПИОВ достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) встречаются воспалительные заболевания мочевыделительной системы ( $32,9 \pm 5,6\%$  и  $15,7 \pm 4,4\%$ ), ожирение ( $25,7 \pm 5,2\%$  и  $11,4 \pm 3,8\%$ ). Вегето-сосудистая дистония в группе с ПИОВ встречалась достоверно реже ( $11,4 \pm 3,8\%$  и  $27,1 \pm 5,3\%$ ),  $p < 0,05$ . Достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) в группе с ПИОВ встречалась угроза прерывания беременности на разных сроках ( $44,3 \pm 5,9\%$  и  $21,4 \pm 4,9\%$ ), анемия беременных ( $37,1 \pm 5,8\%$  и  $12,9 \pm 4,01\%$ ), гестоз ( $61,4 \pm 5,8\%$  и  $35,7 \pm 5,7\%$ ). У пациенток перенесших ОРВИ на фоне беременности чаще происходило ПИОВ ( $25,7 \pm 5,2\%$  и  $8,6 \pm 3,4\%$ ),  $p < 0,05$ . Также в основной группе с ПИОВ достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) встречалась хроническая плацентарная недостаточность ( $31,4 \pm 5,6\%$  и  $14,3 \pm 4,2\%$ ) и тазовое предлежание плода ( $18,6 \pm 4,6\%$  и  $5,7 \pm 2,8\%$ ). У 86% обследованных женщин с ПИОВ обнаружена урогенитальная инфекция. Достоверно чаще ( $p < 0,001$ ) при ПИОВ выявлялся микоплазменная инфекция ( $41,5 \pm 4,5\%$  и  $18,4 \pm 3,6\%$ ) и уреоплазменная инфекция ( $33,9 \pm 4,4\%$  и  $14,9 \pm 3,3\%$ ).

Для выявления наиболее значимых факторов риска развития ПИОВ в основной группе определен относительный риск (отношение шансов, доверительный интервал). Для этой цели проведен многофакторный

статистический анализ с помощью программы статистики SPSS-19. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Влияние предрасполагающих факторов на развитие преждевременного излития околоплодных вод

Фактор риска	Отношение шансов (Odds Ratio – OR)	Доверительный интервал Confidence Interval – 95%		P
		min	max	
Повторнобеременные	3,46	1,72	6,93	<0,001
Двое аборт и более	5,29	1,68	16,68	<0,01
Два выкидыша и более	3,97	1,48	10,68	<0,01
Повторнородящие	2,94	1,43	6,05	<0,01
Воспалительные заболевания мочевыделительной системы	2,62	1,16	5,93	<0,05
Ожирение	2,68	1,08	6,67	<0,05
ВСД	0,35	0,14	0,86	<0,05
ОРВИ при беременности	3,69	1,37	9,97	<0,05
Гестоз	2,87	1,44	5,69	<0,01
Анемия беременных	4,01	1,71	9,38	<0,01
Угроза прерывания беременности	2,91	1,39	6,11	<0,01
Тазовое предлежание	3,76	1,16	12,16	<0,05
Плацентарная недостаточность	2,75	1,19	6,36	<0,05
Микоплазменная инфекция	4,62	1,24	17,18	<0,05
Уреаплазменная инфекция	3,85	1,33	11,20	<0,05

По результатам рассчитанного коэффициента соотношения шансов, можно утверждать, что факторами риска преждевременного излития околоплодных вод являются два аборта и более в анамнезе, два выкидыша и более в анамнезе, гестоз, анемия, угроза прерывания беременности на разных сроках.

В группу риска по развитию ПИОВ входят повторнобеременные и повторнородящие пациентки.

### **Разработка биомаркеров прогнозирования преждевременного излития околоплодных вод**

При проведении сравнительной оценки оптической плотности экспрессии сигнальных молекул установлено, что экспрессия ММП9 достоверно выше в группе с ПИОВ по сравнению с группой контроля как в буккальном эпителии ( $1,7497 \pm 0,0083$  у.е. и  $0,9533 \pm 0,0099$  у.е.), так и в плодных оболочках ( $1,936 \pm 0,0092$  у.е. и  $1,2266 \pm 0,0136$  у.е.),  $p < 0,001$  (рисунок 1).

