

ЗНАЧИМОСТЬ АНАЛИЗА ЛИПИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОТДЕЛЯЕМОГО ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПЛАЦЕНТА-АССОЦИИРОВАННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Н. А. Ломова [✉], В. В. Чаговец, А. О. Токарева, Е. Л. Долгополова, Т. Э. Карапетыян, А. П. Магомедова, Р. Г. Шмаков

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Использование омических технологий имеет на сегодняшний день большой потенциал для разработки новых диагностических подходов в акушерстве. Цервиковагинальная жидкость (ЦВЖ) как часть системы «мать–плацента–плод» может быть использована для диагностики акушерских осложнений. Целью исследования было выявить особенности липидного состава отделяемого цервикального канала у беременных с задержкой роста плода и преэклампсией. Выполнен углубленный клинико-анамнестический и масс-спектрометрический анализ ЦВЖ, полученный от 57 беременных женщин. Липидные экстракты ЦВЖ анализировали на жидкостном хроматографе, соединенном с масс-анализатором. В результате исследования идентифицировано 239 соединений липидов. Математический анализ выявил значимые различия между пациентками группы нормы и с задержкой развития плода (ЗРП) для 17 липидов ($p < 0,05$). Между пациентками группы нормы и преэклампсии (ПЭ) значимые различия были обнаружены для трех липидов ($p < 0,05$). Между пациентками с ПЭ и пациентками с ЗРП статистически значимая разница в уровнях была выявлена для двух липидов ($p < 0,05$). Показано, что липиды относились преимущественно к классам оксипипидов, сфингомиелинов, триглицеридов и кардиолипидов. При построении диагностической модели достигнута чувствительность 0,81 и специфичность 0,91 (порог отсеки — 0,50; AUC — 0,85). Полученные данные перспективны для разработки методов диагностики плацента-ассоциированных осложнений беременности и понимания новых механизмов патогенеза данных осложнений.

Ключевые слова: прогностическая значимость, неинвазивная диагностика, преэклампсия, задержка роста плода, липидомика

Финансирование: исследование выполнено при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации [Государственный регистрационный номер. АААА-А18-118053190026-6].

Благодарности: авторы выражают особую благодарность д.ф.-м.н., руководителю отдела системной биологии в репродукции Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова В. Е. Франкевичу за помощь в подготовке исследования, систематическом анализе и редактировании рукописи.

Вклад авторов: Н. А. Ломова — анализ клинических данных, систематический анализ, написание рукописи; В. В. Чаговец — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; А. О. Токарева — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, обработка масс-спектрометрических данных; Е. Л. Долгополова — сбор и подготовка биологических сред, статистический анализ результатов; Т. Э. Карапетыян — анализ клинических данных, статистический анализ результатов; А. П. Магомедова — сбор и подготовка биологических сред; Р. Г. Шмаков — анализ клинических данных, систематический анализ, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НЦАГиП им. В. И. Кулакова (протокол № 11 от 11 ноября 2021 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Международной конференции по гармонизации (ICH), Стандартами надлежащей клинической практики (GCP), ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Анатольевна Ломова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; natasha-lomova@yandex.ru

Статья получена: 23.11.2021 **Статья принята к печати:** 20.12.2021 **Опубликована онлайн:** 29.12.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.066

SIGNIFICANCE OF ANALYSIS OF LIPID EXTRACTS IN CERVICAL CANAL SECRETION FOR DIAGNOSING OF PLACENTA-ASSOCIATED COMPLICATIONS OF PREGNANCY

Lomova NA [✉], Chagovets VV, Tokareva AO, Dolgopolova EL, Karapetyan TE, Magomedova AP, Shmakov RG

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Omic technologies hold great potential as the basis for development of the new diagnostic approaches in obstetrics. Cervicovaginal fluid (CVF) as part of the mother-placenta-fetus system can be used to diagnose obstetric complications. This study aimed to identify the features of lipid composition of the cervical canal secretion peculiar to Intrauterine Growth Restriction (IUGR) and preeclampsia (PE). We took CVF samples from 57 pregnant women and subjected them to an in-depth clinical-anamnestic and mass-spectrometric analysis. Lipid extracts of CVF were analyzed with a liquid chromatography system coupled with a mass analyzer. As a result, we identified 239 lipid compounds. In case of 17 lipids, mathematical analysis revealed significant differences between samples from women with normal pregnancy indicator values (normal group) and patients from the IUGR group ($p < 0.05$). As for the normal group and PE group patients, there were significant differences identified for 3 lipids ($p < 0.05$). Comparison of samples from the PE and IUGR groups yielded statistically significant differences in levels of two lipids ($p < 0.05$). Mainly, the lipids were oxylipins, sphingomyelins, triglycerides, and cardiolipins. The developed diagnostic model had the sensitivity of 0.81 and specificity of 0.91 (cut-off level — 0.50; AUC — 0.85). The data obtained are valuable in the context of development of the new methods of diagnosing placenta-associated complications of pregnancy and for understanding new mechanisms of pathogenesis of these complications.

Keywords: prognostic value, non-invasive diagnostics, preeclampsia, intrauterine growth restriction, lipidomics

Funding: the study was supported through the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation [State registration number АААА-А18-118053190026-6].

Acknowledgements: the authors are grateful to Dr. V. E. Frankevich, Head of the Department of Systems Biology in Reproduction of the V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, for his help in organization of the study, systematic analysis and manuscript editing.

Author contribution: Lomova NA — analysis of clinical data, systematic analysis, manuscript authoring; Chagovets VV — metabolic analysis (mass spectrometry), statistical analysis of the data obtained, manuscript editing; Tokareva AO — metabolic analysis (mass spectrometry), mass spectrometry data processing; Dolgopolova EL — collection and preparation of biological fluids, statistical analysis of the results; Karapetyan TE — analysis of clinical data, statistical analysis of the results; Magomedova AP — collection and preparation of biological fluids; Shmakov RG — analysis of clinical data, systematic analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #11 of November 11, 2021), conducted in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki, International Conference on Harmonization (ICH), Standards of Good Clinical Practice (GCP), Federal Law "On the Basics of Health Protection of Citizens in the Russian Federation"; all patients signed a voluntary informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalya A. Lomova
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; natasha-lomova@yandex.ru

Received: 23.11.2021 **Accepted:** 20.12.2021 **Published online:** 29.12.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.066

