

Федеральное государственное автономное  
Образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Прокальцитонин как маркер в оценке степени тяжести преэклампсии.  
Взаимосвязь между генами тромбофилии *F2*, *F5*, *MTHFR*  
и развитием преэклампсии.

Научные руководители

\_\_\_\_\_

к.б.н., доцент Т.Н.Субботина

подпись, дата

инициалы, фамилия

\_\_\_\_\_

к.б. н., биолог КДЛ Н.Н.Молокова

подпись, дата

инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_

Е.В.Васильева

подпись, дата

инициалы, фамилия

Рецензент

\_\_\_\_\_

д.м.н., профессор Ю.И. Гринштейн

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## Аннотация

Преэклампсия остается одной из актуальных проблем современного акушерства и является ведущей причиной материнской и внутриутробной / неонатальной смертности и заболеваемости во всем мире.

ПЭ – это мультисистемное заболевание, точные причины которого еще не достаточно выяснены.

Несмотря на разнообразие предложенных шкал и методик, до сих пор не существует четких критериев, позволяющих с достаточной степенью достоверности определить степень тяжести ПЭ и особенно прогнозировать его дальнейшее течение, что важно для выбора своевременной адекватной акушерской тактики.

Высокая частота ПЭ и характер ее осложнений для матери и плода диктуют необходимость поиска новых эффективных способов профилактики и диагностики причины возникновения, а также диагностики степени ПЭ. На сегодняшний день не существует специфического прогностического маркера.

Неизученным остается вопрос о возможности применения прокальцитонина (PCT) как маркера тяжести системного воспалительного ответа в прогностическом процессе при ПЭ.

PCT, предшественник кальцитонина (СТ), является прогормоном, участвующим в воспалительных процессах, который мало изучен в контексте беременности.

В ранних исследованиях сообщалось, что гены тромбофилии связаны с состоянием гиперкоагуляции, что может частично объяснять развитие ПЭ. В последние десятилетия большое внимание было уделено роли, которую гены тромбофилии (*F2*, *F5* и *MTHFR*) могут играть в развитии ПЭ.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы являлось измерение уровня PCT у беременных женщин с ПЭ и без ПЭ иммунохроматографическим методом. Далее анализ на наличие полиморфизмов генов тромбофилии (*F2*, *F5* и *MTHFR*) методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad).

На фоне повышения содержания и активности стандартных маркеров у беременных женщин с ПЭ наблюдалось и повышенные уровни PCT как по сравнению с контрольной группой, так и по мере увеличения степени тяжести заболевания.

Отличий по распространенности полиморфизмов G20210A в гене *F2*, G1691A в гене *F5* и C677T в гене *MTHFR* среди группы беременных женщин с ПЭ и контрольной группы не было выявлено.

Ключевые слова: ПРЕЭКЛАМПСИЯ, ПРОКАЛЬЦИТОНИН, ГЕНЫ ТРОМБОФИЛИИ (*F2*, *F5*, *MTHFR*).

### Автореферат

Магистерская диссертация по теме «Прокальцитонин как маркер в оценке степени тяжести преэклампсии. Взаимосвязь между преэклампсией и генами тромбофилии *F2*, *F5*, *MTHFR* и развитием преэклампсии» содержит 62 страницы текстового документа, 3 иллюстрации, 6 таблиц, 61 использованных источников.

Ключевые слова: преэклампсия, PCT, *F2*, *F5*, *MTHFR*.

**Цель работы:** Определить прогностическую значимость уровня PCT в комплексной оценке степени тяжести ПЭ и оценить влияние на развитие ПЭ полиморфизмов генов тромбофилии.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести анализ литературы по теме исследования.
2. Определить уровень PCT и других клинико-биохимических показателей у беременных женщин с ПЭ и беременных женщин без ПЭ и провести сравнительный анализ.
3. Оценить возможность использования показателя уровня PCT в комплексной оценке степени тяжести ПЭ.
4. Оценить влияние на развитие ПЭ полиморфизмов генов тромбофилии (*F2*, *F5* и *MTHFR*).

## Abstract

Master's dissertation on “Procalcitonin as a marker in assessment of severity of preeclampsia. The interconnection between preeclampsia and thrombophilia genes F2, F5, MTHFR and the development of preeclampsia” contains 62 pages of a text, 3 illustrations, 6 table charts, 61 sources used.

Key words: preeclampsia, PCT, *F2*, *F5*, *MTHFR*.

**Aim of the work:** To determine the prognostic significance of the PCT level in a complex assessment of the severity of PE and to estimate the influence of thrombophilia gene polymorphisms in the development of PE.

Based on this goal, the following objectives were set:

1. Analyze the literature on the research topic.
2. Estimate the level of PCT and other clinical and biochemical parameters in pregnant women with PE and pregnant women without PE and conduct a comparative analysis.
3. Evaluate the possibility of PCT level indicator use in a comprehensive assessment of the severity of PE.
4. Estimate the influence of thrombophilia gene polymorphisms (*F2*, *F5* and *MTHFR*) on the development of PE.

Оглавление	
Введение.....	8
1 Обзор литературы .....	11
1.1 Патогенез ПЭ.....	11
1.2 ПЭ как одна из основных проблем в современном акушерстве .....	12
1.3 Классификация ПЭ .....	14
1.3.1 Клинические проявления ПЭ.....	15
1.4 Возможные преимущества биохимических маркеров при ПЭ .....	15
1.5 РСТ со стороны системного воспаления .....	16
1.5.1 Биологические функции РСТ .....	20
1.5.2 Структура и биосинтез РСТ.....	20
1.5.3 Функции РСТ в норме и при патологии .....	23
1.5.4 РСТ как биомаркер ПЭ.....	25
1.6 Гены тромбофилии и фолатного цикла, ассоциированные с ПЭ .....	27
2 Материалы и методы .....	32
2.1 Определение количества РСТ в сыворотке крови.....	34
2.2 Определение белка в моче .....	34
2.3 Определение общего билирубина .....	35
2.4 Определение уровня АлТ в сыворотке крови.....	35
2.5 Определение количества фибриногена в плазме крови.....	36
2.6 Измерение лактата в сыворотке крови .....	37
2.7 Определение уровня АсТ в сыворотке крови .....	37
2.8 Подсчет количества лейкоцитов и тромбоцитов.....	37
2.9 Определение уровня ЛДГ в сыворотке крови.....	38
2.10 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех).....	38
2.11 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ» (НПФ Литех) с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad) .....	39
3 Результаты и обсуждение.....	42

43	Заключение .....	43
Выводы.....		45
Приложение 1 .....		46
Список литературы .....		47

## Список сокращений

ПЭ – преэклампсия

РСТ– прокальцитонин

СТ– кальцитонин

ПИТ– палата интенсивной терапии

ССВО– синдром системного воспалительного ответа

ВТЭ– венозная тромбоэмболия

РДС–респираторным дистресс– синдромом

ЗУВР– задержка внутриутробного развития

М– макрофаг

МТНFR– метилентетрагидрофолатредуктаза

КСТ–катакальцитонин

## Введение

Преэклампсия (ПЭ) по – прежнему остается одной из актуальных проблем современного акушерства и является ведущей причиной материнской и внутриутробной / неонатальной смертности и заболеваемости во всем мире [1].

ПЭ – это мультисистемное заболевание, точные причины которого еще не достаточно выяснены. Считается что, ПЭ это гетерогенный синдром, клинически проявляемый повышенным кровяным давлением и протеинурией матери, возникающими после 20 недель беременности. Клинические проявления ПЭ широко варьируются: от легкой ПЭ с умеренным повышением артериального давления и протеинурии до наиболее тяжелого расстройства с судорогами и синдромом HELLP (гемолиз, повышение уровня ферментов печени и низкий уровень тромбоцитов), который серьезно угрожает жизни беременных женщин и их плода [3].

Женщин, беременность которых осложнена ПЭ различной степени тяжести, наблюдается неблагоприятное течение данной беременности, родов, усугубляется течение соматической патологии, что негативно отражается на состоянии здоровья их самих и новорожденных (гипотрофия, респираторный дистресс–синдром, перинатальная энцефалопатия, перинатальная смертность). До сих пор не существует способа, позволяющего с достаточной степенью достоверности определить степень тяжести ПЭ и особенно прогнозировать его дальнейшее течение, что важно для выбора своевременной адекватной акушерской тактики [2].

Несмотря на разнообразие предложенных шкал и методик, до сих пор не существует четких критериев, позволяющих с достаточной степенью достоверности определить степень тяжести ПЭ. Высокая частота ПЭ и характер ее осложнений для матери и плода диктуют необходимость поиска новых эффективных способов профилактики и диагностики причины возникновения, а



также диагностики степени ПЭ. На сегодняшний день не существует специфического прогностического маркера [5].

Неизученным остается вопрос о возможности применения РСТ как маркера тяжести системного воспалительного ответа в прогностическом процессе при ПЭ.

РСТ, предшественник кальцитонина (СТ), является прогормоном, участвующим в воспалительных процессах, который мало изучен в контексте беременности [7].

В ранних исследованиях сообщалось, что гены тромбофилии связаны с состоянием гиперкоагуляции, что может частично объяснять развитие ПЭ. В последние десятилетия большое внимание было уделено роли, которую гены тромбофилии могут играть в развитии ПЭ [12].

Генетических маркеров, которые на сегодняшний день признаются важными в отношении венозных тромбозов и ассоциированных с ПЭ, всего два: это полиморфизм в гене V фактора (Лейден) и полиморфизм в гене II фактора – протромбина. Наличие полиморфизмов *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C или иных мутаций гена *MTHFR* ассоциировано со склонностью к тромбозам не непосредственно, а через гипергомоцистеинемию [34].

Предполагается, что тест на РСТ может быть использован в комплексной оценке степени ПЭ. Так же предполагается, что женщины с ПЭ могут быть носителями полиморфизмов тромбофилии: *F2*, *F5* и *MTHFR*. Что может быть одной из причин возникновения данного заболевания.

