

## УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И АКТИВНОСТЬ ДНКАЗЫ I ПРИ НОРМАЛЬНОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

К. Г. Аветисова<sup>1</sup> ✉, С. В. Костюк<sup>2</sup>, Э. В. Костюк<sup>2</sup>, Е. С. Ершова<sup>2</sup>, Г. В. Шмарина<sup>2</sup>, Н. Н. Вейко<sup>2</sup>, Д. С. Спиридонов<sup>1</sup>, П. А. Клименко<sup>1</sup>, М. А. Курцер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра акушерства и гинекологии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярной биологии, Медико-генетический научный центр, Москва

При патологии плаценты происходит активация апоптотических процессов в трофобласте, что сопровождается повышением в кровотоке матери концентрации микровезикул, содержащих плацентарную ДНК (или ДНК плода). Фрагменты ДНК плода стимулируют выброс нейтрофилами участков ядерной и/или митохондриальной ДНК. Таким образом, при осложненной беременности следует ожидать значительного увеличения общей концентрации внутриклеточной ДНК (вкДНК) в плазме матери. Целью работы было исследование совместных изменений концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКаза I в плазме небеременных и беременных женщин. В исследовании принимали участие 40 здоровых небеременных женщин, 40 беременных женщин с нормально протекающей беременностью и 35 пациенток с внутриутробной задержкой роста плода (ВЗРП). Мы не обнаружили повышения уровня суммарной вкДНК у пациенток с осложненной беременностью. Более того, концентрация вкДНК в плазме пациенток была даже ниже (статистически незначимо), чем соответствующие показатели в плазме здоровых беременных и небеременных женщин. Так, значение медианы концентрации вкДНК в группе здоровых небеременных женщин составило 75,5 нг/мл, в группе здоровых беременных женщин этот показатель достигал 78,0 нг/мл, у пациенток с ВЗРП он был равен 42,1 нг/мл. В то же время мы обнаружили достоверное повышение активности ДНКаза I в плазме женщин с ВЗРП. Медиана активности ДНКаза I в группах здоровых беременных и небеременных женщин составила соответственно 3,0 и 3,4 IU/мл. У пациенток с ВЗРП различной степени тяжести этот показатель достигал 6,3 IU/мл ( $p < 0,001$ ). Повышенная активность ДНКаза I в плазме женщин с патологией беременности косвенно свидетельствует о транзитном повышении у них уровня циркулирующей вкДНК. Полученные результаты показывают, что высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Однако если учитывать три показателя — концентрацию вкДНК, активность ДНКаза I и отношение вкДНК/ДНКаза I, то в перспективе можно разработать систему мониторинга уровня гибели клеток в организме матери на протяжении всего периода беременности.

**Ключевые слова:** вкДНК, ДНКаза I, беременность, преэклампсия, ВЗРП

✉ **Для корреспонденции:** Кристина Григорьевна Аветисова  
Севастопольский проспект, д. 24а, г. Москва, 117209; c.avetisova2016@yandex.ru

**Статья получена:** 15.03.18 **Статья принята к печати:** 27.06.18

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.041

## LEVELS OF CELL-FREE DNA AND DNASE I ACTIVITY IN COMPLICATED AND NORMAL PREGNANCIES

Avetisova KG<sup>1</sup> ✉, Kostyuk SV<sup>2</sup>, Kostyuk EV<sup>2</sup>, Ershova ES<sup>2</sup>, Shmarina GV<sup>2</sup>, Veiko NN<sup>2</sup>, Spiridonov DS<sup>1</sup>, Klimentko PA<sup>1</sup>, Kurtser MA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Biology, Research Centre for Medical Genetics, Moscow