На сегодняшний день установлено, что такие распространенные осложнения беременности, как задержка роста плода (ЗРП) и преэклампсия (ПЭ), связаны с дисфункцией плаценты. При этих патологиях метаболическая и кровеносная система не способна адаптироваться к изменениям в период беременности, что приводит к гипертонии и нарушению плацентарного кровотока. Это не только вызывает нежелательные последствия для здоровья матери и ребенка в период гестации, но и может повлиять на их будущее здоровье. В последние годы в странах с развитой экономикой от 10 до 20% беременностей осложняются той или иной формой гипертонии [1]. ПЭ — это осложнение беременности, возникающее в плаценте и негативно влияющее как на мать, так и на плод. ПЭ выявляют у 5–7% беременных во всем мире [2]. Это состояние может возникнуть после 20-й недели беременности и характеризуется гипертонией, протеинурией и отеками, что вызывает в дальнейшем угнетение плода и препятствует положительному исходу беременности. ЗРП выражается в недостижении плодом своего потенциала роста, когда вес и индекс массы тела (ИМТ) новорожденного не соответствуют норме для определенного числа гестационных недель. ЗРП происходит примерно у 4–8% новорожденных в промышленно развитых странах и 6–30% — в развивающихся странах [3, 4]. Причины ЗРП подразделяют на внутренние, присущие плоду или плаценте, и внешние, такие как материнские факторы, воздействующие преимущественно на плаценту и плод, или на внутренние и внешние вместе.

На сегодняшний день отсутствуют адекватные способы прогнозирования данных осложнений беременности, поэтому очевидна необходимость разработки неинвазивных и объективных методов пренатальной диагностики и мониторинга.

Постгеномные омикс-технологии, в том числе метаболомика и липидомика, в настоящее время переживают фазу бурного роста и все более активно внедряются в клиническую практику. Применительно к рассматриваемым в данной работе патологиям были обнаружены значительные изменения уровней метаболитов еще до клинического проявления преэклампсии, и эти изменения усиливаются по мере прогрессирования расстройства [5–7]. Метаболомика может быть использована для обнаружения особенностей этих состояний на молекулярном уровне и способствовать выявлению биологических механизмов, лежащих в их основе, а также обнаружению новых биомаркеров. Метаболомика имеет также уникальные возможности для выявления различных эндотипов патологических состояний [7, 8] и для диагностики различных осложнений беременности. Похожие наблюдения были сделаны и для ЗРП [9]. В упомянутых работах проводили анализ метаболома крови. Забор крови является инвазивным способом получения биологического материала. В данной работе рассмотрена возможность использования отделяемого цервикального канала для достижения неинвазивности процедуры прогнозирования развития ПЭ или ЗРП.

На сегодняшний день поиск неинвазивных и малоинвазивных маркеров диагностики в акушерстве является перспективным направлением научного поиска. Одним из потенциальных локусов малоинвазивного забора биологического материала выступает цервикальный канал. Описаны потенциальные биомаркеры самопроизвольных преждевременных родов, которые

были идентифицированы с помощью целенаправленного протеомного анализа образцов цервика-вагинальной жидкости от бессимптомных женщин из группы высокого риска. Белки в образцах цервика-вагинальной жидкости от пациенток со спонтанными преждевременными родами относятся к белкам внеклеточного матрикса и / или регулируют физиологию клеточных мембран [10]. В 2020 г. в группе женщин с преждевременными родами и преждевременным разрывом плодных оболочек обнаружено достоверно значимое различие уровня цитокинов из образцов цервика-вагинальной жидкости, особенно IL6 и IL17 α . Данные показатели могут быть более точными прогностическими маркерами преждевременных родов, чем фетальный фибронектин, используемый в клинической практике на сегодняшний день [11]. Во время беременности дисбактериоз микробиоты влагалища напрямую влияет на метаболические профили, что может вызвать преждевременные роды. В 2020 г. был проведен анализ метаболического профиля цервика-вагинальной жидкости с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса и определены метаболические маркеры для прогнозирования преждевременных родов. Анализ ROC-кривой показал, что ацетон, этиленгликоль, формиат, гликолят, изопропанол, метанол и триметиламиноксид имели лучшие прогностические значения для преждевременных родов. Эти метаболиты могут быть полезными маркерами для клинического применения и прогноза преждевременных родов [12]. Таким образом, на сегодняшний день доказано, что цервика-вагинальная жидкость, являющаяся частью системы «мать–плацента–плод», содержит целый ряд биологически активных компонентов, которые потенциально можно использовать для предикции и диагностики акушерской патологии.

Для выявления и валидации биомаркеров в метаболомных исследованиях используют широкий спектр аналитических методов: ультрафиолетовую и инфракрасную спектроскопию, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, электрофорез, — но наибольшее распространение получили метаболомные платформы на базе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ЖХ-МС).

Использование метаболомики в исследованиях акушерских синдромов, ассоциированных с плацентарной недостаточностью (ПЭ и ЗРП), имеют на сегодняшний день большой потенциал для понимания патогенеза данных осложнений беременности и разработки новых диагностических и прогностических подходов.

Целью исследования стал поиск различий липидома отделяемого цервикального канала пациенток с нормально протекающей беременностью и пациенток с задержкой роста плода и преэклампсией, а также разработка математических моделей на базе найденных различий для создания неинвазивных методов антенатальной диагностики ПЭ и ЗРП.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование «случай-контроль» было проведено в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова (Россия) в период с января по декабрь 2020 г. В нем участвовали 57 беременных женщин, проходящих обследование и родоразрешенных за это время в отделениях Центра. Беременные были разделены на три группы: I группа включала в себя 18 пациенток с

преэклампсией, II группа — 19 пациенток с задержкой роста плода, III группа — 20 беременных женщин без данных осложнений, условно здоровых (группа контроля). Критерии включения в группу I: повышение после 20-й недели беременности САД ≥ 140 мм рт. ст. и/или ДАД ≥ 90 мм рт. ст. независимо от уровня АД в анамнезе в сочетании с протеинурией $\geq 0,3$ г в сутки или $\geq 0,3$ г/л в двух порциях мочи, взятых с интервалом в 6 ч. Критерии включения в группу II: диагноз ЗРП, выставленный по данным УЗИ-исследования, если было отмечено замедление показателей прироста предполагаемой массы плода (ПМП) и/или окружности живота (ОЖ) < 10 -го перцентиля в сочетании с патологическим кровотоком по данным УЗИ-доплерографии либо значения ПМП и/или ОЖ < 3 -го перцентиля. Критерии исключения: многоплодная беременность, патология шейки матки, сахарный диабет, нарушение почечных функций, хроническая артериальная гипертензия, онкологические и инфекционно-воспалительные заболевания во время данной беременности. Случаи сочетания ПЭ и ЗРП не вошли в данное исследование. Всех пациенток родоразрешали путем операции кесарева сечения.