Цель исследования: Определить прогностическую значимость уровня РСТ в комплексной оценке степени тяжести ПЭ и оценить влияние на развитие ПЭ полиморфизмов генов тромбофилии .

Задачи исследования:

1. Провести анализ литературы по теме исследования.

2. Определить уровень PCT и других клиничко – биохимических показателей у беременных женщин с ПЭ и беременных женщин без ПЭ и провести сравнительный анализ.

3. Оценить возможность использования показателя уровня PCT в комплексной оценке степени тяжести ПЭ.

4. Оценить влияние на развитие ПЭ, полиморфизмов генов тромбофилии (*F2*, *F5* и *MTHFR*).

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Патогенез ПЭ

Началом развития ПЭ в современном акушерстве выделяют нарушение плацентации. Если беременность протекает нормально, с 7 по 16 неделю эндотелий, внутренний эластичный слой и мышечные пластинки участка спиральных артерий, вытесняется трофобластом и фибриносодержащим аморфным матриксом. В результате понижается давление в сосудистом русле и создается дополнительный приток крови для обеспечения нормального кровоснабжения плода и плаценты. ПЭ связана с неполным вторжением или отсутствием трофобласта в область спиральных артерий, что приводит к сохранению участков сосудистой стенки, имеющей нормальное строение. В дальнейшем же воздействие на эти сосуды веществ, вызывающих вазоспазм, ведет к сужению их просвета и последующему развитию плацентарной ишемии [8].

В ответ на плацентарную ишемию начинают вырабатываться плацентарные, в том числе антиангиогенные факторы и медиаторы воспаления, которые повреждают клетки эндотелия. Когда компенсаторные механизмы кровообращения на исходе, плацента с помощью прессорных агентов активно начинает «подстраивает» под себя артериальное давление, при этом временно усиливая кровообращение. В итоге возникает дисфункция эндотелия [0].

Активируется большое количество механизмов, ведущих к повреждению эндотелиальных клеток во всем организме. В результате системной эндотелиальной дисфункции нарушаются функции жизненно важных органов и систем, и в итоге начинают проявляться клинические признаки ПЭ [0].

Из-за нарушение плацентарной перфузии, патологии плаценты и спазма сосудов увеличивается риск гибели плода, задержки внутриутробного развития (ЗВР), рождения детей на раннем сроке. Поэтому дети, родившиеся от матерей с

ПЭ, имеют более высокий показатель заболеваемости респираторным дистресс-синдромом (РДС).

Представление о том, что плацента является источником патогенных механизмов на основе ПЭ, в настоящее время является общепринятым. Поскольку ПЭ представляет собой расстройство, которое возникает примерно после 20-й недели беременности, тогда как уже в первом триместре начинается повреждение плаценты беременной. Одной из проблем изучения этого синдрома является поиск прогностического маркера. В настоящее время, однако, нет никаких плазматических факторов, которые можно было бы считать маркерами ПЭ с прогностическим значением [0].

## **1.2 ПЭ как одна из основных проблем в современном акушерстве**

ПЭ является тяжелым и очень осложненным заболеванием беременности.

ПЭ занимает 2–3 место в структуре материнской и перинатальной смертности. В структуре осложнений беременности от 10,1 % до 20,0 %, среди причин материнской смертности 21,3 % и неонатальной смертности составляет 12,1 %. По данным отечественных и зарубежных авторов, в настоящее время отмечается нарастание частоты ПЭ. в основном за счет увеличения тяжелых форм, сопровождающихся, развитием полиорганной недостаточности [9].

Перинатальная смертность при данном осложнении беременности превышает средние показатели в 5–6 раз. Важно отметить, что в большинстве случаев в результате экстренного родоразрешения по поводу тяжелой ПЭ, новорожденным требуется наблюдение и лечение в палате интенсивной терапии (ПИТ). В дальнейшем с переводом на лечение в детские больницы. С патологией, как РДС, перинатальная энцефалопатия, синдром задержки психомоторного развития и др., что не может не сказаться на их дальнейшем развитии и состоянии здоровья [14].

Несмотря на то, что, на сегодняшний день существует большое разнообразие предложенных шкал и методик, но до сих пор не существует метода, позволяющего достоверно определять степень тяжести ПЭ и прогнозировать дальнейшее развитие: Выраженность отеков, протеинурии и артериальная гипертензия не всегда коррелируют с тяжестью патологических процессов при ПЭ. Граница между тяжелой ПЭ и средней ПЭ, достаточно относительна, поэтому постановка диагноза является очень важным аспектом, при выборе акушерской тактики, и носит основополагающий характер в прогностическом диагнозе для здоровья матери и ребенка [13].

Наиболее перспективным путем профилактики тяжелых форм ПЭ являются мероприятия, которые направлены на определение начальных механизмов, развития полиорганной недостаточности [11].

По статистике, более 60 000 женщин во всем мире ежегодно умирают от этой болезни, что является одной из основных причин материнской смертности. Пока нет теорий относительно его причин, так что сегодня осложнений можно избежать только ранними родами. Это приводит к преждевременным родам по сильно ятрогенным причинам со всеми их последствиями. Кроме того, многочисленные исследования, проведенные за последние несколько лет, подтвердили, что женщины, страдающие этим заболеванием, на всю оставшуюся жизнь подвержены риску сердечно – сосудистых заболеваний (инсульт, инфаркт), диабета II типа или метаболического синдрома [12, 13].

Проблеме ПЭ во всем мире уделяется огромное внимание, но изменений в понимании этого осложнения за последние годы к сожалению не произошло. Существующие на сегодняшний день методы лечения носят только посиндромный характер. Со стороны диалектического подхода патогенетическим лечением является только прерывание беременности иногда на ранних сроках, это неизбежно при развитии тяжелых формах ПЭ.

В этом случае, адекватная оценка тяжести ПЭ, могла бы способствовать своевременному определению показаний для досрочного прерывания беременности, и увеличить шанс к сохранению здоровья матери и ребенка.[15].

На основании многих исследований, посвященных патогенезу, сделали вывод, что в основе патофизиологических механизмов развития полиорганной недостаточности любого генеза, в т. ч. и при тяжелой ПЭ, лежит синдром системного воспалительного ответа (ССВО).

Относительно этой теории, возникающий воспалительный ответ не является специфичным и может стимулироваться любой формой повреждения ткани и иммунными конфликтами. В результате происходит активация эндотелия, моноцитов, свертывающей системы крови. Исходя из этого, ПЭ представляют как (ССВО), обуславливающие эндотелиальную дисфункцией, вазоспазмом, активацией окислительных и дефицитом антиоксидантных механизмов, гиперкоагуляцией и гиперлипидемией [14].

Многие авторы, предполагают, единого механизма в развития ПЭ не существует. Прослеживается сочетание разных этиологических факторов: гормональных, генетических, плацентарных, нейrogenных, иммунологических [15].

Развитие ПЭ не связано с наличием у беременных женщин соматической патологии, так как наблюдается развитие заболевания и у практически здоровых женщин.

### **1.3 Классификация ПЭ**

В зависимости от тяжести проявления выделяют следующие степени ПЭ:

Легкая степень ПЭ: АД до 130/90 мм рт. ст., уровень белка в моче (до 1 г/л). Увеличивается уровень креатинина и тромбоцитов в крови. Появляется отечность конечностей.

Средняя степень ПЭ: АД до 150/110 мм рт. ст., количество белка увеличивается до 5 г/л. Происходит нарушение функции почек, отеки нарастают.

Тяжелая степень ПЭ: АД повышается до 170/110 мм рт. ст., наблюдается расстройство со стороны зрительных органов. Усиливается болевой синдром в области эпигастрии. Усиливается головная боль. Появляется отечность лица. Тяжелая степень ПЭ: обусловлена наличием судорог и развитием HELLP – синдрома. Уровень активности ферментов печени увеличивается, количество тромбоцитов в крови снижается (тромбоцитопения). Наличие указанных факторов свидетельствует о необходимости срочного прерывания беременности [0].

### **1.3.1 Клинические проявления ПЭ**

Со стороны центральной нервной системы: головная боль, фотопсия, парестезии, судороги.

Со стороны сердечно – сосудистой системы: артериальная гипертензия, сердечная недостаточность, гиповолемия.

Со стороны мочевыделительной системы: олигурия, анурия, протеинурия.

Со стороны желудочно – кишечного тракта: боли в эпигастральной области, изжога, тошнота, рвота.

Со стороны системы крови: тромбоцитопения, изменение гемостаза, гемолитическая анемия.

Со стороны плода: задержка внутриутробного роста, внутриутробная гипоксия, антенатальная гибель [11].

## **1.4 Возможные преимущества биохимических маркеров при ПЭ**

Несмотря на отсутствие существующих профилактических и терапевтических средств против ПЭ, поиск не инвазивных биомаркеров крови

или мочи, которые могут предсказать развитие или помочь в обнаружении этого опасного для жизни расстройства беременности, по –прежнему имеет первостепенное значение. Доступность таких маркеров может иметь решающее влияние на лечение беременных женщин и их детей (например, обращение в специализированный центр), но также и на медицинские расходы, связанные с этим опасным состоянием здоровья. На протяжении многих лет исследуются различные биофизические и биохимические маркеры на основе патофизиологических наблюдений, которые были отмечены в случае ПЭ, таких как плацентарная дисфункция, генерализованный воспалительный ответ, эндотелиальная дисфункция и активация системы свертывания крови [22].

Неправильный диагноз является проблемой для акушерской помощи в больницах, из-за множества клинических симптомов, связанных с синдромом. Таким образом, наличие одного или нескольких надежных биохимических индикаторов может помочь в установлении клинического диагноза.

Биохимические маркеры могут позволить разделить пациентов с ПЭ на разные категории в зависимости от тяжести симптомов и исхода беременности, таким образом, улучшить клиническое ведение пациентов [23].