Placental pathology is accompanied by the activation of apoptosis in the trophoblast and the subsequent increase in the concentrations of microvesicles containing placental (or fetal) DNA accumulating in the maternal blood. Fragments of fetal DNA stimulate the release of nuclear and/or mitochondrial DNA fragments by neutrophils. Therefore, one can expect that complicated pregnancies will be characterized by the dramatic elevation of total cell-free DNA (cfDNA) levels in maternal plasma. The aim of this work was to study the dynamics of plasma cfDNA concentrations and the activity of DNase I, an enzyme involved in the elimination of cfDNA from the bloodstream, in nonpregnant and pregnant women. Our study recruited 40 healthy nonpregnant women, 40 women with uncomplicated pregnancies and 35 women with the intrauterine growth restriction (IUGR) of the fetus. We did not observe the elevation of the total cfDNA concentrations in the patients with complicated pregnancies. Moreover, cfDNA concentrations in their plasma were even lower (though this difference was statistically insignificant) than in healthy pregnant and nonpregnant women. The median values of cfDNA concentrations in the group of healthy nonpregnant women were 75.5 ng/ml; in the group of healthy pregnant women, 78.0 ng/ml; and in the patients with IUGR, 42.1 ng/ml. At the same time, we observed a significant increase in DNase I activity in the plasma of women with IUGR. The median DNase I activity in the groups of healthy pregnant and nonpregnant women was 3.0 and 3.4 IU/ml, respectively. In patients with different grades IUGR of the fetus this parameter was as high as 6.3 IU/ml ( $p < 0.001$ ). Increased DNase I activity in the plasma of women with complicated pregnancies indirectly suggests a transient elevation of circulating cfDNA levels. Our study shows that the high level of activity exhibited by the cfDNA elimination system impedes the analysis of cfDNA concentrations in complicated pregnancies and skews its results. However, if cfDNA, DNase I activity and the cfDNA/DNase I ratio were all taken into account, it could be possible to develop a tool for the monitoring of cell death in the mother throughout the entire pregnancy.

**Keywords:** cfDNA, DNase I, pregnancy, preeclampsia, IUGR

✉ **Correspondence should be addressed:** Kristina G. Avetisova  
Sevastopolsky prospect, 24a, Moscow, 117209; c.avetisova2016@yandex.ru

**Received:** 15.03.18 **Accepted:** 27.06.18

**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.041

Присутствие ДНК в плазме и сыворотке крови было обнаружено в 1948 г. еще до открытия структурной формулы этой молекулы [1]. ДНК, присутствующая в крови в составе плазмы (сыворотки), получила название циркулирующей или внеклеточной ДНК (вкДНК) [2]. В 1997 г. впервые было показано наличие циркулирующей вкДНК эмбриона в плазме крови беременной женщины [3]. Обнаружение эмбриональной вкДНК в материнской плазме и сыворотке привело к созданию нетравматичных методов пренатальной диагностики, направленных на обнаружение генетической патологии эмбриона [4]. В настоящее время разработаны методы, позволяющие провести полногеномный анализ ДНК плода в составе вкДНК плазмы матери [5].

Помимо анализа генетических аномалий плода, анализ вкДНК позволяет проводить мониторинг связанных с беременностью осложнений, таких как преэклампсия и невынашивание беременности [6–8]. В этом случае определяют не конкретный мутантный ген, а общую концентрацию вкДНК материнской крови или отдельно вкДНК плода. Основным источником вкДНК плода в крови матери считают гибнущие в результате некроза и/или апоптоза клетки плаценты [9].

Необходимо отметить, что при измерении концентрации вкДНК в плазме крови беременных женщин исследователи не учитывают процессы, направленные на снижение концентрации вкДНК в кровотоке. Увеличение количества вкДНК в крови вследствие роста в организме уровня гибели клеток приводит к активации компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока и последующему снижению концентрации вкДНК. Эффект значительного снижения концентрации вкДНК на фоне хронических процессов, сопровождающихся усиленной гибелью клеток организма, мы наблюдали ранее у пациентов с хронической сердечно-сосудистой патологией [10] и лиц, длительное время работающих в условиях повышенного радиационного фона [11].

Ранее нами были исследованы совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКазы I в плазме крови небеременных женщин и женщин с нормальной и осложненной беременностью [12]. Поскольку в этой работе были получены нестандартные результаты: 1) уровень вкДНК у женщин с нормальной и патологической беременностью не превышал соответствующий показатель в группе контроля (согласно современным литературным данным при нормальной и патологической беременности он резко повышается [13]); 2) обнаружено двукратное повышение эндонуклеазной активности у женщин с патологией беременности (этот феномен был описан впервые), было решено провести повторное исследование, в котором повышенное внимание уделялось бы клиническим параметрам здоровых и беременных женщин.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 115 женщин в возрасте 22–40 лет (средний возраст  $32 \pm 4$  года), проживающие в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. В зависимости от групп, критерии включения варьировались: в группу 1 вошли практически здоровые небеременные женщины ( $n = 40$ ), представленные студентками и ординаторами медицинского учреждения (волонтеры); группа 2 — женщины с нормально протекающей

беременностью (срок гестации более 37 недель;  $n = 40$ ) без какой-либо выявленной патологии, родившие здоровых детей без признаков гипоксии и гипотрофии; группа 3 — женщины с проблемной беременностью, с клиническими диагнозами невынашивания, плацентарной недостаточности, внутриутробной задержки роста плода (ВЗРП), хронической гипоксии плода, наличием несостоятельного рубца на матке (срок гестации более 30 недель,  $n = 35$ ). Критерии исключения не применялись. Забор крови у здоровых небеременных женщин осуществляли между 10 и 15 днем менструального цикла. Запланированное в рамках кандидатской диссертации исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова (протокол № 159 от 21.11.2016). Всеми участниками исследования было подписано добровольное информированное согласие.