Сбор и подготовка образцов

У всех беременных женщин, вошедших в исследование, в день госпитализации проводили забор цервиковагинального отделяемого до проведения влагалищного исследования. Для исключения инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта проводили забор отделяемого влагалища на микробиологическое исследование и мазок на степень чистоты влагалища. В среднем забор проходил за 10–14 дней до родоразрешения.

Забор цервиковагинального отделяемого проводили с использованием одноразового влагалищного подъемника и стерильных одноразовых цитощеток. После введения подъемника и визуальной идентификации наружного канала шейки матки, в цервикальный канал на глубину 0,5 см вводили цитощетку и после вращательного движения по часовой стрелке извлекали таким образом, чтобы избежать контакта со стенками влагалища и наружными половыми органами. После забора образцы охлаждали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C.

Перед анализом образцы подвергали жидкостно-жидкостной экстракции для получения липидной фракции. Для этого в пробирку с цервикальной щеткой добавляли 500 мкл раствора H_2O / метанол (1 : 1), после чего образец тщательно перемешивали в течение 5 мин и обрабатывали ультразвуком в течение еще 5 мин. После этого цервикальную щетку извлекали из пробирки, добавляли 1 мл хлороформа и перемешивали в течение 10 мин. Затем центрифугировали 5 мин при 13 000 G при температуре окружающей среды, отбирали 925 мкл нижнего слоя, высушивали в потоке азота и повторно растворяли в 200 мкл раствора изопропанол / ацетонитрил (1 : 1) для последующего анализа.

Масс-спектрометрический анализ экстрактов липидов

Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific; Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с электрораспылительным источником ионизации (Bruker Daltonics; Германия). Разделение

образцов осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Agilent, США) с линейным градиентом от 30 до 90% элюента В за 20 мин. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил / вода в объемном соотношении 60 : 40 с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония, в качестве элюента В — раствор изопропанол / ацетонитрил / вода (90 : 8 : 2), с добавлением 0,1%-й муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Скорость потока элюирования была равна 40 мкл/мин, объем инжектируемого образца — 3 мкл. Масс-спектры получали в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне m/z 100–1700. Да со следующими установками: напряжение на капилляре составляло 4,1 кВ в режиме положительных ионов и — 3,2 кВ в режиме отрицательных ионов, давление распыляющего газа — 0,7 бар, скорость потока осушающего газа — 6 л/мин, температура осушающего газа — 200 °C.

Исходные масс-спектрометрические данные обрабатывали с помощью программы msConvert из пакета Proteowizard 3.0.9987 [13], MzMine [14], Идентификацию липидов производили средствами скриптов LipidMatch [15] по точной массе и по характерным тандемным масс-спектрам (MC / MC). Номенклатура липидов соответствует LipidMaps [16].

Статистический анализ

Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R версии 3.3.3 [17], и программу RStudio 1.383 [18].

Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали по значениям теста Шапиро–Уилка. Статистический анализ проводили с помощью теста Стьюдента при нормальном распределении исследуемой величины или теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD). При распределении признаков с распределением, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q_1 и Q_3 в формате Me (Q_1 ; Q_3). Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании исследуемых параметров были разработаны модели логистической регрессии. В качестве независимых переменных в моделях рассматривали липиды со статистически значимой разницей уровней между исследуемыми группами. Выбор переменных осуществляли на основе критерия AIC (информационного критерия Акаике) [19]. Производили поэтапный отбор переменных, пока это приводило к увеличению AIC. Качество полученной диагностической модели тестировали внутренней кросс-валидацией с контролем по отдельным объектам. Для оценки использовали значения площади под операционной кривой, чувствительность и специфичность. В качестве зависимой переменной выступала принадлежность пациентки к группе. Для каждой модели были определены критерий Вальда, 95%-й доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал. Качество разработанных моделей определяли путем построения ROC-кривой,

Таблица 1. Клиническая характеристика исследуемых групп

Параметр	Описательная статистика параметра			Статистическая значимость различий параметров при попарном сравнении групп (p-value)		
	ПЭ (n=18)	ЗРП (n=19)	Норма (n=20)	ПЭ-Норма	ЗРП-Норма	ПЭ-ЗРП
Возраст, лет	31 ± 5	34 ± 8	31 ± 5	0,769	0,21	0,331
ИМТ	28 ± 4	23 ± 4	27 ± 3	0,666	0,005	0,0045
Срок родоразрешения, недели	36 ± 3	37 ± 3,1	40 ± 1	< 0,001	< 0,001	0,342
Рост при рождении, см	46,6 ± 4,5	45,2 ± 5,3	52,6 ± 2,4	0,001	< 0,001	0,452
Вес при рождении, г	2341 ± 633,6	2128,7 ± 602	3493,6 ± 303,6	< 0,001	< 0,001	0,383
Оценка по Апгар на первой минуте, баллы	8 (7;8)	8 (8;8)	8 (8;8)	0,04	0,135	0,845
Оценка по Апгар на пятой минуте, баллы	9 (8;9)	9 (8;9)	9 (9;9)	0,131	0,05	0,859

определения площади под ROC-кривой, а также расчета чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты анализа клинических параметров исследуемых групп представлены в табл. 1.

Было выявлено, что ИМТ беременных женщин из группы ЗРП статистически значимо ниже, чем у женщин групп «норма» и «преэклампсия» (p = 0,005 и p = 0,0045 соответственно).

Все женщины были родоразрешены в III триместре беременности. Срок родоразрешения для групп с ПЭ и ЗРП значимо отличался от контрольной группы (p < 0,001),

что объясняется необходимостью ускоренного родоразрешения по акушерским показаниям. Частота преждевременного родоразрешения в группе ПЭ составила 33,3% (шесть случаев), а ЗРП — 31,6% (шесть случаев).

Средний вес новорожденных в контрольной группе составил 3493,6 г по сравнению с 2341 г и 2128,7 г для случаев ПЭ и ЗРП соответственно (p ≤ 0,001).