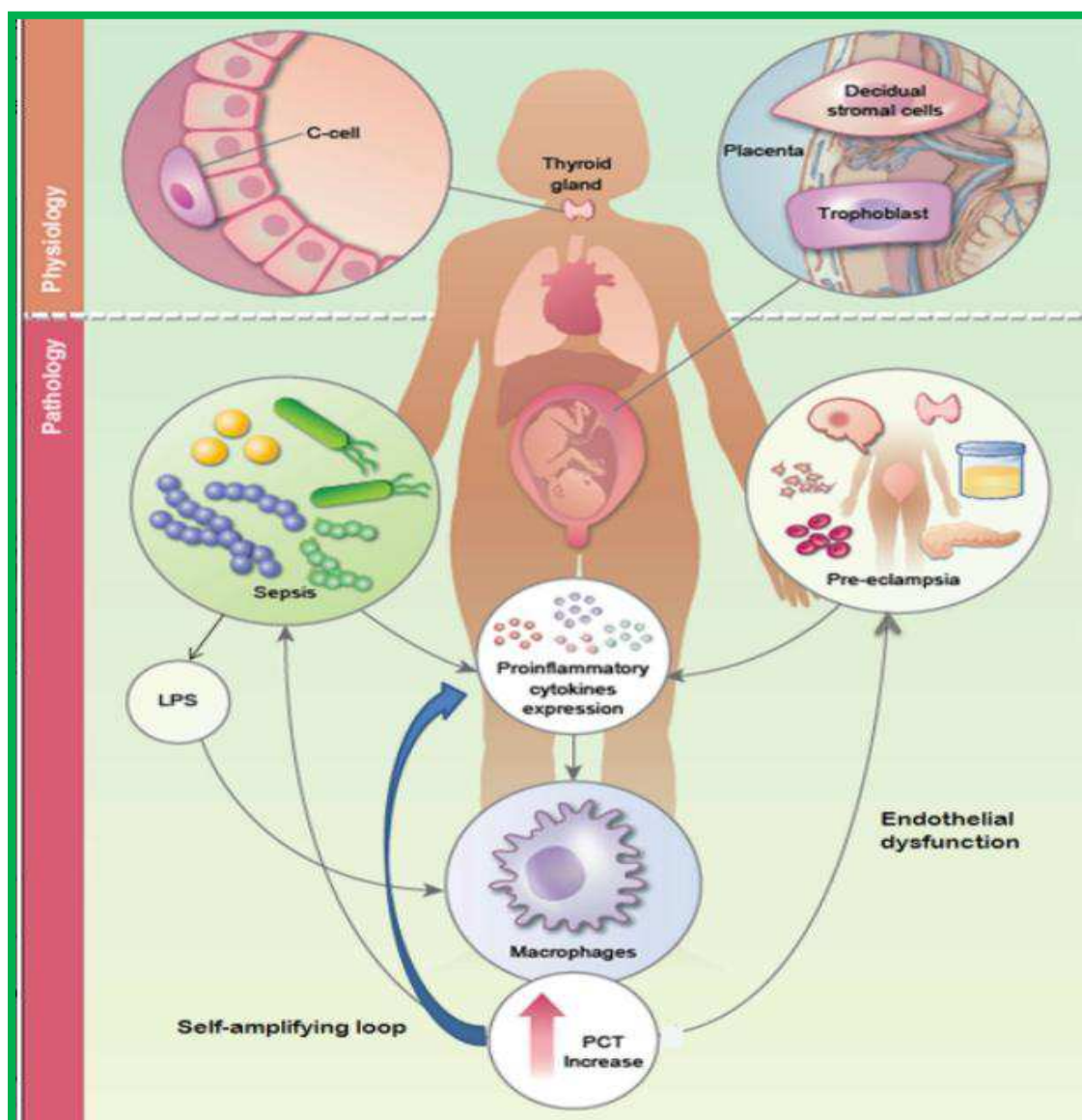
Очень важно, что, биомаркеры могут обеспечить надежную раннюю оценку заболевания у бессимптомных беременных женщин, в частности, среди целых групп повышенного риска на основании их клинического анамнеза (ПЭ или гипертензия во время предыдущей беременности) или состояния до беременности (гипертония, ожирение, аутоиммунные заболевания [22]).

### **1.5 PCT со стороны системного воспаления**

PCT предшественник СТ, является прогормоном, участвующим в воспалительных процессах, который мало изучен в контексте беременности. Во время тяжелого воспаления PCT происходит практически из всех типов клеток,



включая моноциты и паренхиматозные ткани, что делает его хорошим прогностическим и диагностическим маркером воспалительного состояния с быстрым увеличением уровня в крови при воспалении или сепсисе. При физиологической беременности РСТ продуцируется децидуальными стромальными клетками на очень низком уровне [25].



**Рис.1 Секреция и биологическая функция РСТ при физиологической и патологической беременности.**

Остается неясным вопрос участия РСТ в процессах адаптации при ПЭ, в изменение уровня РСТ – как маркера тяжести (ССВО) при ПЭ.

Впервые PCT был описан в 1984 году как белок, состоящий из 116 аминокислот с молекулярную массу 14.5 KDa. Первоначально PCT свое внимание привлек исследователей в качестве предполагаемого маркера злокачественных новообразований. С.Волуонс соавторами изучали PCT, как маркер медуллярного рака щитовидной железы и параллельно начали изучать информативность предшественников СТ, для этого были получены моноклональные антитела к PCT и разработан радиоиммунометрический метод для определения его концентрации в крови. Та же группа исследователей выявила, что концентрации PCT повышены у больных с мелкоклеточной карциномой легкого, что свидетельствовало о том, что PCT вырабатывается не только клетками щитовидной железы [27].

С начала 1990-х к PCT приковано внимание исследователей, которые пытаются выяснить, является ли он специфическим маркером инфекции. Впервые данные о повышении концентрации PCT в крови при воспалении были получены группой французских военных врачей (Dr. Carsin и др.), которые изучали маркеры острого повреждения легкого у больных с обширными ожогами. В качестве потенциально полезного маркера в исследовании также изучался PCT. Было выявлено, что концентрация его была во многих случаях значимо повышена и часто была во много раз выше, чем концентрации при новообразованиях. Ретроспективный анализ выявил, что у больных с наиболее высоким уровнем PCT в крови развились инфекционные осложнения, в том числе сепсис и септический шок. Такие результаты впервые позволили установить взаимосвязь между уровнем PCT в крови и наличием системного воспаления [29].

Публикаций, посвященных диагностической ценности PCT при сепсисе, злокачественных новообразованиях в литературе встречается достаточно, причем основную массу таких публикаций составляют зарубежные. Однако до сих пор практически не изучался вопрос о применении теста на PCT в акушерской практике, в частности, при диагностике ПЭ. Согласно В.Н. Серову, АД. Макацария, в настоящее время предлагается выделять ССВО инфекционного и

неинфекционного генеза, чем и являются проявления ПЭ в организме женщины. Подобные исследования позволили предложить использование PCT в качестве маркера тяжелого ПЭ [29].

В нормальных физиологических процессах единственной ролью, для PCT является, роль предшественника СТ. СТ регулирует метаболизм костей и кальция, а также ингибирует резорбцию кости остеокластами. Ранее предполагали, что СТ, названный так за гипокальциемический эффект, имеет исключительно тиреоидное происхождение и играет важную роль в скелетном гомеостазе. Однако было выявлено, что при тиреоидэктомии у людей не происходит никаких значительных патологических последствий в отношении гомеостаза кальция, и плотность костей в большинстве случаев остается прежней. Таким образом, физиологические функции зрелого СТ у человека пока еще остаются неизвестными, не были также до сих пор определены нарушения, которые возникают в организме при избытке или дефиците зрелого СТ [26].

По традиционным представлениям в эндокринологии, предшественники СТ вырабатываются в нейроэндокринных C-клетках щитовидной железы. В отсутствие инфекции, экстратиреоидная транскрипция СТ гена подавлена и ограничивается селективной экспрессией в нейроэндокринных клетках, обнаруживаемых главным образом в щитовидной железе и легком. В нейроэндокринных клетках синтезируется зрелый гормон и запасается в секреторных гранулах [30].

При тяжелой системной инфекции PCT продуцируется тканями и вне щитовидной железы. [31].

Кроме тканей щитовидной железы PCT продуцируется атипичными клетками мелкоклеточной карциномы легкого. СТ и родственные пептиды обнаруживаются у человека в нейроэндокринных клетках легкого. Было выявлено, что мРНК PCT экспрессируется у человека в мононуклеарах

периферической крови, а липополисахарид оказывает на эту экспрессию заметный стимулирующий эффект [31].