## Диагностика развития плода

Динамику роста плода во время беременности определяли с помощью ультразвуковой антропометрии: измеряли бипариетальный размер головки, диаметры груди и живота и длину бедренной кости. При отставании этих размеров от указанных в литературе среднепопуляционных значений [14] на 2 недели ставили диагноз ВЗРП I степени, при отставании на 2–4 недели — ВЗРП II степени и более 4 недель — ВЗРП III степени. Окончательный диагноз ВЗРП устанавливали после родов на основании данных массы плода. Нормативные параметры находились между 75 и 25 перцентильными кривыми, I степень ВЗРП соответствовала 25–10 кривой. II степень — 10–3 кривой, III степень — ниже 3 кривой [15]. Использовали также массо-ростовой коэффициент новорожденных: норма — выше 60, ВЗРП I степени — 55–60, II степени — 50–55, III степени — ниже 50. Функциональное состояние плода во время беременности и родов оценивали с помощью методов функциональной диагностики: кардиотокографии (КТГ) и доплерометрии сосудов матки, пуповины и плода. Ультразвуковые исследования (УЗИ) проводили на аппарате Voluson 530 MT (Kretztechnik; Австрия), Voluson E8 (General Electric; США) с использованием датчиков RIC 5–9 D (4–9 МГц), C1–5D (2–5 МГц), RAB 4–8 D (2–8 МГц); КТГ — с помощью фетального монитора (GE Corometrics (250CX); США).

## Специальные исследования

Выделение фрагментов циркулирующей вкДНК из 1 мл гепаринизированной плазмы крови проводили методом фенольной экстракции. Клетки крови осаждали центрифугированием при 400 г в течение 10 мин, полученную плазму смешивали с 10% лаурилсаркозилатом натрия, 0,2 М EDTA и стандартным раствором РНКазы с концентрацией 0,075 мг/мл (Sigma; USA), затем инкубировали в течение 45 мин и обрабатывали стандартным раствором протеинкиназы К 0,2 мг/мл (Promega; USA) в течение 24 ч при 37 °С. После двух циклов отмывания с насыщенным фенольным раствором фрагменты ДНК осаждали добавлением двух объемов этанола в присутствии 2 М ацетата аммония. Затем осадок дважды отмывали добавлением 75% этанола, высушивали и растворяли в воде. Для определения концентрации вкДНК применяли флуоресцирующий краситель Pico

Green (Sigma; США). Флуоресценцию регистрировали на приборе LS-55 (Perkin Elmer; США).

Активность ДНКазы 1 определяли по ранее разработанной методике [16]. Субстрат для ДНКазы 1 (Синтол; Россия) представляет собой двухпочечный олигодезоксирибонуклеотид длиной 30 звеньев состава R6G – ACC CCC AGC GAT TAT CCA AGC GGG – BHQ1. Последовательность модельного субстрата не имеет особого значения. На 5'-конце олигонуклеотид содержит флуоресцентную группу (5(6)-карбоксиходиамины), на 3'-конце — тушитель флуоресценции (BHQ1). При эндонуклеазном гидролизе наблюдается увеличение флуоресценции красителя. 10 мкл образца плазмы крови добавляли к 90 мкл раствора для ДНКазы 1 (10 мМ HEPES, pH 7,5, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>), который содержал 3 пикоМ олигонуклеотида-субстрата. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч, регистрировали изменение сигнала флуоресценции красителя с помощью планшетного ридера (EnSpire; Финляндия). Для расчета активности ДНКазы 1 получали калибровочную прямую, которая связывает величину разгорания флуоресценции красителя с концентрацией стандартного образца ДНКазы 1 (Sigma; США) в растворе. Единица активности: 1 ед., равная 1 нг/мл, соответствует активности ДНКазы 1 (увеличение флуоресценции субстрата), взятой в концентрации 1 нг/мл (1 ч, 37 °С). Проводили не менее трех параллельных измерений для одного образца. Относительная стандартная ошибка метода — 5%.