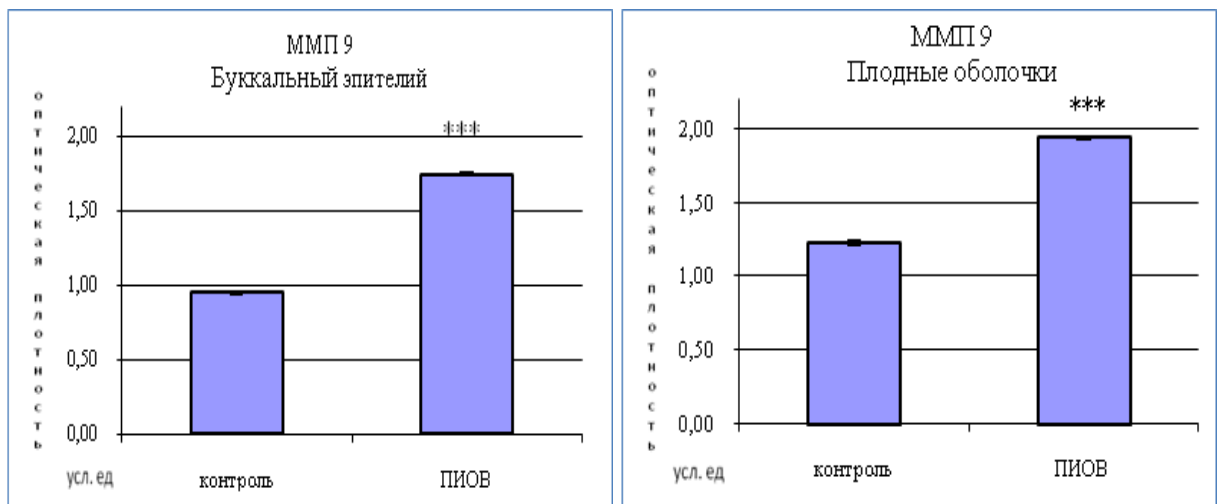


Рисунок 1 - Оптическая плотность экспрессии ММП9 в буккальном эпителии и плодных оболочках в группе контроля и группе с ПИОВ

\*\*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с показателем контрольной группы

Оптическая плотность экспрессии VEGF у пациенток с ПИОВ достоверно ниже, чем у пациенток со своевременным излитием околоплодных вод как в буккальном эпителии ( $2,1666 \pm 0,0081$  у.е. и  $2,6086 \pm 0,0138$  у.е.), так и в плодных оболочках ( $1,2319 \pm 0,0088$  у.е. и  $1,716 \pm 0,0073$  у.е.),  $p < 0,001$ .

Также получено достоверное уменьшение оптической плотности экспрессии коннексина 37, коннексина 40 в группе с ПИОВ по сравнению с группой контроля как в буккальном эпителии ( $0,859429 \pm 0,014373$  у.е. и  $1,227429 \pm 0,006714$  у.е.;  $1,694429 \pm 0,012629$  у.е. и  $2,308571 \pm 0,011695$  у.е.), так

и в плодных оболочках ( $1,738143 \pm 0,018383$  у.е. и  $0,907714 \pm 0,007991$  у.е.;  $2,228571 \pm 0,007884$  у.е. и  $2,050143 \pm 0,006469$  у.е.),  $p < 0,001$ .

Достоверной разницы оптической плотности экспрессии эндорфина в буккальном эпителии в группе с ПИОВ по сравнению с группой контроля не получено. В плодных оболочках в группе с ПИОВ оптическая плотность экспрессии эндорфина достоверно ниже, чем в группе контроля ( $1,570429 \pm 0,008128$  у.е. и  $1,608429 \pm 0,009587$  у.е.),  $p < 0,01$ .