Следует отметить, что оценка новорожденного по шкале Апгар в группе с ПЭ была значимо ниже на первой минуте жизни (p = 0,04), тогда как в группе ЗРП — на пятой минуте (p = 0,05), по сравнению с группой контроля. Вероятно, это обусловлено истощением компенсаторных механизмов и тяжелой адаптации в раннем неонатальном периоде

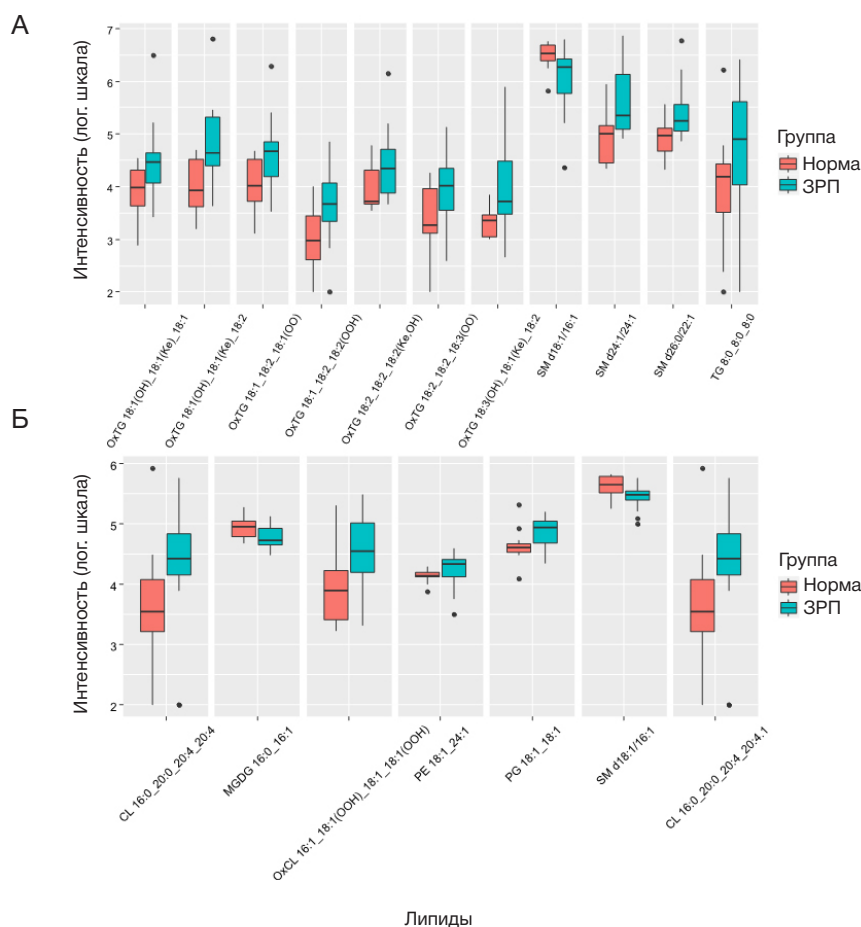


Рис. 1. Диаграмма размаха уровней липидов. Уровни липидов статистически значимо различаются между группами нормы и ЗРП в режиме положительных ионов (А), в режиме отрицательных ионов (Б)

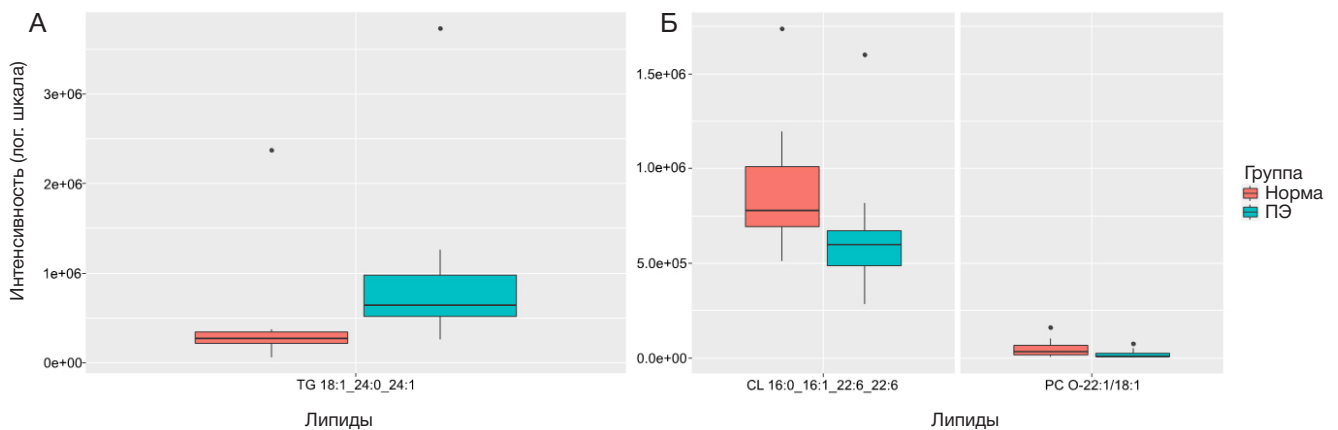


Рис. 2. Диаграмма размаха уровней липидов. Уровни липидов статистически значительно различаются между группами нормы и ПЭ в режиме положительных ионов (А), в режиме отрицательных ионов (Б)

у новорожденных, длительный период пребывающих в условиях хронической гипоксии и отставания роста. У одного ребенка выявлена асфиксия средней степени тяжести при рождении, потребовавшая дополнительной респираторной поддержки.

Анализ липидного состава отделяемого цервикального канала осуществляли с помощью ЖХ-МС. МС проводили как в режиме положительных, так и в режиме отрицательных ионов, поскольку такой подход позволяет расширить охват зарегистрированных и идентифицированных липидов. В результате ЖХ-МС-анализа было идентифицировано 129 липидов в режиме положительных ионов и 110 соединений липидов в режиме отрицательных ионов. Сравнение относительных уровней липидов между исследуемыми группами позволило выявить 10 липидов со статистически значимой разницей между группами нормы и ЗРП в режиме положительных ионов и семь липидов в режиме отрицательных ионов (рис. 1). При сравнении группы нормы и ПЭ были найдены один липид со статистически значимой разницей уровней в режиме положительных ионов и два липида в режиме отрицательных ионов (рис. 2). Между группами ПЭ и ЗРП статистически значимую разницу в уровнях имели два липида (рис. 3). Липиды относились преимущественно к классам оксипипидов (окситриглицеридов и оксикардиолипидов), сфингомиелинов, триглицеридов и кардиолипидов.