Статистическую обработку результатов проводили с применением критерия Манна–Уитни, с помощью программы «StatPlus 2007» (Statistical Graphics Corp.; США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что во 2-й группе наблюдений (женщины с нормально протекающей беременностью) сердечная деятельность плода по шкале Фишера оценивалась от 7 до 10 баллов, объемный кровоток в аорте составлял от 180 до 260 мл/мин, в вене пуповины от 86 до 140 мл/мин на 1 кг массы плода. В 3-й группе в 28 из 35 наблюдений было зарегистрировано снижение функционального состояния плода по шкале

Фишера до 4–7 баллов, объемный кровоток в аорте плода достигал 120–174 мл/мин, в вене пуповины 60–86 мл/мин на 1 кг. Характеристика пациенток с ВЗРП I–III степени тяжести представлена в табл. 1. Наиболее значительные изменения функционального состояния плода были зарегистрированы у пациенток при гипотрофии II и III степени. Нарушение кровотока у пациенток с ВЗРП II степени характеризовалось нарушениями маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока. При ВЗРП III степени регистрировались нарушения плодово-плацентарного кровотока: нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока. У пациенток с ВЗРП II и III степени были зарегистрированы снижение функционального состояния плода (ниже 7 баллов по шкале Фишера), нулевой или реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте, нарушение маточного кровотока.

Концентрация вкДНК у здоровых небеременных женщин (табл. 2) варьировала в пределах 11–123 нг/мл (медиана 75,5 нг/мл), при нормальной беременности — в пределах 2–347 нг/мл (медиана 78 нг/мл) и в случае беременности с ВЗРП — в пределах 1,2–595,7 нг/мл (медиана 42,1 нг/мл). Согласно критерию Манна–Уитни группы не различаются достоверно между собой ( $p > 0,05$ ). Можно отметить, что во 2-й и в 3-й группах у 9 образцов (22,5%) концентрации вкДНК превышали верхнюю границу для небеременных женщин (123 нг/мл). Обращает на себя внимание факт значительного разброса данных у беременных по сравнению с небеременными женщинами. Так, коэффициенты вариации изменялись в ряду: 0,42 (группа 1); 0,87 (группа 2); 1,37 (группа 3).

Основной причиной снижения концентрации вкДНК может быть повышение активности компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из факторов, влияющих на элиминацию вкДНК, является активность в плазме крови ДНКазы I, отвечающей за гидролиз вкДНК. У небеременных женщин активность этого фермента в плазме крови (табл. 2) варьировала в пределах 1,1–5,9 IU/мл (медиана 3 IU/мл), при нормальной беременности — в пределах 0,6–14,8 IU/мл (медиана 3,4 IU/мл) и в случае беременности с ВЗРП — в пределах 3,9–14,3 IU/мл

Таблица 1. Характеристика пациенток с ВЗРП

	Пациентки с ВЗРП I степени <i>n</i> = 11	Пациентки с ВЗРП II степени <i>n</i> = 13	Пациентки с ВЗРП III степени <i>n</i> = 11		
			<i>p</i> 1	<i>p</i> 1	<i>p</i> 2
Кровоток в аорте	220 (154; 254)	150 (126; 180)	0,0002	122 (120; 142)	0,0001 0,0005
Кровоток в пуповинной вене	110 (82; 120)	80 (64; 86)	0,0001	64 (60; 68)	0,0001 0,0002
Реверсивный диастолический кровоток в артерии пуповины или аорте	–	1 (7,7%)	1	6 (54,5%)	0,0124 0,0233
Преждевременные роды	–	3 (23,1%)	0,2228	4 (36,3%)	0,0902 0,6591
Состояние преэклампсии	–	3 (23,1%)	0,2228	7 (63,6%)	0,0039 0,0953
Баллы по шкале Фишера	8 (7; 9)	6,5 (6; 7)	0,0001	5 (4,5; 6)	0,0001 0,0002
Срок беременности (недели)	40 (38; 41)	38 (36; 41)	0,0397	37 (30; 40)	0,0008 0,0084
Вес плода (г)	2790 (2630; 3030)	2520 (2350; 2650)	0,0001	1720 (600; 2270)	0,0001 < 0,0001
Рост плода (см)	48 (47; 51)	47 (46; 50)	0,0221	43 (29; 47)	0,0002 0,001

Примечание: результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); *p*1 — значения *p* при сравнении с группой беременных женщин с ВЗРП I степени; *p*2 — значения *p* при сравнении с группой беременных женщин с ВЗРП II степени.