Оптическая плотность экспрессии энкефалина в группе с ПИОВ в буккальном эпителии ниже ( $1,952714 \pm 0,009946$  у.е. и  $2,100429 \pm 0,011729$  у.е.), а в плодных оболочках выше, чем в группе контроля ( $1,671 \pm 0,010023$  у.е. и  $1,402857 \pm 0,010093$  у.е.)  $p < 0,001$ .

Оптическая плотность актина в буккальном эпителии при ПИОВ выше, чем в группе контроля ( $0,405 \pm 0,015026$  у.е. и  $0,306571 \pm 0,008476$  у.е.),  $p < 0,001$ , а в плодных оболочках ниже, чем в группе контроля ( $0,600143 \pm 0,009308$  у.е. и  $1,394429 \pm 0,016034$  у.е.),  $p < 0,001$ .

Достоверной разницы оптической плотности экспрессии миозина в буккальном эпителии в группе с ПИОВ по сравнению с группой контроля не получено. В плодных оболочках в группе с ПИОВ оптическая плотность экспрессии миозина достоверно ниже, чем в группе контроля ( $0,684429 \pm 0,006536$  у.е. и  $0,71400 \pm 0,007574$  у.е.),  $p < 0,01$ .

Для всестороннего и компактного описания объектов исследования и получения обобщенной информации о структуре связей между исследованными показателями и выбора наиболее значимых из них был применен многомерный факторный анализ, который позволяет наилучшим образом охарактеризовать реальное поведение исследуемой совокупности признаков и оценить надежность и точность выводов, сделанных на основании полученных данных. Проведен факторный анализ 16 иммуногистохимических показателей для ПИОВ. В результате анализа установлено, что наименее информативные показатели к фактору, сопряженному с наличием или отсутствием ПИОВ, являются эндорфин,

энкефалин, актин и миозин в буккальном эпителии; эндорфин и миозин в плодных оболочках, несмотря на то, что большинство из них по значениям  $M \pm m$ , имеют достоверные различия между исследованными выборками. Однако результаты данного анализа показывают, что отмеченные отличия являются следствием влияния иных факторов, не связанных с ПИОВ и не учтенных при выборе критериев включения/исключения. Остальные показатели, включая наличие ПИОВ, являются достоверно сопряженными и имеют достаточно высокие значения факторных нагрузок ( $|a| > 0,85$ ).

Для возможности использования сигнальных молекул буккального эпителия в качестве иммуногистохимических маркеров прогнозирования ПИОВ проведен расчет коэффициентов корреляций оптической плотности экспрессии молекул в буккальном эпителии и плодных оболочках.

Получены достоверные корреляции оптической плотности экспрессии в буккальном эпителии и плодных оболочках ММП9 как в группе с ПИОВ ( $r=0,747$ ,  $p<0,05$ ), так и в группе контроля ( $r=0,771$ ,  $p<0,05$ ). Также выявлены достоверные корреляции оптической плотности экспрессии в буккальном эпителии и плодных оболочках VEGF в группе с ПИОВ ( $r=0,749$ ,  $p<0,05$ ) и группе контроля ( $r=0,701$ ,  $p<0,05$ ).

С целью разработки методов прогнозирования ПИОВ была обследована группа беременных с угрозой ПИОВ при доношенном сроке беременности.

Оптическая плотность ММП9 достоверно больше в подгруппе с ПИОВ по сравнению с подгруппой со своевременным излитием околоплодных вод ( $1,7932 \pm 0,0132$  у.е. и  $1,1017 \pm 0,0715$  у.е.),  $p<0,001$ . Также, оптическая плотность ММП9 в подгруппе с ранним излитием околоплодных вод достоверно больше по сравнению с подгруппой со своевременным излитием околоплодных вод ( $1,6433 \pm 0,0203$  у.е. и  $1,1017 \pm 0,0715$  у.е.),  $p<0,01$ . На рисунке 2 приведен пример экспрессии ММП 9 в буккальном эпителии у пациентки из группы с ПИОВ. Синим цветом флуоресцируют ядра клеток, а красным цветом флуоресцирует цитоплазма, в которой экспрессируется ММП 9.