На основе полученных данных были построены модели логистической регрессии для определения пациенток,

у которых может развиваться ЗРП или ПЭ по липидам отделяемого цервикального канала (табл. 2). Для оценки качества разработанных моделей был выполнен ROC-анализ, результаты которого представлены в табл. 3 и на рис. 4, 5. Наилучшими параметрами характеризовались модели для классификации ЗРП / Норма, построенные по данным, полученным как в режиме положительных, так и в режиме отрицательных ионов. AUC составили 0,70 и 0,85 соответственно. Модель для классификации по группам ПЭ / Норма имела достаточно высокое значение специфичности (0,91), но низкую чувствительность (0,30). Таким образом, из рассмотренных в данной работе акушерских патологий ЗРП и ПЭ, неинвазивный подход анализа липидного профиля отделяемого цервикального канала представляется более перспективным для диагностики ЗРП. Применимость описанного подхода для диагностики ПЭ требует дополнительного исследования. Для дальнейшего усовершенствования и валидации могут быть рассмотрены модели ЗРП / Норма и ЗРП / ПЭ, построенные по данным МС в режиме отрицательных и положительных ионов соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного нами анализа идентифицировано 129 липидов в режиме положительных ионов и 110 соединений липидов в режиме отрицательных ионов, относящихся к простым липидам глицеридам и к

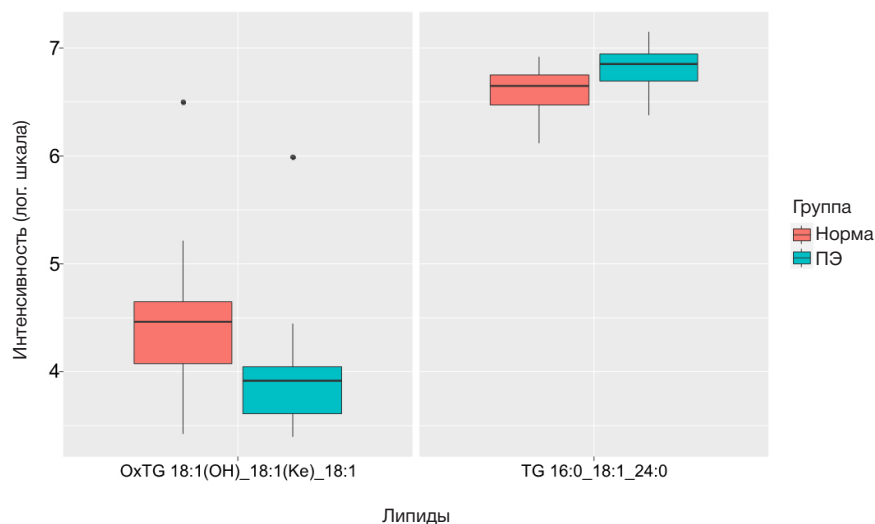


Рис. 3. Диаграмма размаха уровней липидов. Уровни липидов статистически значительно различаются между группами ПЭ и ЗРП (режим положительных ионов)

Таблица 2. Характеристики компонентов, использованных для построения моделей логистической регрессии, позволяющих классифицировать пациенток по группам ЗРП, ПЭ, Норма по липидному профилю отделяемого цервикального канала: независимая переменная, ее коэффициент β , доверительный интервал (ДИ) β , критерий Вальда, вероятность отличия значения коэффициента от нуля P

Липиды	β	ДИ β	Критерий Вальда	P
ЗРП / Норма, режим положительных ионов				
Свободный член	-0,93	-2,63-0,43	-1,20	0,23
OxTG 18:3(OH)_18:1(Ke)_18:2	$3,01 \cdot 10^{-4}$	$5,99 \cdot 10^{-5}$ - $8,16 \cdot 10^{-4}$	1,38	0,17
ЗРП / Норма, режим отрицательных ионов				
Свободный член	-10,73	-31,29-1,54	-1,62	0,1
SM d22:3/22:4	$3,20 \cdot 10^{-3}$	$6,28 \cdot 10^{-4}$ - $8,88 \cdot 10^{-3}$	1,65	0,1
PE 18:1_24:1	$5,84e-04$	$1,72 \cdot 10^{-4}$ - $1,49 \cdot 10^{-3}$	1,96	0,05
MGDG 16:0_16:1	$-3,01 \cdot 10^{-5}$	$-8,54 \cdot 10^{-6}$ - $4,33 \cdot 10^{-6}$	-1,45	0,15
ПЭ / Норма, режим положительных ионов				
Свободный член	-0,75	-2,23-0,45	-1,14	0,25
TG 18:1_24:0_24:1	$1,06 \cdot 10^{-6}$	$-2,27 \cdot 10^{-7}$ - $3,53 \cdot 10^{-6}$	1,19	0,24
ПЭ / ЗРП, режим положительных ионов				
Свободный член	2,71	0,71-5,45	2,31	0,02
TG 16:0_18:1_24:0	$-3,91 \cdot 10^{-7}$	$-8,39 \cdot 10^{-7}$ - $7,62 \cdot 10^{-6}$	-2,07	0,04

сложным липидам, в свою очередь делящимся на глицерофосфолипиды и сфинголипиды. Эта обширная группа природных органических соединений, включающая жиры и жироподобные вещества, необходима для построения клеточных мембран и регуляции обмена веществ и имеет несомненный интерес в исследовании ее изменения в акушерской патологии и особенно детекции колебания ее уровня на границе системы «мать-плацента-плод». Жирные кислоты и липиды во время эмбрионального периода играют первостепенную роль в росте и развитии. Дисбаланс потребления жирных кислот в перинатальном периоде изменяет состав жирных кислот мембранных фосфолипидов плода, что может вызвать структурные и функциональные проблемы в его клетках. Кроме того, метаболическая и нейроэндокринная среда плода и новорожденного играет ключевую роль в регулировании энергетического баланса. Дисбаланс жирных кислот и липидов во время беременности может привести к необратимым изменениям в контроле нейроэндокринной функции и энергетическом обмене у плода, что приведет к метаболическому программированию. Таким образом, детекция уровня липидов позволяет зафиксировать нарушения в работе «мать-плацента-плод» еще на доклиническом этапе [20]. Показано, что метаболический путь сфинголипидов играет критическую роль в толерантности плода и матери, регулируя врожденный иммунитет на границе раздела между плодами и матерями как в экспериментах с животными, так и у людей, и может дать новое понимание разработки терапевтических стратегий лечения акушерских осложнений [21].