(медиана 6,3 IU/мл). Согласно критерию Манна–Уитни группы 1 и 2 не различаются достоверно между собой ( $p > 0,05$ ). Однако группа пациенток с осложненной беременностью статистически значимо отличается от группы здоровых небеременных женщин ( $p < 10^{-7}$ ) и группы женщин с нормально протекающей беременностью ( $p < 10^{-9}$ ) по показателю активности ДНКазы I в плазме. Таким образом, плазма крови беременных с диагностированной ВЗРП характеризуется высокими значениями активности ДНКазы I, по сравнению с соответствующими показателями у женщин с нормально протекающей беременностью и у небеременных женщин. У 18 из 35 (51,4%) беременных женщин из группы 3 были отмечены высокие значения активности ДНКазы I, которые не встречались в группе небеременных здоровых женщин. В группе 2 повышенные значения активности ДНКазы I обнаружены только у 4 из 40 (10%) беременных ( $p = 0,0002$ , согласно критерию Фишера).

В табл. 3 представлены результаты исследования корреляционной зависимости между концентрацией вкДНК и уровнем активности ДНКазы I. В группе здоровых небеременных женщин была выявлена умеренно выраженная, но статистически значимая отрицательная корреляционная связь между этими показателями ( $R = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ). У беременных женщин (особенно с осложненной беременностью) концентрация вкДНК и уровень активности ДНКазы I слабо коррелировали между собой.

При сравнении показателей пациенток с ВЗРП различной степени тяжести статистически значимых различий между подгруппами обнаружено не было. Однако концентрация вкДНК и интегративный показатель вкДНК/

ДНКазы I обнаруживали стойкую тенденцию к повышению в соответствии со степенью тяжести ВЗРП (табл. 4). Анализ индивидуальных параметров показал, что только у 4 из 24 (16,7%) пациенток с ВЗРП I и II степени тяжести были отмечены высокие значения концентрации вкДНК, не встречавшиеся в группе небеременных здоровых женщин, в то время как в группе женщин с ВЗРП III степени тяжести таких пациенток было 6 из 11 (54,5%;  $p = 0,0413$ , согласно критерию Фишера). Более того, при сопоставлении интегративного показателя вкДНК/ДНКазы I у пациенток с различной степенью ВЗРП с соответствующими параметрами в группах контроля статистически значимые различия были обнаружены только для пациенток с ВЗРП I-II степени тяжести (в обоих случаях  $p < 0,001$ ). У пациенток с ВЗРП III степени соотношение вкДНК/ДНКазы I существенно не отличалось от таковых в группах здоровых небеременных и беременных женщин (табл. 2, 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уровень материнской вкДНК высоко коррелирует с количеством вкДНК плацентарного происхождения [17]. В настоящее время известно, что только небольшое количество вкДНК матери попадает в кровотоки из солидных органов, таких как печень или почки, большая часть вкДНК имеет гематопозитическое происхождение. В частности, стабильным источником низкомолекулярной фрагментированной вкДНК могут быть дифференцирующиеся эритробласты. Быстрый подъем уровня вкДНК в циркуляции при патологических процессах и физической нагрузке происходит в результате активации нейтрофилов,

**Таблица 2.** Концентрация вкДНК в плазме крови и активность ДНКазы I у здоровых небеременных женщин, а также у женщин с нормальной и осложненной беременностью

	Здоровые небеременные женщины <i>n</i> = 40	Здоровые беременные женщины <i>n</i> = 40	Беременные женщины с ВЗРП <i>n</i> = 35		
	75,5 (11,0; 123,0)	78 (2,0; 347,0)	<i>p</i> <sub>1</sub>	<i>p</i> <sub>1</sub>	<i>p</i> <sub>2</sub>
Концентрация вкДНК (нг/мл)			0,59	42,1 (1,2; 595,7)	0,316 0,258
Активность ДНКазы (IU/мл)	3 (1,1; 5,9)	3,4 (0,6; 14,8)	0,088	6,3 (3,9; 14,3)	< 0,001 < 0,001
Соотношение вкДНК/ДНКазы I	20,5 (6,5; 101,8)	25,9 (0,3; 112,4)	0,889	8,4 (0,1; 152,7)	< 0,001 0,002

**Примечание:** результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); *p*<sub>1</sub> — значения *p* при сравнении с группой здоровых небеременных женщин; *p*<sub>2</sub> — значения *p* при сравнении с группой здоровых беременных женщин.