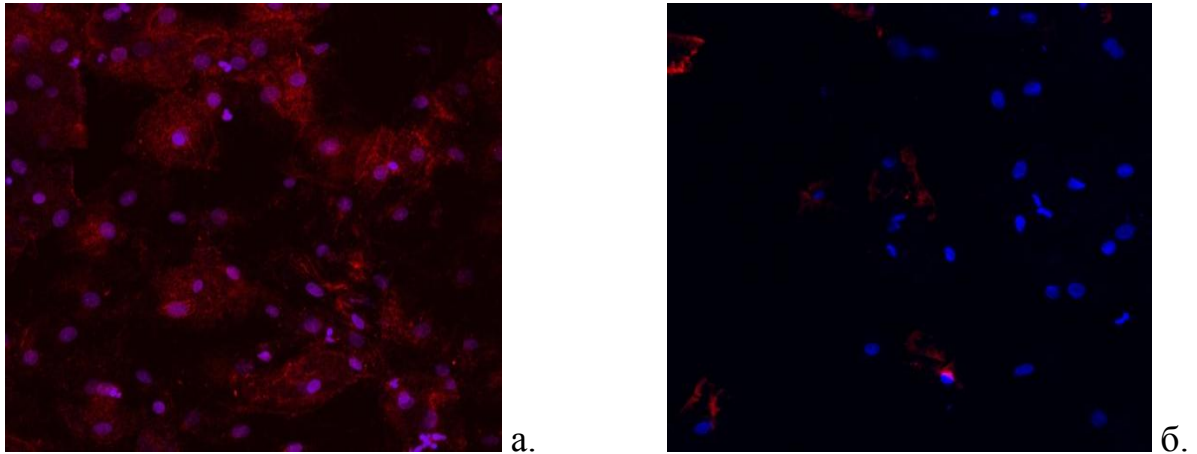


Рисунок 2 - Экспрессия ММП 9 в буккальном эпителии в группе с ПИОВ (а) и в контрольной группе (б). Конфокальная иммунофлуоресцентная лазерная микроскопия, х400

Многие исследователи утверждают, что ПИОВ происходит в результате деструкции коллагеновых волокон плодных оболочек под действием матричных металлопротеиназ.

Полученные данные подтверждают зависимость целостности плодных оболочек от экспрессии ММП9 и позволяют использовать указанную молекулу в качестве неинвазивного маркера прогнозирования ПИОВ.

### **Расчет вероятности ПИОВ**

Для выявления прогностической ценности исследованных параметров, вывода формулы расчета вероятности ПИОВ и проверки работы алгоритма его прогнозирования использован линейный дискриминантный анализ.

На основании проведенного дискриминантного анализа из 16 показателей для постановки диагноза угрозы ПИОВ необходимыми являются 3 показателя в буккальном эпителии: ММП 9, коннексин 37 и коннексин 40 (критерий Вилкса-Лямбда).

Формула расчета вероятности ПИОВ:

Вероятность своевременного излития околоплодных вод =

$$= -304,651 + 262,227 * X + 164,266 * Y + (-10,202) * Z$$

$$\text{Вероятность ПИОВ} = -400,363 + 361,898 * X + 133,990 * Y + 0,968 * Z$$

Где X- оптическая плотность ММП9 в буккальном эпителии, усл. ед.

Y- оптическая плотность коннексина 40 в буккальном эпителии, усл. ед.

Z- оптическая плотность коннексина 37 в буккальном эпителии, усл. ед.

При проверке работы данной формулы программа относила пациенток в группу угрожаемую по ПИОВ из подгрупп с ранним и преждевременным излитием околоплодных вод в 100% случаев. При расчете вероятности ПИОВ с показателями подгруппы со своевременным излитием околоплодных вод, программа определила своевременное излитие околоплодных вод в 83,3% случаев. В 16,7% - получен ложно-положительный результат по ПИОВ.

Таким образом, при проведении расчетов по указанной формуле, если вероятность по контролю меньше, чем вероятность по ПИОВ, то с вероятностью 83,3% можно предположить, что у данной пациентки произойдет ПИОВ.