Во время беременности метаболические изменения происходят во всех системах организма женщины,

в том числе и в липидном обмене. Холестерин и свободные жирные кислоты необходимы для клеточного синтеза эмбриональных мембран. Плод синтезирует липиды и широко использует материнские, хотя свободный трансплацентарный транспорт материнских липопротеинов ограничен «плацентарным барьером» [22]. Фосфолипиды и триацилглицерины (ТАГ) из организма матери не проникают напрямую к плоду. Существует ряд механизмов транспорта жирных кислот на территорию плода, которые задействуют способность связывать жирные кислоты [23] и интенсивно транспортировать их через плаценту. Циркулирующие липиды имеют разнообразное влияние на функцию эндотелиальных клеток. Дислипидемия часто связана с дисфункцией этих клеток [24]. Исследования показали зависимость от концентрации связь между повышенным уровнем ТАГ и риском ПЭ. Корреляция между дислипидемией и ПЭ можно объяснить множеством механизмов. Например, увеличение таких липидных фракций, как ТАГ, ведет к их накоплению в эндотелиальных клетках и уменьшению выработки простаглицина, что впоследствии приводит к эндотелиальной дисфункции [25]. В нашем исследовании уровень TG 18:1_24:0_24:1, CL 16:0_16:1_22:6_22:6, PC O-22:1/18:1 имели достоверно значимые различия в группе «ПЭ», по сравнению с группой «Норма» ($p = 0,008$, $p = 0,02$, $p = 0,04$ соответственно). При построении диагностической модели ПЭ / Норма достигнута специфичность 0,91 (порог отсечки — 0,10; AUC — 0,67).

При синдроме ЗРП на фоне нарушений структуры и функции плаценты мы видим проявления проблемы на территории плода и не отмечаем их в организме матери. В ряде исследований [26, 27] было установлено,

Таблица 3. Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих классифицировать пациенток по группам ЗРП, ПЭ, Норма по липидному профилю отделяемого цервикального канала. ПЦПР — прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР — прогностическая ценность отрицательного результата

Группы пациентов	МС-режим регистрации ионов	Чувствительность	Специфичность	Порог	AUC	ПЦПР	ПЦОР
ЗРП / Норма	положительный	0,63	0,91	0,2	0,7	0,6	0,89
ЗРП / Норма	отрицательный	0,81	0,91	0,5	0,85	0,79	0,9
ПЭ / Норма	положительный	0,3	0,91	0,1	0,67	0,27	0,88
ЗРП / ПЭ	положительный	0,67	0,6	0,5	0,66	0,6	0,58

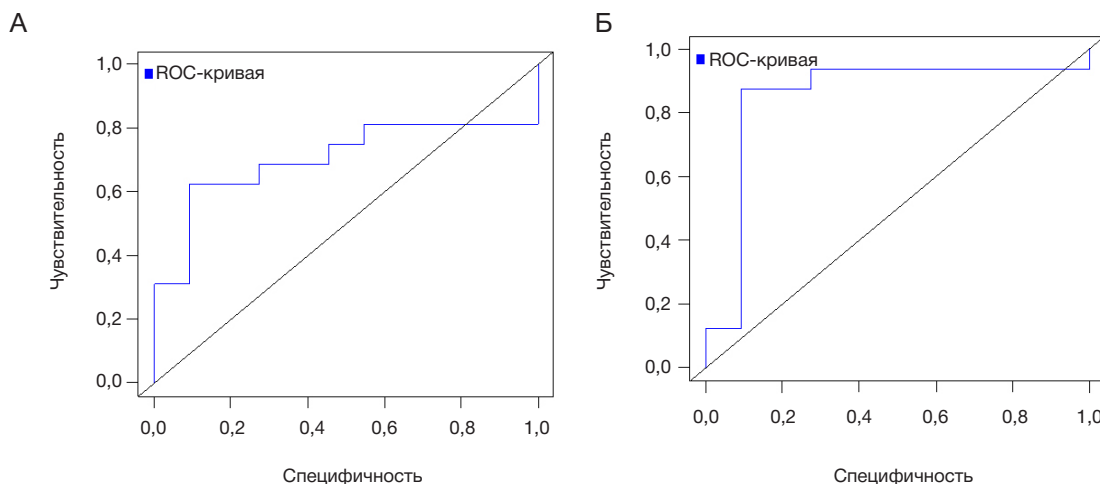


Рис. 4. Операционная кривая, построенная для диагностической модели ЗРП / Норма по МС-данным, зарегистрированным в режиме положительных ионов (А) и в режиме отрицательных ионов (Б)

что при беременности, осложненной ЗРП, происходит снижение содержания уровня липидов в пуповинной крови и крови матери, а также уменьшение числа их рецепторов. Снижение уровня липидов и их рецепторов в фето-плацентарном комплексе, вероятно, будет иметь весьма серьезные последствия для нормального роста и развития плода, так как они не будут способны в достаточной мере обеспечивать транспорт холестерина и нормальное функционирование плаценты и гармоничный рост плода. В нашей работе уровни 17 липидов (табл. 2) имели достоверно значимые различия в группе «ЗРП», по сравнению с группой «Норма» ($p < 0,05$). При построении диагностической модели ЗРП / Норма достигнута чувствительность 0,81, специфичность 0,91 (порог отсечки — 0,50; AUC — 0,85).

Особый интерес представляет достоверно значимое различие полученных результатов образцов цервиковагинального отделяемого среди групп пациенток с ЗРП и ПЭ ($p = 0,04$). Это наглядно демонстрирует существующие патогенетические различия данных осложнений беременности, изначально объединенных общей идеей плацентарной дисфункции.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного нами исследования наглядно продемонстрирована возможность использования

цервиковагинальной жидкости в комплексном диагностическом мониторинге беременных с плацентарно-ассоциированными акушерскими осложнениями. Выполнен углубленный клинико-анамнестический и масс-спектрометрический анализ данных, полученных от 57 беременных женщин. При изучении отделяемого цервикального канала беременных с ЗРП и ПЭ было идентифицировано 129 соединений липидов в режиме положительных ионов и 110 соединений липидов в режиме отрицательных ионов. В нашем исследовании уровень ряда липидов имел достоверно значимые различия в группах «ПЭ» и «ЗРП» по сравнению с группой «Норма». Это наблюдение может указывать на существующие различия в цепи биологических процессов патогенеза данных осложнений беременности, объединенных общей идеей плацентарной дисфункции и в результате дальнейших исследований в данном направлении выявить новые подходы к разработке таргетных путей терапии «больших акушерских синдромов». Липиды относились преимущественно к классам оксиполипидов (окситриглицеридов и оксикардиолипидов), сфингомиелинов, триглицеридов и кардиолипидов, что позволяет использовать данный метод в комплексе предиктивных мероприятий. На основании выявленных различий были созданы модели логистической регрессии, которые могут быть перспективными для разработки методов неинвазивной диагностики данных заболеваний.