**Таблица 3.** Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman Correlation) между концентрацией вкДНК и активностью ДНКазы I

	<i>R</i>	<i>p</i>
Здоровые небеременные женщины	-0,39	< 0,05
Здоровые беременные женщины	-0,28	> 0,05
Пациентки с осложненной беременностью	-0,18	> 0,05

**Таблица 4.** Концентрация вкДНК и уровень активности ДНКазы I у пациенток с ВЗРП различной степени тяжести

	Пациентки с ВЗРП I степени <i>n</i> = 11	Пациентки с ВЗРП II степени <i>n</i> = 13	Пациентки с ВЗРП III степени <i>n</i> = 11		
	34,7 (8,0; 160,7)	76 (7,8; 251,1)	<i>p</i> <sub>1</sub>	<i>p</i> <sub>1</sub>	<i>p</i> <sub>2</sub>
Концентрация вкДНК (нг/мл)			0,817	103,5 (1,2; 595,7)	0,212 0,354
Активность ДНКазы (IU/мл)	5,7* (4,1; 13,1)	7,5* (3,9; 14,3)	0,183	5,2* (3,9; 10,0)	0,793 0,271
Соотношение вкДНК/ДНКазы I	5,2* (0,6; 28,2)	10,1* (0,8; 36,4)	0,817	18,5 (0,1; 152,7)	0,325 0,271

**Примечание:** результаты представлены в виде медиан (максимальное значение ÷ минимальное значение); *p*<sub>1</sub> — значения *p* при сравнении с группой пациенток с ВЗРП I степени; *p*<sub>2</sub> — значения *p* при сравнении с группой пациенток с ВЗРП II степени; \* —  $p < 0,01$  при сравнении с группами здоровых небеременных и беременных женщин.

выбрасывающих в качестве «ловушек» сети ядерной и/или митохондриальной ДНК [18].

вкДНК воздействует на многие клетки организма. Циркулирующая ДНК может усилить окислительный стресс, стимулировать синтез провоспалительных цитокинов и индуцировать асептическое воспаление [19]. Сети вкДНК, выбрасываемые активированными нейтрофилами, привлекают большое количество тромбоцитов и существенно повышают риск тромбообразования [18]. Организм защищается от негативного действия избыточных количеств вкДНК путем активации системы элиминации вкДНК из кровотока. Одним из компонентов системы элиминации вкДНК является эндонуклеазная активность крови. Основная эндонуклеаза крови, ДНКаза I, гидролизует фосфодиэфирные связи в цепях ДНК. Накопление в цепях одноцепочечных разрывов приводит к возникновению двуцепочечных разрывов и снижению молекулярного веса фрагментов вкДНК. Низкомолекулярные фрагменты вкДНК могут элиминироваться путем почечной фильтрации. У здоровых небеременных женщин мы обнаружили умеренно выраженную, но статистически значимую отрицательную корреляцию между количеством вкДНК в плазме и активностью ДНКазы I. По-видимому, активность этого фермента в данном случае служит основным фактором, ответственным за вывод фрагментов вкДНК из кровотока. У женщин с нормально протекающей беременностью и у пациенток с ВЗРП корреляции между уровнем вкДНК и активностью ДНКазы I обнаружено не было.

При патологии плаценты происходит активация апоптотических процессов в трофобласте, что сопровождается повышением в кровотоке матери концентрации микровезикул, содержащих плацентарную вкДНК. Микровезикулы трофобласта, в свою очередь, стимулируют выброс нейтрофилами нитей ядерной и/или митохондриальной ДНК (нетоз). Таким образом, при осложненной беременности следует ожидать значительного увеличения общей концентрации вкДНК в плазме крови матери. В данном исследовании нам не удалось выявить повышения уровня суммарной вкДНК у беременных женщин с ВЗРП. Более того, концентрация вкДНК в плазме пациенток с осложненной беременностью была даже ниже (статистически незначимо), чем соответствующий показатель в плазме здоровых беременных и небеременных женщин. В то же время мы обнаружили достоверное увеличение активности ДНКазы I в плазме беременных женщин с ВЗРП, что косвенно свидетельствует о транзитном повышении уровня циркулирующей вкДНК у пациенток с осложненной беременностью. Можно предположить, что при ВЗРП значительное увеличение общей концентрации вкДНК в плазме матери активирует защитные механизмы (в том числе ДНКазу I), способствующие элиминации избыточных количеств вкДНК из кровотока. У большинства пациенток с ВЗРП I и II степени тяжести умеренные нарушения