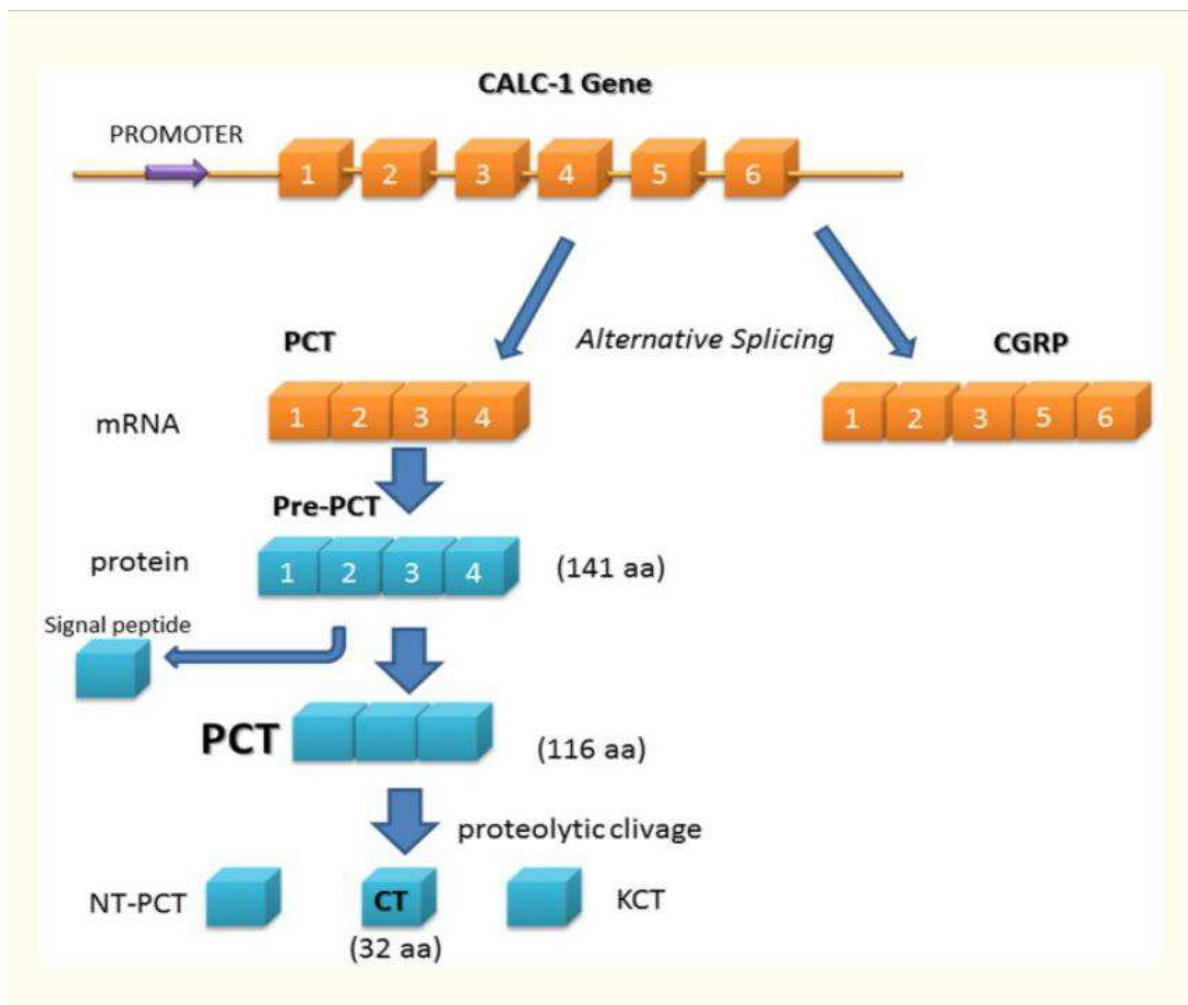
### **1.5.1 Биологические функции PCT**

Физиологическое значение и регуляция продукции PCT до конца не изучены. Некоторые гипотезы предполагают, что PCT может участвовать в метаболизме кальция, цитокиновой сети и модуляции синтеза оксида азота (NO), а также в обезболивающих эффектах. В плазме нет ферментов, расщепляющих PCT. Следовательно, если PCT попадает в кровоток, он остается неизменным с периодом полураспада приблизительно 30 часов, без каких – либо доказательств связывания PCT с какими – либо клеточными рецепторами [32].

PCT способен индуцировать в клетках периферической крови повышение уровней провоспалительных цитокинов. Несмотря на это и другие доказательства, провоспалительные характеристики PCT еще не приняты единогласно [34].

### **1.5.2 Структура и биосинтез PCT**

PCT является прогормоном СТ, состоящим из 116 аминокислот с молекулярной массой 14.5 кДа. У здорового человека PCT и СТ обнаруживаются преимущественно в С-клетках щитовидной железы, где в физиологических условиях и происходит их биосинтез под влиянием кальций зависимых факторов. В норме синтез PCT начинается после транскрипции и активации специального гена в С-клетках щитовидной железы. (Рис.2) Человеческий геном содержит 4 гена для СТ (CALC-I, CALC-II, CALC-III, CALC-IV) с различными генными продуктами: три расположены на коротком плече 11 хромосомы и один на коротком плече 12 хромосомы.



**Рис.2**Схематическое изображение гена СТ

Эти гены собирательно называются «семейством генов PCT». СТ кодируется геном CALC-I. Транскрипция с шести экзонов CALC-I гена на РНК и альтернативный сплайсинг РНК зависят от тканевой локализации. В С-клетках щитовидной железы транскрипция CALC-I гена приводит к образованию двух мРНК, что происходит в результате процесса, названного альтернативным сплайсингом. Первичная транскрипция РНК происходит на разные мРНК в результате включения или выключения из первичной транскрипции определенных экзонов. В результате транскрибируются два белка из 141 аминокислот каждый, оба являются препрокальцитонином с молекулярным весом приблизительно 16 кДа, и отличаются только последовательностями

карбокситерминального пептида, который получил название СТ или ССРІ [33].

Сигнальная группа аминокислот отвечает за распознавание пептида в эндоплазматической сети (ЭПС). После распознавания в ЭПС эндопептидазой отщепляется сигнальный пептид, а оставшаяся часть белковой молекулы представляет собой PCT [30].

При участии специальных внутриклеточных протеаз PCT расщепляется на СТ, катакальцитонин (KCT) и N-концевой PCT. Этот механизм функционирует в норме и приводит к секреции СТ. Однако при наличии сигнального пептида, PCT может ретироваться изолировано после гликозилирования .

По традиционным представлениям в эндокринологии, предшественники СТ вырабатываются главным образом в нейроэндокринных С-клетках щитовидной железы. В отсутствие инфекции, экстратиреоидная транскрипция CALC-I гена подавлена и ограничивается селективной экспрессией в нейроэндокринных клетках, обнаруживаемых главным образом в щитовидной железе и легком. В этих нейроэндокринных клетках синтезируется зрелый гормон и запасается в секреторных гранулах [30].

При тяжелой системной инфекции, PCT продуцируется тканями вне щитовидной железы. Кроме тканей щитовидной железы PCT продуцируется атипичными клетками мелкоклеточной карциномы легкого. СТ и родственные пептиды обнаруживаются у человека в нейроэндокринных клетках легкого. Показано, что легочные нейроэндокринные клетки способны осуществлять секрецию PCT как пара так и эндокринным путем. Установлено, что источником экстратиреоидного синтеза PCT могут быть нейтрофилы, моноциты, лимфоциты. Выявлено, что мРНК PCT экспрессируется у человека в мононуклеарах периферической крови, а липополисахарид оказывает на эту экспрессию заметный стимулирующий эффект. Моноциты, выделенные из крови больных с септическим шоком, показывали более высокий базальный уровень и увеличение содержания PCT в ответ на стимуляцию липополисахаридом. Примерно треть не

стимулированных лимфоцитов содержат иммунологически демонстрируемые количества PCT, однако в данном случае было отмечено лишь незначительное индуцирование синтеза бактериальным липополисахаридом. PCT может вырабатываться в нейроэндокринных клетках печени, кишечника и других тканях [28].

### 1.5.3 Функции PCT в норме и при патологии

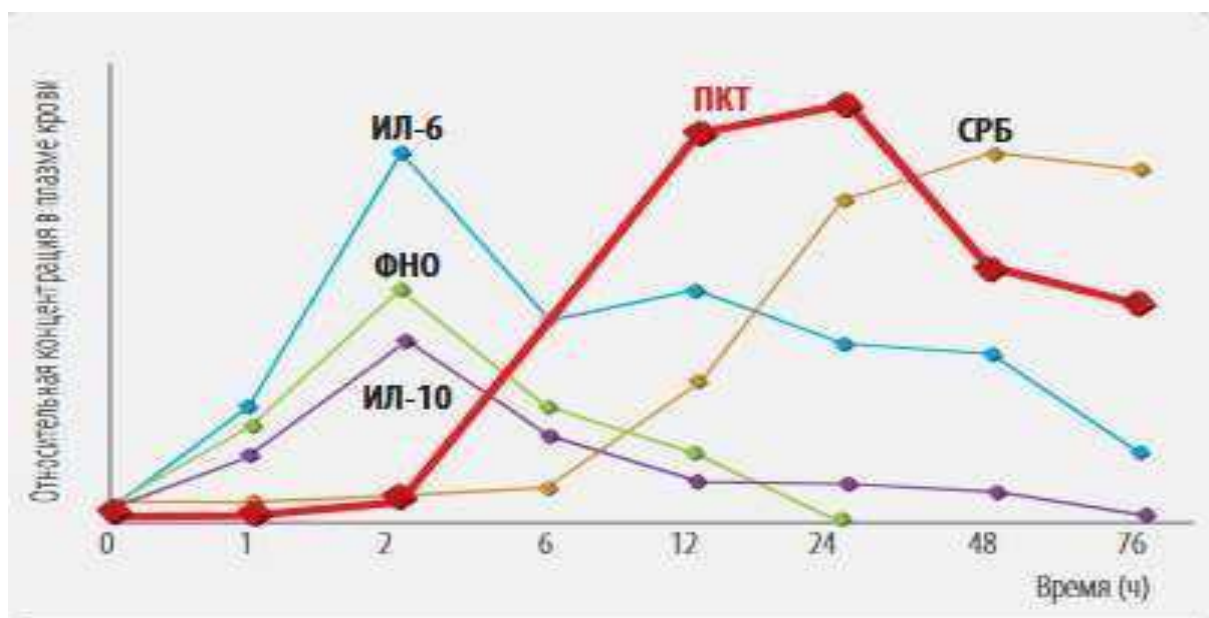
В нормальной физиологии неизвестно никакой другой роли PCT, кроме как служить предшествующей молекулой для тиреоидной продукции СТ. В результате специфического внутриклеточного протеолиза с участием прогормон конвертазы, карбоксипептидазы и аминопептидазы PCT расщепляется на катакальцитонин, СТ и N-концевую группу PCT. Весь PCT метаболизируется указанным образом и не поступает в кровоток. Поэтому уровень PCT у здорового человека очень низок менее 0,5 нг/мл [25].