**Способ применения антигестагенов при родовозбуждении у пациенток с преждевременным излитием околоплодных вод на фоне отсутствия биологической готовности к родам при доношенном сроке**

С целью разработки новых способов проведения родовозбуждения при ПИОВ проведено изучение исхода родов у пациенток с ПИОВ при доношенном сроке на фоне отсутствия оптимальной биологической готовности к родам («созревающая шейка матки»), наличием противопоказаний к активно-выжидательной тактике и отсутствием показаний для оперативного родоразрешения на момент ПИОВ. В основной группе, в 67 случаях, женщинам после ПИОВ назначался однократно мифепристон 200 мг и через 6 часов, при отсутствии родовой деятельности, проводилось родовозбуждение. В группе сравнения, в 63 случаях, проводилось родовозбуждение через 6 часов после излития околоплодных вод. Полученные данные показаны в таблице 2.

Таблица 2 - Особенности течения родов у пациенток с ПИОВ на фоне подготовки к родовозбуждению с помощью мифепристона и без применения антигестагенов

Показатель	I Женщины с ПИОВ, получившие Мифепристон 200мг перорально за 6 часов до родовозбуждения  (основная группа)  n=67		II Женщины, которым проводилось родовозбуждение через 6 часов после ПИОВ без применения антигестагенов  (группа сравнения)  n=63		P
	N	M±m,%	N	M±m,%	
Слабость родовой деятельности	8	11,9±3,96	25	39,7±6,2	p<0,01
Дискоординация родовой деятельности	3	4,5±2,5	16	25,4±5,5	p<0,01
Быстрые роды	3	4,5±2,5	4	6,3±3,1	
Гипоксия плода в родах	7	10,5±3,8	20	31,8±5,9	p<0,01
Асфиксия новорожденного	1	1,5±1,5	4	6,3±3,1	
Кесарево сечение	10	14,9±4,4	23	36,5±6,1	p<0,01
Вакуум-экстракция	3	4,5±2,5	3	4,8±2,7	
Разрывы шейки матки 2 степени	2	3,2±2,2	8	12,7±4,2	
Перинеотомия	28	41,8±6,1	23	36,5±6,1	
Приращение плаценты, дефект плацентарной ткани	4	5,97±2,9	5	7,9±4,4	
Отсутствие эффекта от родовозбуждения	5	7,5±3,2	19	30,2±5,8	p<0,01
Спонтанное развитие родовой деятельности	9	13,4±4,2	1	1,6±1,6	p<0,05

Установлено, что в группе сравнения достоверно чаще развивается дискоординация родовой деятельности (25,4±5,5% и 4,5±2,5%, соответственно, p<0,01) и слабость родовой деятельности в сравнении с основной группой (39,7±6,2% и 11,9±3,96%, соответственно, p<0,01). Вероятно, что уменьшение частоты аномалий сократительной деятельности матки в основной группе позволило снизить частоту гипоксии плода у

пациенток данной группы по отношению к группе сравнения ( $10,5\pm 3,8\%$  и  $31,8\pm 5,9\%$ , соответственно,  $p<0,01$ ). Асфиксия новорожденного в группе сравнения встречалась несколько чаще в группе сравнения, чем в основной ( $6,3\pm 3,1\%$  и  $1,5\pm 1,5\%$ , соответственно), но разница между группами недостоверна. Отсутствие эффекта от родовозбуждения в основной группе отмечалось реже ( $7,5\pm 3,2\%$ ), чем в группе сравнения ( $30,2\pm 5,8\%$ ) ( $p<0,01$ ). Роды заканчивались путем операции кесарева сечения достоверно чаще в группе сравнения, чем в основной группе ( $36,5\pm 6,1\%$  и  $14,9\pm 4,4\%$ ), соответственно,  $p<0,01$ ). Часть беременных основной группы ( $13,4\pm 4,2\%$ ) самостоятельно вступила в роды в течение 6 часов после ПИОВ и приёма мифепристона без родовозбуждения. В группе сравнения самостоятельно вступила в роды 1 пациентка ( $1,6\pm 1,6\%$ ),  $p<0,05$ .