плацентарного кровотока (табл. 1) приводят к умеренному и, возможно, транзитному повышению уровня вкДНК, которая быстро выводится из кровотока активированной ДНКазой I. У таких пациенток можно обнаружить низкие концентрации вкДНК, высокоактивную ДНКазу I и низкое значение показателя «вкДНК/активность ДНКазы I». У большинства пациенток с ВЗРП III степени происходит быстрое накопление вкДНК в плазме, с которым не справляются механизмы элиминации. У таких пациенток можно обнаружить повышенные концентрации вкДНК, высокоактивную ДНКазу I и высокий показатель «вкДНК/активность ДНКазы I». При этом избыток вкДНК в циркуляции усугубляет нарушения плацентарного кровотока и повышает риск неблагоприятного исхода беременности.

Полученные результаты показывают, что высокий уровень активности системы элиминации вкДНК затрудняет и искажает результаты анализа концентрации вкДНК при беременности, особенно при патологии. Видимо поэтому, литературные данные об изменении концентрации вкДНК при патологии беременности столь противоречивы. Однако, если учитывать три показателя — концентрацию вкДНК, активность ДНКазы I и отношение вкДНК/ДНКазы I, то в перспективе можно разработать систему мониторинга уровня гибели клеток в организме беременной на протяжении всей беременности (например, один раз в три месяца). Эти показатели дают информацию об уровне гибели клеток и об эффективности работы системы элиминации, которая включает ДНКазу I и другие значимые при беременности компоненты. Так, если при мониторинге на определенной неделе беременности имеет место усиление активности ДНКазы I на фоне относительно высоких показателей концентрации вкДНК, то можно говорить о значительном усилении процессов гибели клеток, в том числе клеток плаценты. Высокие показатели концентрации вкДНК при повышенной активности ДНКазы I свидетельствуют о недостаточно эффективном клиренсе вкДНК из организма. При этом данные УЗИ могут зафиксировать ВЗРП гораздо позднее, поскольку требуется некоторое время для накопления признаков ВЗРП, тестируемых ультразвуком.

## ВЫВОДЫ

Исследованы совместные изменения концентрации вкДНК и активности одного из компонентов системы элиминации вкДНК из кровотока — фермента ДНКазы I в плазме крови небеременных женщин, женщин с нормальной беременностью и беременностью, осложненной ВЗРП. Показано, что концентрация вкДНК в плазме матери не является надежным маркером ВЗРП в последнем триместре беременности. Однако одновременное определение концентрации вкДНК и активности ДНКазы I может дать ценную информацию о развитии ВЗРП.

## Литература

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Acad Sci Paris 1948; 142: 241–3.
2. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. Biochimica et biophysica acta. 2007; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
3. Urbanova M, Plzak J, Strnad H, Betka J. Circulating nucleic acids

as a new diagnostic tool. Cell Mol Biol Lett. 2010 Jun; 15 (2): 242–59. DOI: 10.2478/s11658-010-0004-6.

4. Lo YM, Chiu RW. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2012; 13: 285–306. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.
5. Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel

- sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online*. 2013 Dec; 27 (6): 593–8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.008.
6. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 2006; 26: 831–36. DOI: 10.1002/pd.1513.
  7. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 184 (3), 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
  8. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011 Feb; 32 Suppl: 17–20. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.018.
  9. Al Nakib M, Desbrière R, Bonello N, Bretelle F, Boubli L, Gabert J, et al. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2009; 26 (1): 24–8. DOI: 10.1159/000236355.
  10. Вейко Н. Н., Булычева Н. В., Рогинко О. А., Вейко Р. В., Ершова Е. С., Коздоба О. А. и др. Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной днк — маркер гибели клеток организма. *Биомедицинская химия*. 2008; 54 (1): 78–93.
  11. Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, Osipov AN, Zhuravleva VF, Pankratova GV, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium  $\beta$ -radiation. *Mutat Res*. 2015 Sep; 779: 1–15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004.
  12. Ershova E, Sergeeva V, Klimenko M, Avetisova K, Klimenko P, Kostyuk E, Veiko N, Veiko R, Izevskaya V, Kutsev S, Kostyuk S. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy. *Biomed Rep*. 2017 Oct; 7 (4): 319–24. DOI: 10.3892/br.2017.968.
  13. Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, Hoesli I, Lapaire O, Giaglis S. Elevated Levels of Total Cell-Free DNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40 (4): 263–7. DOI: 10.1159/000444853.
  14. Демидов В. Н., Бычков П. А., Логвиненко А. В., Воеводин С. М. Ультразвуковая биометрия. Справочные таблицы и уравнения. В книге: Медведева М. В., Зыкина Б. И., редакторы. Клинические лекции по УЗ-диагностике в перинатологии. М., 1990; 83–92.
  15. Деметьева Г. М. Оценка физического развития новорожденных: пособие для врачей. М., 2000. 25 с.
  16. Ermakov AV, SV Kostyuk, MS Konkova, NA Egolina, EM Malinovskaya, NN Veiko. Extracellular DNA fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1137 (1): 41–6.
  17. Muñoz-Hernández R, Medrano-Campillo P, Miranda ML, Macher HC, Praena-Fernández JM, Vallejo-Vaz AJ, et al. Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Am J Hypertens*. 2017 Jul 1; 30 (7): 673–82. DOI: 10.1093/ajh/hpx024.
  18. Hahn S, Giaglis S, Buser A, Hoesli I, Lapaire O, Hasler P. Cell-free nucleic acids in (maternal) blood: any relevance to (reproductive) immunologists? *J Reprod Immunol*. 2014 Oct; 104–105: 26–31. DOI: 10.1016/j.jri.2014.03.007.
  19. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016 Dec; 152 (6): R277–R292. Epub 2016 Sep 27.