PCT является стабильным белком в образцах плазмы и сыворотки крови. При хранении образца при комнатной температуре через 24 часа обнаруживают более 80% первоначальной концентрации PCT, а при хранении образца при 4°C более 90%. Период полувыведения PCT равен 24 часа, не зависит от функции почек. Эта быстрая и специфическая индукция PCT после соответствующего стимула и высокая и достоверная продукция PCT у пациентов с тяжелой бактериальной инфекцией или сепсисом, подтверждает патофизиологическую роль PCT в остром иммунном ответе. Применение ряда лекарственных препаратов (антибиотиков, гепарина, диуретиков, вазоактивных средств) в терапевтических дозах не оказывает существенного влияния на концентрацию PCT. Концентрация PCT в артериальной крови приблизительно на 4% выше, чем в венозной [26].

PCT является важным посредником, иммунонейтрализация которого

представляет существенные терапевтические возможности. Повышение уровней РСТ после внутривенного введения бактериального эндотоксина происходит после повышения уровней TNF $\alpha$  и IL $\alpha$ 6. TNF $\alpha$  и IL $\alpha$ 6 достигают своих пиковых концентраций приблизительно к 90 и 180 минутам, но они не определяются в крови уже через сутки. Кроме того, уровни этих цитокинов в силу короткого времени жизни подвержены большим колебаниям в течение дня, чего лишен РСТ. В связи с этим РСТ предоставляет врачу около суток для возможности контроля интенсивности системного воспаления, эффективности терапии и прогноза исхода сепсиса (Рис.3). Продукция РСТ при системном воспалении стимулируется этими цитокинами. По сравнению с цитокинами для РСТ, однако, обычно не наблюдаются механизмов, снижающих его уровни [30].

Это может быть одной из причин, почему РСТ хорошо коррелирует с клиническим состоянием пациента, и поэтому подходит для контроля течения болезни [31].



**Рис.3**Профили кинетики различных маркеров бактериальной инфекции, BRACHMS, 2004

Для исследования РСТ используют плазму и сыворотку крови. Взятие проб крови для исследования на РСТ, производится по стандартным правилам,



принятым при биохимическом анализе крови. Объем пробы около 1 мл сыворотки или плазмы. Стандартные антикоагулянты (гепарин, ЭДТА) не искажают получаемый результат.

**Таблица 1 – Стабильность образцов крови (сыворотки/плазмы) при определении PCT**

<b>Стабильность эндогенного PCT в сыворотке и плазме</b>	
<b>Условия хранения</b>	<b>Падение активности</b>
Комнатная температура	2% в течение 2 часов после взятия крови
	10% через 24 часа хранения
Минус 20°C	Стабилен в течении 6 месяцев
3 цикла замораживания/оттаивания	Меньше 2%

PCT весьма стабилен *in vitro*. В клинических образцах, хранившихся при комнатной температуре, в течение суток распадается не более 12 % PCT, а при – 20°C возможно хранение образцов в течение длительного времени (месяцы) [27].

Из этого следует что, взятие образцов крови для теста на PCT возможно параллельно с другими клиническими пробами, без необходимости немедленного замораживания в случае отсроченного анализа, что указывает на легкость в транспортировке образцов к месту анализа.

#### **1.5.4 PCT как биомаркер ПЭ**

Чрезмерное воспаление на границе плода и матери приводит к гестационным осложнениям, таким как преждевременные роды, ограничение внутриутробного развития и ПЭ. При здоровой беременности иммунорегляторные механизмы предотвращают чрезмерное системное

воспаление врожденных иммунных клеток; однако в ПЭ регуляция иммунных ответов нарушается в результате aberrантной активации [34].

Представление о том, что плацента является источником патогенных механизмов на основе ПЭ, в настоящее время является общепринятым. Не полное ремоделирование спиральной артерии считается начальным этапом патогенетических событий, приводящих к гипертензии, протеинурии и связанной с ней дисфункции матери и плода [34].

Увеличение циркулирующих провоспалительных цитокинов при ПЭ может быть ответственным за увеличение системных уровней РСТ; кроме того, повышенные уровни РСТ индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов, которые стимулируют высвобождение РСТ, и запускает производство самого РСТ, вызывая положительную петлю секреции РСТ. Также РСТ может выполнять еще одну роль, это связь его с цитотоксической активностью на гепатоциты и эндотелий. На самом деле, хорошо известно, что отличительными характеристиками ПЭ являются эндотелиальная дисфункция и повреждение печени [43].

Что касается роли РСТ на границе плода и матери при ПЭ, обнаружили сильное увеличение экспрессии мРНК РСТ в ПЭ по сравнению с нормальной плацентой. Несмотря на то, что трофобласт и децидуальные стромальные и эндотелиальные клетки продуцируют РСТ в физиологических условиях, их нельзя рассматривать как уникальные типы клеток, ответственные за наблюдаемый феномен. На самом деле, все тканевые макрофаги определенно участвуют в продукции РСТ в преэкламптической децидуальной оболочке, что продемонстрировано совместной локализацией иммунореактивности с РСТ. Известно, что при ПЭ в сыворотке содержатся специфические факторы, такие как цитокины или белковые агрегаты, которые способны модулировать синтез нескольких белков [44].

## 1.6 Гены тромбофилии и фолатного цикла, ассоциированные с ПЭ

Беременность—это физиологическое состояние, связанное с повышенным свертыванием, снижением антикоагулянтной активности и снижением фибринолиза.

Появляется все больше доказательств того, что женщины с тромбофилией подвержены повышенному риску не только венозной тромбоэмболии (ВТЭ), связанной с беременностью, но и других сосудистых осложнений во время беременности, таких как потеря плода, ПЭ и задержка внутриутробного развития. (ЗВУР).

Несмотря на многие исследования, проведенные ранее, этиология ПЭ остается неясной. Было выдвинуто множество гипотез для объяснения развития ПЭ, включая материнские и смертельные генетические факторы и факторы окружающей среды, разделенных на четыре категории:

- 1) иммунная дезадаптация
- 2) ишемия плаценты
- 3) окислительный стресс
- 4) генетическая предрасположенность

Комбинации множества взаимодействий между этими категориями могут способствовать этиологии ПЭ. Среди них гиперкоагуляция, которая играет потенциальную роль в развитии ПЭ, приводит к снижению перфузии плацентарной крови, вызванной микротромбами в кровеносных сосудах плаценты, что в конечном итоге приводит к ишемии плаценты [36].

Исследования последних лет показали, что ведущую роль в патогенезе ПЭ играют сосудистые расстройства: ангиоспазм, нарушение состояния и проницаемости сосудистой стенки, изменение реологических свойств крови, микроциркуляции. Исходя из современных представлений о патогенезе ПЭ, в качестве возможных генетических маркеров данной патологии можно выделить полиморфные варианты генов, ответственных за развитие эндотелиальной

дисфункции и гиперкоагуляции. Исследования свидетельствуют о том, что в основе многих видов акушерской патологии, в том числе и ПЭ, лежит развитие микроангиопатий и тромбофилий, связанных с гипергомоцистеинемией, приобретенными или наследственными дефектами системы гемостаза [46].

В ранних исследованиях сообщалось, что гены тромбофилии связаны с состоянием гиперкоагуляции, что может частично объяснять развитие ПЭ. В последние десятилетия большое внимание было уделено роли, которую гены тромбофилии могут играть в развитии ПЭ.

Тромбофилия—это наследственная или приобретенная предрасположенность к тромбозам [48].

Генетических маркеров, которые на сегодняшний день признаются важными в отношении венозных тромбозов, всего два: это полиморфизм в гене V фактора (Лейден) и полиморфизм в гене II фактора—протромбина. Полиморфизм может быть гомозиготным (более «серьезным») и гетерозиготным (менее «серьезным»). Наличие полиморфизмов *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C или иных мутаций гена *MTHFR* ассоциировано со склонностью к тромбозам не непосредственно, а через гипергомоцистеинемию [44].

Успехи молекулярной генетики, достигнутые в течение последних лет, позволили по-новому оценить многие факты, связанные с патологией системы гемостаза, включая наследственную предрасположенность к кровотечениям или тромбозам. Тромбофилия может быть наследственным нарушением, но может быть связана и с внешними причинами, среди которых стоит и беременность. Учитывая недостаточную освещенность вопросов, связанных с изучением влияния наследственных мутаций в генах, кодирующих факторы плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза на особенности развития тромботических осложнений, которые возникают при ПЭ, эти вопросы продолжают представлять собой научный и практический интерес [47].

За последние годы наиболее обстоятельно изучен аллельный полиморфизм гена *MTHFR* C677T, белковый продукт которого (метилентетрагидрофолатредуктаза) контролирует превращение фолиевой кислоты в метаболически активные формы и регулирует обмен гомоцистеина. Снижение активности этого фермента (аллель 677T) сопряжено с нарушением фолатного метаболизма, результатом которого является накопление гомоцистеина в организме беременной женщины и дефицит фолиевой кислоты. Повышение уровня гомоцистеина является фактором риска развития тромбофилических осложнений, вероятность которых увеличивается во время беременности вследствие перестройки систем свертывания, антисвертывания и фибринолитической системы организма [43].

Из-за легкой гипергомоцистеинемии, обнаруживаемой у женщин с ПЭ, полиморфизм *MTHFR* C677T может быть генетическим фактором, способствующим патофизиологической ПЭ. В ПЭ был продемонстрирован сильный наследственный компонент: женщины, родившиеся в результате ПЭ, сами подвергаются повышенному риску ПЭ во время собственной беременности. Мужчины, родившиеся в результате преэкламптической беременности, имеют повышенный риск стать отцом преэкламптической беременности [57]. Генетическая предрасположенность играет важную роль в развитии ПЭ, но попытки показать связь между *MTHFR* C677T и ПЭ дали сильно различающиеся результаты [55].