В группе сравнения чаще, чем в основной встречались разрывы шейки матки 2 степени ( $3,2\pm 2,2\%$  и  $12,7\pm 4,2\%$ , соответственно). При сравнении обеих групп по частоте выполнения ручного обследования полости матки, вакуум - экстракции плода и перинеотомии достоверных различий между группами не выявлено. Также не выявлено достоверной разницы между группами по частоте встречаемости быстрых родов.

## ВЫВОДЫ

1. При помощи многофакторного статистического анализа были уточнены наиболее значимые факторы риска преждевременного излития околоплодных вод при доношенном сроке для определения беременных в группу с угрозой ПИОВ: повторнобеременные, повторнородящие, два искусственных аборта и более в анамнезе, два самопроизвольных аборта и более в анамнезе, анемия беременных, гестоз, угроза прерывания беременности на разных роках.
2. При иммуногистохимическом исследовании в плодных оболочках как в группе с ПИОВ, так и в группе контроля, впервые верифицированы сигнальные молекулы – ММП9 ( $1,936\pm 0,0092$  у.е. и  $1,2266\pm 0,0136$  у.е.), коннексин 37 ( $1,738143\pm 0,018383$  у.е. и  $2,228571\pm 0,007884$  у.е.), коннексин 40 ( $0,907714\pm 0,007991$  у.е. и  $2,050143\pm 0,006469$  у.е.) и VEGF ( $1,2319\pm 0,0088$

у.е. и  $1,716 \pm 0,0073$  у.е.), экспрессия которых является одним из ключевых факторов в обеспечении целостности плодных оболочек ( $p < 0,001$ ).

3. Также верифицированы в буккальном эпителии в группе с ПИОВ и в группе контроля сигнальные молекулы ММП9 ( $1,7497 \pm 0,0083$  у.е. и  $0,9533 \pm 0,0099$  у.е.), коннексин 37 ( $0,859429 \pm 0,014373$  у.е. и  $1,694429 \pm 0,012629$  у.е.), коннексин 40 ( $1,227429 \pm 0,006714$  у.е. и  $2,308571 \pm 0,011695$  у.е.), VEGF ( $2,1666 \pm 0,0081$  у.е. и  $2,6086 \pm 0,0138$  у.е.), ( $p < 0,001$ ). Установлены достоверные корреляции оптической плотности экспрессии ММП9 в плодных оболочках и буккальном эпителии как у пациенток в контрольной группе ( $r = 0,771$ ,  $p < 0,05$ ), так и в группе с ПИОВ ( $r = 0,747$ ,  $p < 0,05$ ). Установлены достоверные корреляции оптической плотности экспрессии VEGF в плодных оболочках и буккальном эпителии как у пациенток в контрольной группе ( $r = 0,701$ ,  $p < 0,05$ ), так и в группе с ПИОВ ( $r = 0,749$ ,  $p < 0,05$ ).
4. Значимыми для расчета вероятности ПИОВ являются следующие сигнальные молекулы: ММП 9, коннексин 37, коннексин 40.
5. Применение антигестагенов за 6 часов до родовозбуждения у пациенток с ПИОВ на фоне отсутствия биологической готовности к родам и наличием противопоказаний к активно-выжидательной тактике по сравнению с группой, в которой родовозбуждение проводилось через 6 часов без применения антигестагенов, существенно снизило частоту слабости родовой деятельности ( $11,9 \pm 3,96\%$  и  $39,7 \pm 6,2\%$ ), дискоординации родовой деятельности ( $4,5 \pm 2,5\%$  и  $25,4 \pm 5,5\%$ ), гипоксии плода ( $10,5 \pm 3,8\%$  и  $31,8 \pm 5,9\%$ ), кесарева сечения ( $14,9 \pm 4,4\%$  и  $36,5 \pm 6,1\%$ ). Применение антигестагенов за 6 часов до родовозбуждения у пациенток с ПИОВ на фоне отсутствия биологической готовности по сравнению с группой без применения антигестагенов достоверно снизило частоту отсутствия эффекта от родовозбуждения ( $7,5 \pm 3,2\%$  и  $30,2 \pm 5,8\%$ ),  $p < 0,01$ , и увеличило частоту спонтанного развития родовой деятельности без применения утеротонических препаратов ( $13,4 \pm 4,2\%$  и  $1,6 \pm 1,6\%$ )  $p < 0,05$ .