## References

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241–3.
2. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
3. Urbanova M, Plzak J, Strnad H, Betka J. Circulating nucleic acids as a new diagnostic tool. *Cell Mol Biol Lett*. 2010 Jun; 15 (2): 242–59. DOI: 10.2478/s11658-010-0004-6.
4. Lo YM, Chiu RW. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012; 13: 285–306. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163806.
5. Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online*. 2013 Dec; 27 (6): 593–8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.008.
6. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*, 2006; 26: 831–36. DOI: 10.1002/pd.1513.
7. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 184 (3), 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
8. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011 Feb; 32 Suppl: 17–20. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.06.018.
9. Al Nakib M, Desbrière R, Bonello N, Bretelle F, Boubli L, Gabert J, et al. Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2009; 26 (1): 24–8. DOI: 10.1159/000236355.
10. Vejko NN, Bulycheva NV, Roginko OA, Vejko RV, Ershova ES, Kozdoba OA, i dr. Fragmenty transkribiruemoj oblasti rибosomnogo povtora v sostave vnekletochnoj dnk — marker gibeli kletok organizma. *Biomedicinskaja himija*. 2008; 54 (1): 78–93.
11. Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, Osipov AN, Zhuravleva VF, Pankratova GV, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium  $\beta$ -radiation. *Mutat Res*. 2015 Sep; 779: 1–15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004.
12. Ershova E, Sergeeva V, Klimenko M, Avetisova K, Klimenko P, Kostyuk E, Veiko N, Veiko R, Izevskaya V, Kutsev S, Kostyuk S. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy. *Biomed Rep*. 2017 Oct; 7 (4): 319–24. DOI: 10.3892/br.2017.968.
13. Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, Hoesli I, Lapaire O, Giaglis S. Elevated Levels of Total Cell-Free DNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40 (4): 263–7. DOI: 10.1159/000444853.
14. Demidov VN, Bychkov PA, Logvinenko AV, Voevodin SM. Ul'trazvukovaja biometrija. Spravochnye tablicy i uravnenija. V knige: Medvedeva M. V., Zykina B. I., redaktory. Klinicheskie lekcii po UZ-diagnostike v perinatologii. M., 1990; 83–92.
15. Dement'eva G. M. Ocenka fizicheskogo razvitiya novorozhdennyh: posobie dlja vrachej. M., 2000. 25 s.
16. Ermakov AV, SV Kostyuk, MS Konkova, NA Egolina, EM Malinovskaya, NN Veiko. Extracellular DNA fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1137 (1): 41–6.
17. Muñoz-Hernández R, Medrano-Campillo P, Miranda ML, Macher HC, Praena-Fernández JM, Vallejo-Vaz AJ, et al. Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Am J Hypertens*. 2017 Jul 1; 30 (7): 673–82. DOI: 10.1093/ajh/hpx024.
18. Hahn S, Giaglis S, Buser A, Hoesli I, Lapaire O, Hasler P. Cell-free nucleic acids in (maternal) blood: any relevance to (reproductive) immunologists? *J Reprod Immunol*. 2014 Oct; 104–105: 26–31. DOI: 10.1016/j.jri.2014.03.007.
19. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien MÈ, Duval C, Chemtob S, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Reproduction*. 2016 Dec; 152 (6): R277–R292. Epub 2016 Sep 27.