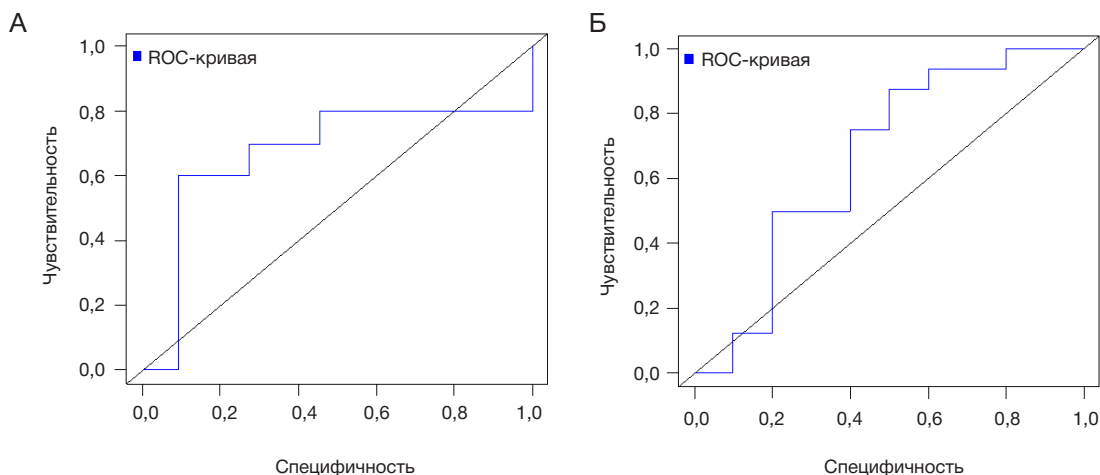


Рис. 5. Операционная кривая, построенная для диагностической модели ПЭ / Норма (А), для ЗРП / ПЭ по МС-данным, зарегистрированным в режиме положительных ионов (Б)

В результате проведенного нами исследования продемонстрирована возможность использования неинвазивного метода определения уровня липидов

в цервико-вагинальной жидкости в комплексном диагностическом мониторинге беременных с плаценто-ассоциированными акушерскими осложнениями.

Литература

- Sutton ALM, Harper LM, Tita ATN. Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018; 45 (2): 333–47.
- Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2020; 135 (6): 1492–5.
- Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, Mazzola JB, Silva CP, Marçal VMG, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet.* 2017; 295 (5): 1061–77.
- Gaccioli F, Lager S. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Front Physiol.* 2016; 7. DOI: 10.3389/fphys.2016.00040.
- Benton SJ, Ly C, Vukovic S, Bainbridge SA. Andrée Gruslin award lecture: Metabolomics as an important modality to better understand preeclampsia. *Placenta.* 2017; 60: S32–S40.
- Kenny LC, Broadhurst D, Brown M, Dunn WB, Redman CWG, Kell DB, et al. Detection and identification of novel metabolomic biomarkers in preeclampsia. *Reprod Sci.* 2008; 15 (6): 591–7.
- Anderson, Deborah K., Liang JW and CL. Applications of Metabolomics in the Study and Management of Preeclampsia; A Review of the Literature *Rachel. Metabolomics.* 2017; 13 (7): 86.
- Comhair SAA, McDunn J, Bennett C, Fettig J, Erzurum SC, Kalhan SC. Metabolomic Endotype of Asthma. *J Immunol.* 2015; 195 (2): 643–50.
- Moros G, Boutsikou T, Fotakis C, Iliodromiti Z, Sokou R, Katsila T, et al. Insights into intrauterine growth restriction based on maternal and umbilical cord blood metabolomics. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 1–10.
- Parry S, Leite R, Esplin MS, Bukowski R, Zhang H, Varner M, Andrews WW, Saade GR, Ilekis J, Reddy UM, Huang H, Sadovsky Y, Blair IA, Biggio J; Cervicovaginal fluid proteomic analysis to identify potential biomarkers for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 222 (5): 493.e1–493.e13. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.11.1252. Epub 2019 Nov 20.
- Park S, You YA, Yun H, Choi SJ, Hwang HS, Choi SK, Lee SM, Kim YJ. Cervicovaginal fluid cytokines as predictive markers of preterm birth in symptomatic women. *Obstet Gynecol Sci.* 2020; 63 (4): 455–63. DOI: 10.5468/ogs.19131. Epub 2020 Jun 19.
- AbuZar Ansari, Heeyeon Lee, Young-Ah You, Youngae Jung, Sunwha Park, Soo Min Kim, Geum-Sook Hwang, Young Ju Kim. Identification of Potential Biomarkers in the Cervicovaginal Fluid by Metabolic Profiling for Preterm Birth *Metabolites.* 2020; 10 (9): 349. DOI: 10.3390/metabo10090349.
- Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology.* 2012; 30 (10): 918–20.
- Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11. DOI: 10.1186/1471-2105-11-395.
- Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics.* 2017; 18 (1): 1–11.
- Liebisch G, Vizcaíno JA, Köfeler H, Trötz Müller M, Griffiths WJ, Schmitz G, et al. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2013; 54 (6): 1523–30.
- R : A Language and Environment for Statistical Computing. 2018. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing.
- R team. R Studio: Integrated Development for R. 2016.
- Bozdogan H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika.* 1987; 52 (3): 345–70.
- Kabaran S, Besler HT. Do fatty acids affect fetal programming? *J Health Popul Nutr.* 2015; 33: 14. DOI: 10.1186/s41043-015-0018-9. PMID: 26825664.
- Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, Bielawski J, Pierce JS, Sato Y, Takaori-Kondo A, Konishi I, Yamashita K. Sphingolipid pathway regulates innate immune responses at the fetomaternal interface during pregnancy. *J Biol Chem.* 2015; 290 (4): 2053–68. DOI: 10.1074/jbc.M114.628867. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25505239.
- Herrera E. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: RA Polin, WW Fox, SH Abman, editors. *Fetal and Neonatal Physiology.* 2004; p. 375–388.
- Погорелова Т. Н. Линде В. А., Гунько В. О., Крукиер И. И., Селюткина С. Н. Метаболизм, транспорт и состав липидов в плаценте. *Фундаментальные исследования.* 2015; 2 (26): 5832–6.
- Stewart DJ, Monge JC. Hyperlipidemia and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol.* 1993; 4: 319–24.
- Wiznitzer A, Mayer A, Novack V. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational diabetes mellitus: a population-based study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2009; 201 (5): 482.e1–482.
- Jin W-Y, Lin S-L, Hou R-L, Xiao-Yang Chen, Ting Han, Yan Jin, et al. Associations between maternal lipid profile and pregnancy complications and perinatal outcomes: a population-based study from China. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2016; 16: 60. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12884-016-0852-9>.
- Oluwole AA, Adegbesan-Omilabu MA, Okunade KS. Preterm delivery and low maternal serum cholesterol level: Any correlation? *Nigerian Medical Journal: Journal of the Nigeria Medical Association.* 2014; 55: 5: 406–10. Available from: <https://doi.org/10.4103/0300-1652.140381>.