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наличии наиболее значимых факторов риска преждевременного излития околоплодных вод определять данных пациенток в отдельную группу для проведения иммуногистохимического определения показателей экспрессии ММП 9, коннексинов 37 и 40 в буккальном эпителии беременных с последующим расчетом вероятности ПИОВ.
2. Группу риска по ПИОВ вести согласно алгоритму (рисунок 3):

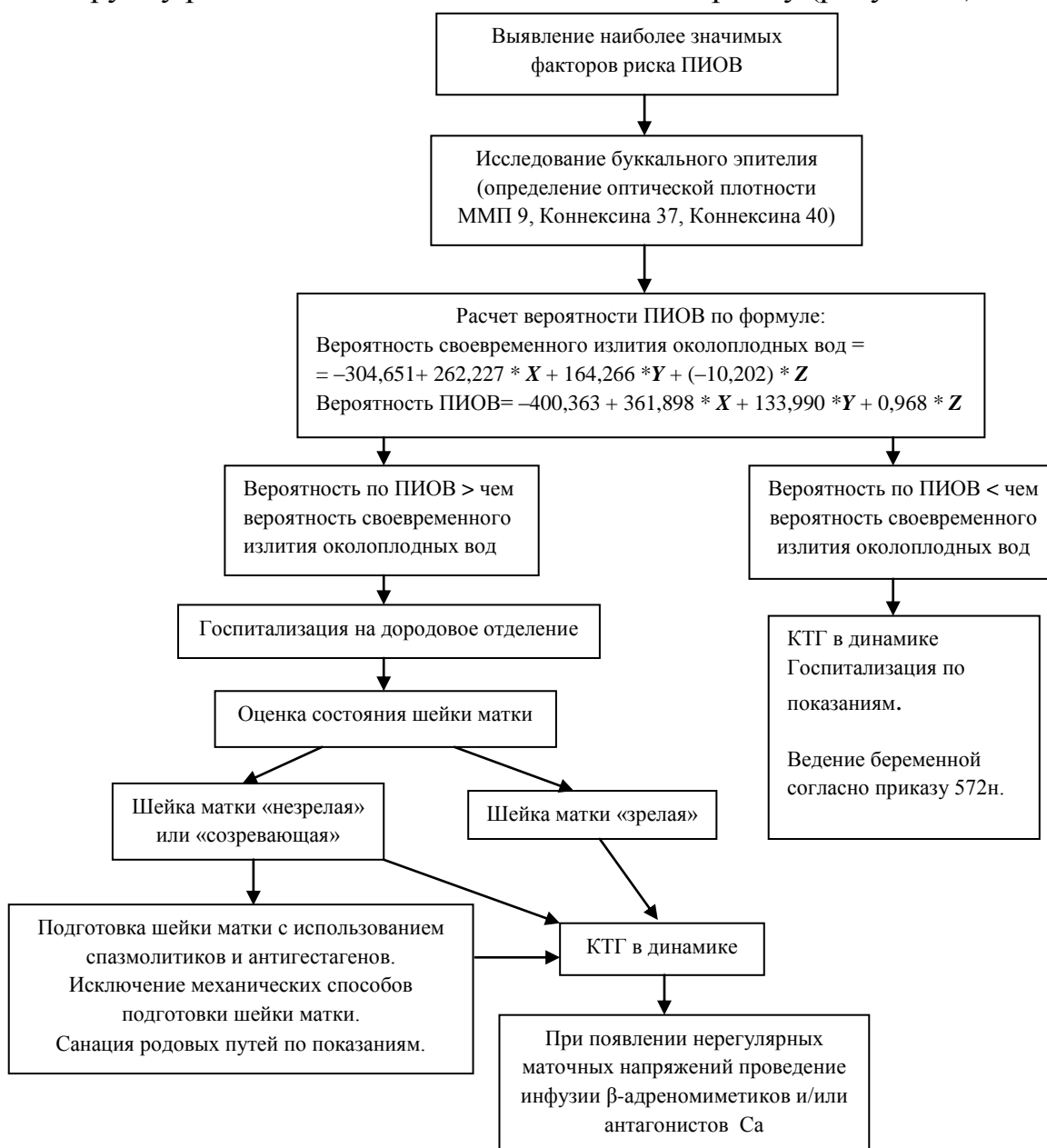


Рисунок 3 — Алгоритм ведения пациенток с угрозой ПИОВ при доношенном сроке

3. При ПИОВ на фоне отсутствия биологической готовности к родам у беременных с доношенным сроком, наличием противопоказаний к активно-выжидательной тактике и отсутствием показаний для оперативного родоразрешения на момент ПИОВ рекомендуется применять антигестагены (мифепристон) 200 мг перорально за 6 часов до родовозбуждения.

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

- 1.Афанасьева, М. Х. **Преждевременное излитие околоплодных вод (современные взгляды на этиологию и патогенез, перспективы прогнозирования)** / М.Х. Афанасьева, В.М. Болотских, В.О. Полякова //Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – Т. 63, №. 3.- С. 4-11.
- 2.Афанасьева, М. Х. **Особенности проведения родовозбуждения у пациенток с преждевременным излитием околоплодных вод на фоне отсутствия биологической готовности к родам при доношенном сроке** / М.Х. Афанасьева, В.М. Болотских, Т.У. Кузьминых // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65, №. 1.-С. 4-8.
- 3.Афанасьева, М. Х. **Сигнальные молекулы как биомаркеры прогнозирования преждевременного излития околоплодных вод (клинико-диагностические аспекты)** / М.Х. Афанасьева, В.М. Болотских, В.О. Полякова //Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65, №. 6. - С. 19-27.
- 4.Афанасьева, М. Х. **Клиническая оценка различных схем родовозбуждения у пациенток с преждевременным излитием околоплодных вод при доношенном сроке** / М.Х. Афанасьева, В.М. Болотских // Материалы XVI Всероссийского научного форума «Мать и дитя». - М. 2015.- С. 12-13.