Ген *F5* кодирует свертывающий фактор V (фактор Лейден) – белок, выступающий в роли кофактора для фактора свертывания X, превращающего протромбин в тромбин. Мутация гена *F5* G1691A (R506Q) обусловлена заменой нуклеотидного основания гуанина (G) на аденин (A) в положении 1691, что приводит к аминокислотной замене аргинина на глутамин в позиции 506, соответствующей главному сайту специфического расщепления *F5* активированным протеином C [53]. В результате этого активированная форма

фактора V не подвергается расщеплению со стороны активированного протеина C, что приводит к гиперкоагуляции. По данным ряда авторов, у женщин с мутацией гена *F5 G1691A* обнаруживаются тромбозы в плаценте, что и является причиной повышенного риска ПЭ, невынашивания беременности, отслойки плаценты. Носительство гетерозиготного варианта *F5 G1691A* увеличивает риск развития тромбоза в 3–7 раз, а в гомозиготном состоянии этот риск увеличивается в 50–100 раз. Распространенность мутации гена *F5 G1691A* составляет от 1 до 8 % в различных популяциях [52].

Ген *F2* кодирует свертывающий фактор II, или протромбин гликопротеиновый зимоген, который под действием активированного фактора свертывания X превращается в тромбин – ключевой фермент гемокоагуляции [44]. Мутация гена протромбина *F2 G20210A* возникает в 3'– некодирующем регионе гена и приводит к повышению уровня протромбина в плазме крови в 1,5–2 раза относительно нормы, увеличивая риск тромбозов в 2–4 раза. Предполагается, носительство гетерозиготного варианта *F2 G20210A* ассоциируется с повышением риска ранних репродуктивных потерь в 2,5–2,7 раза, ПЭ – в 2,5–7,1 раз, однако эти данные противоречивы [46]. Мутация гена протромбина *F2 G20210A* встречается в 1–6% популяции [47].

Вопрос о значимости аллельного полиморфизма генов фолатного обмена и системы гемостаза при ПЭ до сих пор остается открытым, поскольку результаты современных работ по выявлению ассоциации полиморфизмов с нарушением физиологического течения беременности весьма противоречивы [54].

Появляется все больше доказательств того, что женщины с тромбофилией подвержены повышенному риску не только венозной тромбоэмболии (ВТЭ), связанной с беременностью, но и других сосудистых осложнений во время беременности, таких как потеря плода, ПЭ и задержка внутриутробного развития. (ЗВУР) [45].

Значимость это вопроса рассматривалось Национальным медицинским университетом имени А.А. Богомольца МЗ Украины.

Проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфизма генов фолатного обмена и гемостаза у 96 беременных (64 ПЭ и 32 с физиологическим течением беременности). Установлено, что наличие у женщин таких маркеров наследственной тромбофилии, как аллельный вариант С677Т гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), маркер G20210А гена протромбина (*F2*), полиморфизм G1691А гена пятого фактора свертывающей системы крови (*F5*) встречается чаще у женщин с ПЭ. Показатели молекулярно–генетического исследования полиморфизма фолатного обмена и гемостаза могут быть генетическими маркерами для выделения женщин групп риска по развитию ПЭ [49].

## 2 Материалы и методы

Исследование включает два этапа:

1. Проведение клинико–биохимических исследований
2. Проведение молекулярно–генетических исследований

На первом этапе исследования использовали плазму и сыворотку крови 80 беременных женщин в возрасте от 25 до 40 лет (Приложение1). Срок беременности женщин, на момент исследования составляет 37–40 недель. Работа проведена на базе клинико–диагностической лаборатории КГБУЗ КМРД №5. Диагноз ПЭ определяли по результатам клинико–лабораторного обследования в соответствии с протоколами МЗ Российской Федерации относительно гипертензивных состояний во время беременности.

Для исследования использовали цельную кровь, сыворотку крови и плазму крови. Взятие проб проводилось по правилам забора крови в вакуумные системы «вакутейнер» из периферической вены. Вакутейнеры использовали со стандартными антикоагулянтами (ЭДТА,цитрат), соответствующие необходимому исследованию. Для биохимических исследований использовали вакутейнеры с активатором свертывания (кремнезем).

1. Сыворотку получали путем центрифугирования при 1500 оборотах 5 минут.

2. Плазму получали путем центрифугирования при 3000 оборотах 10 минут.

Из исследуемых пациентов: 40 беременных женщин – исследуемая группа с диагнозом ПЭ и 40 беременных женщин – контрольная группа без патологий и осложнений.

Среди пациенток с ПЭ легкая степень тяжести была установлена у 13 женщин (32,5 %), средняя – у 25 (62,5 %) и тяжелая – у 2 (5 %). ПЭ в прошлых беременностях отмечена у 14 пациенток, среди которых с легкой степенью тяжести – 4 женщины (28,6 %), со средней – 10 (71,4 %).



Всем женщинам при поступлении в стационар был произведен забор крови и проведены следующие исследования:

1. Определение РСТ в сыворотке крови
2. Определение билирубина в сыворотке крови
3. Измерение уровня лактата в сыворотке крови
4. Определение уровня ферментов АлТ и АсТ в сыворотке крови
5. Определение уровня фермента ЛДГ в сыворотке крови
6. Определение количества фибриногена в плазме крови
7. Подсчет количества тромбоцитов в цельной крови
8. Подсчет количества лейкоцитов в цельной крови
9. Определение количества белка в моче

Также были учтены данные из анамнеза пациентов: АД, возраст, количество беременностей и родов, выявление ПЭ (впервые или повторно) (Приложение 1).

Второй этап исследования был выполнен на базе Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ г. Красноярск. В анализ было включено 80 беременных женщин, которым были проведены клиничко-биохимические исследования.

Для анализа полиморфизмов в генах *F2*, *F5* и *MTHFR* в качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с использованием комплекта реагентов «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена ПЦР с использованием комплектов реагентов для амплификации «SNP-экспресс-РВ» (НПФ Литех) с детекцией результатов в режиме реального времени.

## 2.1 Определение количества РСТ в сыворотке крови

Тестирование проводилось набором для иммунохроматографического определения РСТ в сыворотке (плазме) крови «ИХА-прокальцитонин-тест» (ООО«ИнВитроТест», Россия).

Сыворотка исследуемой пробы 120мкл. вносится в лунку для внесения образца. РСТ исследуемой пробы взаимодействует с антителами, связанными с коллоидными частицами золота, с образованием устойчивого комплекса. Этот комплекс под воздействием капиллярной сил движется к иммобилизованным на мембране вторым антителам, где и происходит визуализация результата РСТ в тестируемых пробах с высокой специфичностью и чувствительностью. Интенсивность окрашивания полоски прямо пропорциональна концентрации РСТ в образце. Несвязывающий конъюгат, движется по мембране и тем самым связывается с антителами на контрольной полосе, образуя вторую окрашенную полосу внутренний контроль теста. При концентрации РСТ  $\geq 0,5$  нг/мл комплекс принимает вид полосы красного цвета с разной степенью интенсивности. Сравнение окраски полосы исследуемого образца с референсным рядом окрашенных полос указывает на уровень концентрации РСТ:  $\geq 0,5$  нг/мл;  $\geq 0,5$  нг/мл;  $\geq 2$  нг/мл;  $\geq 10$  нг/мл [0].

## 2.2 Определение белка в моче

Исследование проводилось с использованием набора для колориметрического определения белка в моче с пирогаллоловым красным «Белок-ПГК-Ново» (АО «Вектор Бест», Россия) на фотометре «Photometer 5010 V5+» (Германия).

Принцип метода: При взаимодействии белка с пирогаллоловым красным и молибдатом натрия образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски

которого пропорциональна концентрации белка в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 598нм.

1. Мочу центрифугировать в течении 10 минут при 1500 оборотах.
2. Отобрать автоматическим дозатором 20 мкл.мочи и поместить в пробирку.
3. Добавить автоматическим дозатором 1000мкл. раствора 0,06% пирогаллолового красного, перемешать(готовый реактив).
4. Инкубировать при комнатной температуре 10 минут.
5. Измерить на фотометре«Photometer 5010 V5+» (Германия) длина волны 598нм.

### **2.3 Определение общего билирубина**

Исследование проводилось на «Photometer5010», набором «BioSistems».

Принцип метода: прямой билирубин пробы реагирует с диазо–сульфаниловой кислотой с образованием цветного комплекса, который может быть измерен спектрофотометрически. Прямой и непрямой билирубин соединяются с диазо в присутствии цетримида.

### **2.4 Определение уровня АлТ в сыворотке крови**

Исследование проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе «Mindray□BS380», набором «Mindray».

Принцип метода: унифицированный метод согласно рекомендациям IFCC (Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины) без активации пиридоксальфосфатом.

Аланинаминотрансфераза катализирует обратимое трансаминирование L-аланина и α-оксоглутарата до пирувата и L-глутамата. Пируват затем восстанавливается до лактата в присутствии лактатдегидрогеназы с одновременным окислением восстановленного β-никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) до НАД<sup>+</sup>. Это вызывает изменение поглощения, прямо пропорциональное активности АлТ в пробе.

## 2.5 Определение количества фибриногена в плазме крови

Определение проводилось на «Trombotimer1,2» с использованием набора «Технология стандарт».

Принцип метода: при добавлении к цитратной плазме избытка тканевого тромбопластина и ионов кальция время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов внешнего и общего пути коагуляции: 1, 2, 5, 7, 10. Определяется время от момента добавления к исследуемой плазме смеси тромбопластина и ионов кальция до момента образования сгустка фибрина.

1. Центрифугировать пробирку с венозной кровью, для получения плазмы при 3000 оборотах 10 минут.
2. Отобрать плазму от эритроцитов в отдельный эппендорф.
3. Приготовить тромбопластин–кальциевую смесь (во флакон с тромбопластином внести 2,5мл. дистиллированной воды и растворить, далее добавить 2,5 мл 0,025М раствор кальция хлористого).
4. В пробирку вносится автоматическим дозатором 500мкл плазмы и добавляем 50 мкл. тромбопластин–кальциевую смесь.
5. После того как сформируется сгусток фибрина выкладываем его на фильтровальную бумагу.

6. Сгусток высыхает при комнатной температуре. Далее взвешивается на электронных весах.