References

- Sutton ALM, Harper LM, Tita ATN. Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018; 45 (2): 333–47.
- Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2020; 135 (6): 1492–5.
- Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, Mazzola JB, Silva CP, Marçal VMG, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet.* 2017; 295 (5): 1061–77.
- Gaccioli F, Lager S. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Front Physiol.* 2016; 7. DOI: 10.3389/fphys.2016.00040.
- Benton SJ, Ly C, Vukovic S, Bainbridge SA. Andrée Gruslin award lecture: Metabolomics as an important modality to better understand preeclampsia. *Placenta.* 2017; 60: S32–S40.
- Kenny LC, Broadhurst D, Brown M, Dunn WB, Redman CWG, Kell DB, et al. Detection and identification of novel metabolomic biomarkers in preeclampsia. *Reprod Sci.* 2008; 15 (6): 591–7.
- Anderson, Deborah K., Liang JW and CL. Applications of Metabolomics in the Study and Management of Preeclampsia; A Review of the Literature *Rachel. Metabolomics.* 2017; 13 (7): 86.
- Comhair SAA, McDunn J, Bennett C, Fettig J, Erzurum SC, Kalhan SC. Metabolomic Endotype of Asthma. *J Immunol.* 2015; 195 (2): 643–50.
- Moros G, Boutsikou T, Fotakis C, Iliodromiti Z, Sokou R, Katsila T, et al. Insights into intrauterine growth restriction based on maternal and umbilical cord blood metabolomics. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 1–10.
- Parry S, Leite R, Esplin MS, Bukowski R, Zhang H, Varner M,

- Andrews WW, Saade GR, Ileakis J, Reddy UM, Huang H, Sadosky Y, Blair IA, Biggio J; Cervicovaginal fluid proteomic analysis to identify potential biomarkers for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 222 (5): 493.e1–493.e13. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.11.1252. Epub 2019 Nov 20.
11. Park S, You YA, Yun H, Choi SJ, Hwang HS, Choi SK, Lee SM, Kim YJ. Cervicovaginal fluid cytokines as predictive markers of preterm birth in symptomatic women. *Obstet Gynecol Sci.* 2020; 63 (4): 455–63. DOI: 10.5468/ogs.19131. Epub 2020 Jun 19.
 12. AbuZar Ansari, Heeyeon Lee, Young-Ah You, Youngae Jung, Sunwha Park, Soo Min Kim, Geum-Sook Hwang, Young Ju Kim. Identification of Potential Biomarkers in the Cervicovaginal Fluid by Metabolic Profiling for Preterm Birth *Metabolites.* 2020; 10 (9): 349. DOI: 10.3390/metabo10090349.
 13. Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology.* 2012; 30 (10): 918–20.
 14. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11. DOI: 10.1186/1471-2105-11-395.
 15. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics.* 2017; 18 (1): 1–11.
 16. Liebisch G, Vizcaíno JA, Köfeler H, Trötz Müller M, Griffiths WJ, Schmitz G, et al. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2013; 54 (6): 1523–30.
 17. R : A Language and Environment for Statistical Computing. 2018. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing.
 18. R team. R Studio: Integrated Development for R. 2016.
 19. Bozdogan H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika.* 1987; 52 (3): 345–70.
 20. Kabaran S, Besler HT. Do fatty acids affect fetal programming? *J Health Popul Nutr.* 2015; 33: 14. DOI: 10.1186/s41043-015-0018-9.PMID: 26825664.
 21. Mizugishi K, Inoue T, Hatayama H, Bielawski J, Pierce JS, Sato Y, Takaori-Kondo A, Konishi I, Yamashita K. Sphingolipid pathway regulates innate immune responses at the fetomaternal interface during pregnancy. *J Biol Chem.* 2015; 290 (4): 2053–68. DOI: 10.1074/jbc.M114.628867. Epub 2014 Dec 11.PMID: 25505239.
 22. Herrera E. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: RA Polin, WW Fox, SH Abman, editors. *Fetal and Neonatal Physiology.* 2004; p. 375–388.
 23. Pogorelova TN, Linde VA, Gunko VO, Krukier II, Seljutina SN. Metabolizm, transport i sostav lipidov v placente. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2015; 2 (26): 5832–6. Russian.
 24. Stewart DJ, Monge JC. Hyperlipidemia and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol.* 1993; 4: 319–24.
 25. Wiznitzer A, Mayer A, Novack V. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational diabetes mellitus: a population-based study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2009; 201 (5): 482.e1–482.
 26. Jin W-Y, Lin S-L, Hou R-L, Xiao-Yang Chen, Ting Han, Yan Jin, et al. Associations between maternal lipid profile and pregnancy complications and perinatal outcomes: a population-based study from China. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2016; 16: 60. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12884-016-0852-9>.
 27. Oluwole AA, Adegbesan-Omilabu MA, Okunade KS. Preterm delivery and low maternal serum cholesterol level: Any correlation? *Nigerian Medical Journal: Journal of the Nigeria Medical Association.* 2014; 55: 5: 406–10. Available from: <https://doi.org/10.4103/0300-1652.140381>.