- 5.Афанасьева, М. Х. **Особенности течения родов при преждевременном излитии околоплодных вод** / М.Х. Афанасьева, В.М. Болотских // Сборник тезисов XXI Всероссийского конгресса с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь: от менархе до менопаузы». - М. 2015. - С. 17-18.

- 6.Афанасьева, М. Х. Метод прогнозирования преждевременного излития околоплодных вод с определением специфичных сигнальных молекул в буккальном эпителии / М.Х. Афанасьева // Журнал акушерства и женских болезней. — 2016. — Т.65, спецвып. — С. 6-7. — (Международная конференция «Репродуктивная медицина: взгляд молодых». – СПб., 2016).
- 7.Болотских, В. М. **Преждевременное излитие околоплодных вод: проблемы диагностики и родовозбуждения** / В.М. Болотских, М.Х. Афанасьева, В.Ю. Борисова //Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. 64, №. 2.-С. 18-24.
- 8.Болотских, В.М. Этиологические факторы преждевременного излития околоплодных вод при недоношенном сроке беременности / В.М. Болотских, М.Х. Афанасьева // Журнал акушерства и женских болезней. — 2015. — Т.64, спецвып. — С. 20—21. — (Материалы III Национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства».)
- 9.Пат. 2617536 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А 61 К 31 / 567 А 61 Р 15 / **04. Способ подготовки к родовозбуждению беременных женщин с преждевременным излитием околоплодных вод на фоне отсутствия биологической готовности к родам при доношенном сроке.** / В.М. Болотских, М.Х. Афанасьева; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» - № 2015127593; заявл. 08.07.15; опубл. 25.04.17, Бюл. № 12.
- 10.Этиологические факторы преждевременного излития околоплодных вод / М.Х. Афанасьева, О.Л. Мозалева, А.А. Пашина, В.М. Болотских // Материалы IX Международного конгресса по репродуктивной медицине. - 2015. - С. 158-159.