## **2.6 Измерение лактата в сыворотке крови**

Измерения уровня лактата проводилось на анализаторе газов и метаболитов «GEMPremier 3500».

Принцип метода: измеряется с помощью потенциометрических датчиков. При измерении уровня лактата используются амперометрические электроды.

## **2.7 Определение уровня АсТ в сыворотке крови**

Исследование проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе «Mindray BS380», набором «Mindray».

Принцип метода: при анализе АсТ катализирует обратимое трансаминирование L-аспартата и α-оксоглутарата в оксалоацетат и L-глутат. Затем оксалоацетат восстанавливается до малата в присутствии малатдегидрогеназы, а НАДН окисляется до НАД<sup>+</sup>. Уровень НАДН, определяемый фотометрически, снижается пропорционально уровню образования оксалоацетата и соответственно, активности АсТ.

## **2.8 Подсчет количества лейкоцитов и тромбоцитов**

Проводилось на автоматическом гематологическом анализаторе 5diffMindray BC5800.

1. Пробирка с венозной цельной кровью перемешать, проверить на наличие сгустков.

2. Пробирка загружается в автоматический гематологический анализатор для проведения анализа.

3. По завершению проведения анализа, происходит считывание результата.

## **2.9 Определение уровня ЛДГ в сыворотке крови**

Исследование проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе «Mindray BS380», набором «Mindray».

Принцип метода: лактатдегидрогеназа катализирует превращение L-лактата в пируват. Это вызывает изменение поглощения, прямо пропорциональное активности ЛДГ в пробе.

## **2.10 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех)**

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» НПФ Литех проводилось по следующей методике:

1. В пробирку типа «эппендорф» с замком внести 1000 мкл цельной крови. Если кровь расслоилась в процессе хранения, то перед внесением ее необходимо перемешать переворачиванием пробирки до однородности.

2. Центрифугировать пробирку с кровью со скоростью 3000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы.

3. Отобрать плазму с помощью пипетки, не затронув лейкоциты.

4. Закрытую пробирку поместить в холодильник на  $-20^{\circ}\text{C}$  до полного замораживания клеток (в течение 1 ч).

5. Разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.

6. Добавить в пробирку реактив «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в примере объем остатка равен 550 мкл, суммарный объем остатка и реактива составил, таким образом, 1100 мкл). Перемешать на вортексе.

7. Прогреть содержимое пробирки в течение 15 минут при 98°C в термостате.

8. Центрифугировать пробирку при 8000-14000 об/мин в течение 15 сек. Полученная надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (НПФ Литех).

### **2.11 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКПРЕСС-РВ» (НПФ Литех) с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad)**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод молекулярной биологии, позволяющий синтезировать специфические фрагменты ДНК с использованием фермента ДНК-полимеразы. Детекция продуктов ПЦР в реальном времени обеспечивается включением в реакцию флуоресцентной метки, которая дает повышенную флуоресценцию пропорционально увеличению количества ДНК-продукта.

ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени проводилось по следующей методике:

1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается! Для каждой пробы готовятся 2 пробирки N (норма) и M (мутация).

2. Предварительно разморозить комплект реагентов для ПЦР. Пробирки с реагентами тщательно вортексировать, затем центрифугировать, чтобы сбросить капли с крышки.

3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя,

2,5 мкл реакционной смеси,

0,2 мкл красителя SYBR Green.

0,2 мкл Таq-полимеразы (вносится в последнюю очередь и перед ее внесением смесь рекомендуется немного перемешать)

4. Готовятся 2 рабочие смеси: НОРМА – с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 1 и МУТАЦИЯ – с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 2.

5. Содержимое пробирок тщательно перемешать с помощью вортекса или пипетирования.

6. Внести в приготовленные пробирки по 20 мкл полученной рабочей смеси.

7. Добавить по 5 мкл ДНК в пробирки со смесями НОРМА и МУТАЦИЯ. В качестве ОКО вносится разбавитель, в качестве ПКО – положительный контрольный образец ДНК в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

8. Процентрифугировать пробирки при 1500-3000 об/мин в течение 3-5 сек на микроцентрифуге–вортексе.

9. Заранее включить и подготовить систему для проведения ПЦР–РВ для прогрева.

10. Перенести пробирки в амплификатор в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов.

11. Задать программу амплификации со следующими параметрами:

**Таблица 2 – Программа амплификации для прибора CFX-96**

Т,С	Время	Циклы
93°	1мин	1
93°	10сек	35



64°	10сек	
72°	20сек(считывание)	

Детекция продуктов амплификации осуществлялась прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Статистическую обработку результатов: клиничко–биохимических анализов и нуклеотидных полиморфизмов в изучаемых генах производили с помощью пакета прикладных программ Statistica (Версия 13.0) и программы MS Excel for Windows (2016). Статистические расчеты количественных показателей включали в себя описательные статистики: среднее значение (M) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Для анализа количественных показателей проводилась проверка нормальности распределения значений с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для сравнения средних значений двух независимых выборок применялся критерий Манна-Уитни при несоответствии выборки нормальному закону распределения. Для вычисления силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Для качественных показателей вычислялись следующие показатели: число наблюдений и доля (в %) от общего количества пациентов или от количества пациентов в соответствующей подгруппе. Для категориальных переменных применяли  $\chi^2$ -тест. За статистически значимый уровень достоверности принимали  $p < 0,05$ .

### **3 Результаты и обсуждение**

[изъято 7 страницы]

## 4 Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что изучение уровней РСТ в совокупности с основными клинико–биохимическими показателями имеет клиническое и прогностическое значение в ранней диагностике ПЭ, а также в оценке степени тяжести заболевания.

1. У беременных женщин с ПЭ наблюдались повышенные уровни РСТ лактата и белка в моче, по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать об активном воспалительном процессе, в ходе которого отмечается синтез провоспалительных цитокинов, стимулирующий выработку РСТ. Увеличение уровня лактата в сыворотке крови может свидетельствовать о клеточной гипоксии, развивающейся на фоне микроциркуляторной дисфункции.

2. Уровень РСТ в сыворотке крови женщин с ПЭ достоверно увеличивался по мере увеличения степени тяжести заболевания, что делает возможным использовать РСТ в качестве диагностического маркера.

3. У женщин с ПЭ уровень РСТ положительно коррелирует с уровнем фибриногена, лактата, а также с содержанием белка в моче, что объясняется развитием эндотелиальной дисфункции, активацией гемостаза, активным образованием тромбов, который закупоривают печеночные сосуды с последующей дегенерацией гепатоцитов и высвобождением в кровоток лактата, а также поражением почечных клубочков и увеличением их проницаемости. А развивающееся на этом фоне воспаление стимулирует выработку РСТ.

4. По результатам генетического анализа статистически значимых отличий по распространенности полиморфизмов G20210A в гене *F2*, G1691A в гене *F5* и C677T в гене *MTHFR* среди группы беременных женщин с ПЭ и контрольной группы не было выявлено.

5. При сравнении уровня РСТ в сыворотке крови у больных женщин с разным вариантом генотипов было установлено, что уровень РСТ был выше у

женщин с ПЭ с генотипом СС по сравнению с женщинами с ПЭ с генотипами СТ+ТТ.

## Выводы

1. На фоне повышения содержания и активности стандартных маркеров у беременных женщин с ПЭ наблюдалось и повышенные уровни РСТ как по сравнению с контрольной группой, так и по мере увеличения степени тяжести заболевания.

2. Отличий по распространенности полиморфизмов G20210A в гене *F2*, G1691A в гене *F5* и C677T в гене *MTHFR* среди группы беременных женщин с ПЭ и контрольной группы не было выявлено.

3. Можно предположить, что РСТ возможно использовать как ранний прогностический маркер преэклампсии.

По результатам и выводам данной работы подготовлена статья для подачи в журнал «Акушерство и гинекология».

## Приложение 1

[изъято 3 страницы]

## Список литературы

1. Walker J J., Preclampsia. *Lancet*. 2000;356:1260–1265.
2. Bolte A C., van Geijn H P, Dekker G A., Management and monitoring of severe preeclampsia. *Eur J ObstetGynecolReprod Biol*. 2001;96:8–20.
3. Sibai B., Dekker G., Kupferminc M: Preeclampsia. *Lancet*. 2005, 365: 785-799.
4. Saito S., Shiozaki A., Nakashima A., Sakai M., Sasaki Y: The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007, 28: 192-209.
5. Smith G C., Pell J P., Walsh D., Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*. 2001;357:2002–2006.
6. Garovic V D., Hayman S R., Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3:613–622.
7. Bohuon, C., Blood Procalcitonin is a new biological marker of the human septic response. New data on the specificity / C. Bohuon, S. Petitjean, M. Assicot // *Clin. int. care*. 1994. - № 5. - P. 88-88.
8. Brunkhorst R., Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock / R. Brunkhorst, K. Weg-scheider, ZE. *Forycky II Intensive Care Med*. 2000. - № 26. -P. 148-152.B
9. Hund M., Multicenter prospective clinical study to evaluate the prediction of short-term outcome in pregnant women with suspected preeclampsia (PROGNOSIS): study protocol / M. Hund, D. Allegranza, M. Schoedl // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2014. – Vol. 14. – P. 324.
10. Kiondo P., Tumwesigye NM., Wandabwa J. Wamuyu-Maina G. Bimenya G. Okong P. Adverse neonatal outcomes in women with preeclampsia in Mulago Hospital, Kampala, Uganda: A cross-sectional study. *PanAfr Med J*. 2014;17(Suppl 1):7.

11. Coppage KH, Polzin WJ. Severe preeclampsia and delivery outcomes: is immediate cesarean delivery beneficial? *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:921–923. doi: 10.1067/mob.2002.124041.

12. Dekker G, Sibai B. Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet.* 2001;357:209–215. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03599-6.

13. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1359–1375. doi: 10.1016/S0002-9378(98)70160-7.

14. Сидоренко В.Н., Преэклампсия и эклампсия: современная классификация, этиопатогенез, диагностика, лечение / В. Н. Сидоренко, Р.Л. Коршиков, В. М. Савицкая, Е. Н. Кириллова. – Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2017. – 5-7 с.

15. Сухих Г. Т., Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия / Г. Т. Сухих, З. С. Ходжаева, О. С. Филиппов, Л. В. Адамян. - Москва: Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 2013. – 23-24 с.

16. Абдуллаходжаева М.С., Гестозы и их осложнения в структуре материнской смертности / М.С. Абдуллаходжаева, Н.Е. Елецкая и др. // *Мед. журнал Узбекистана.* 2002. - № 3. - С. 27-29.

17. Steinwald P.M., Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis // K.T. Whang, K.L. Becker, R.H. Snider, E.S. Nylen, J.C. White *И Crit. Care.* 1999. - № 3.-P. 11-16.

18. Reith H.B., Procalcitonin (PCT) in patients with abdominal sepsis / H.B. Reith, U. Mittelkötter, R. Wagner A., Thiede *И Intensive Care Med.* -2000. № 26. - P. 165-169.

19. Muller B., Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis / B. Muller L., Kenneth K.L., Becker // *SWISS MED WKLY.* -2001.-P. 595-602.



20. Al-Nawas B., Procalcitonin in diagnosis of severe infections / B. Al-Nawas, I. Krammer P.M., Shah II Clin. int. care. 1996. - № 1. - P. 331-333.
21. Walker J J., Preclampsia.Lancet.2000;356:1260–1265.
22. Schutte J M, Schuitemaker N W, van R J, Steegers EA: Substandard care in maternal mortality due to hypertensive disease in pregnancy in the Netherlands. BJOG. 2008, 115: 732-736.
23. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM: Subclassification of preeclampsia. HypertensPregnancy. 2003, 22: 143-148.
24. Мороз В.В., Сепсис. Клинико-патофизиологические аспекты интенсив- ной терапии/ В.В. Мороз, «ИнтелТек». – Петрозаводск, 2004.-291с.
25. Полякова А.С., Диагностическая ценность определения уровня про- кальцитонина в практике инфекциониста/ А.С. Полякова, Д.М. Бакрадзе и др.// Вопросы современной педиатрии. – 2017. - №16. –С.334-341.
26. Вельков В.В., Комплексная лабораторная диагностика системных ин- фекций и сепсиса: С-реактивный белок, прокальцитонин, пресепсин/ В.В. Вельков, Москва, 2015. –117с.
27. Моррисон В.В., Значение определения концентрации прокальцитонина плазмы крови в диагностике септических состояний/В.В. Моррисон, А.Ю. Божедомов// Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. - № 2, Том6. -с. 261-267.
28. Вельков В.В., Прокальцитонин в диагностике критических состояний/ В.В.Вельков // Лабораторная медицина. – 2010. - №10. – С.49-54.
29. Белобородова Н.В. Тест на прокальцитонин: алгоритмы применения новые возможности./Н.В.Белобородова,Д.А.Попов//Пособиедляврачей. - Москва, 2008.
30. De Jong A. ,van Oers J.A., et al. Efficacy and safety of procalcitonin guid- ance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a ran- domised, controlled, open-label trial/ J.A. De Jong A. van Oers [et al.] // The Lan- cet Infectious Diseases. - 2016. - №7. – P.1-9
31. Белобородова Н.В., Попов Д.А. Поиск «идеального» биомаркера

бактериальных инфекций/ Н.В. Белобородова, Д.А. Попов // Клиническая анестезиология и реаниматология. – 2006 .- №3. -С.30-39.

32. Smith G C, Pell J P, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births.Lancet.2001;357:2002–2006.

33. Garovic V D, Hayman S R. Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease.Nat Clin Pract Nephrol.2007;3:613–622.

34. Aggarwal S, Dimri N, Tandon I, Agarwal S. Preeclampsia in north Indian women: the contribution of genetic polymorphisms. JObstetGynaecolRes.2011;37(10):1335–41.

35. Белобородова Н.В., Этиология послеоперационных бактериемий в ОРИТ: связь с уровнем прокальцитонина/ Н.В.Белобородова, Т.Ю. Вострикова, Е.А. Черневская // Клиническая анестезиология и реаниматология. - 2008. - №4. -С.22-27.

36. Assicot M., High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection/ M. Assicot, D.Gendrel, H. Carsin. [et al.] // Lancet. - 1993. - Vol.34.

- №8844. - P.515-518.

37. Milcent K., Use of Procalcitonin Assays to Predict Serious Bacterial Infection in Young Febrile Infants / K. Milcent [et al.] // JAMA Pediatr. – 2016. - № 170(1). - P.62–69.

38. Макацария А. Д., Бицадзе В. О., Хизроева Д. Х. HELLP-синдром // Акушерство, гинекология и репродукция. 2014; 8 (2): 61-68.

39. Guida J. P., Parpinelli M. A., Surita F. G. Costa, M. L. The impact of proteinuria on maternal and perinatal outcomes among women with pre-eclampsia. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2018; 143 (1): 101-107. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12487>

40. Tanacan A., Fadiloglu E., Beksac M. S. The importance of proteinuria in preeclampsia and its predictive role in maternal and neonatal outcomes. Hypertension in Pregnancy. 2019;38 (2): 111-118.

41. Башмакова Н. В., Цывьян П. Б., Чистякова Г. Н., Пестряева Л. А., Гагарина, Е. М. Ангиогенные ростовые факторы и патогенез преэклампсии. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2017;17 (5): 7-12.

42. Davalos I. P., Moran M. C., Martinez-Abundis E., González-Ortiz M., Flores-Martínez S. E., Machorro V. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2005;35 (1): 66-69. doi:10.1016/j.bcmd.2005.03.008.

43. Agostinis C, Rami D, Zacchi P et al Pre- eclampsia affects procalcitonin production in placental tissue. *Am J Reprod Immunol* 2018;**79**:e12823.

44. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;**170**:1752-7; discussion 7-9.

45. Elzein H. O., Saad A. A., Yousif A. A. Elamin E., Abdalhabib E. K., Elzaki S. E. G. Evaluation of Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Sudanese women with severe preeclampsia. *Current research in translational medicine*. 2020;68 (2): 77-80. doi:10.1016/j.retram.2019.08.002

46. Николаева М.Г., Ясафова Н.Н., Момот А.П., Зайнулина М.С., Момот К.А. Тараненко И.А. Фенотипические проявления мутации протромбина, генотип F2(20210)GA, у женщин репродуктивного возраста. *Флебология*. 2019;13(4):285-292. <https://doi.org/10.17116/flebo201913041285>

47. Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H. Bertina R.M. A common genetic variant in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increased in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-370.

48. Lin J., August P. Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 2005; 105 (1): 182-192. doi: 10.1097/01.AOG.0000146250.85561.e9

49. Dziadosz M, Baxi L.V. Global prevalence of prothrombin gene mutation G20210A and implications in women's health: a systematic review. *BloodCoagulation&Fibrinolysis*. 2016;27(5):481-489. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000562>

50. Чайка В. К., Носенко Е. Н., Мертил Б., Лившиц Л. А., Татарский П. Ф., Баранов В. С. и др. Генетические дефекты гемостаза, предрасполагающие к развитию преэклампсии у женщин восточного региона Украины. 2010; 19 (1): 73-76.

51. Kjellberg U., van Rooijen M., Bremme K., Hellgren M., Factor V Leiden mutation and pregnancy-related complications. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;203 (5): 469.e1-469.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.011>.

52. Фетисова И. Н., Панова И. А., Малышкина А. И., Рокотьянская Е. А., Ратникова С. Ю., Смирнова Е. В. и др. Генетические аспекты преэклампсии. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (6): 1040.

53. Ghobrial A. G., Higazi A. M. A. Association of Factor V Leiden G1691a in Women Suffering Repeated Abortions. *Malaysian Journal of Medical Research*. 2020; 31 (1): 36-42.

54. Hou J., Lin L., Guo W., Luo D., Lan L. Association of methylenetetrahydrofolatereductase C677T polymorphism with the pre-eclampsia risk in Hakka pregnant women in Southern China. *Gynecological Endocrinology*. 2020;36 (4): 322-326. DOI: [10.1080/09513590.2019.1658188](https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1658188)

55. Ahmed S. F., Ali M. M., Kheiri S., Elzaki S. E. G., Adam I. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and reduced-f carrier-1 G80A gene polymorphism with preeclampsia in Sudanese women. *Hypertension in pregnancy*. 2020;39 (2): 77-81. DOI: [10.1080/10641955.2020.1725037](https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1725037)

56. Jääskeläinen E., Keski-Nisula L., Toivonen S., Romppanen E. Helisalmi S. Punnonen K. et al. MTHFR C677T Polymorphism is Not Associated with Placental Abruption or Preeclampsia in Finnish Women. *Hypertension in Pregnancy*. 2006; 25 (2): 73–80. doi:10.1080/10641950600745137 .

57. Grandone E, et al. Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *ThrombHaemost.* 1997;77(6):1052–4.
58. Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1997;90(2):168–71.
59. Powers RW, et al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(6 Pt 1):1605–11.
60. Moya F, Nieto A, R- candela JL. Calcitonin biosynthesis: evidence for a precursor. *Eur J Biochem* 1975; **55**:407–13.
61. Allison J, Hall L, MacIntyre I, Craig RK. The construction and partial characterization of plasmids containing complementary DNA sequences to human calcitonin precursor polypeptide. *Biochem J* 1981; **199**:725–31.

Федеральное государственное автономное  
Образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

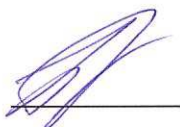
« 24 » июня 2021 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Прокальцитонин как маркер в оценке степени тяжести преэклампсии.  
Взаимосвязь между генами тромбофилии *F2, F5, MTHFR*  
и развитием преэклампсии.

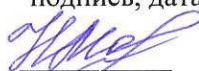
Научные руководители



подпись, дата

к.б.н., доцент Т.Н.Субботина

инициалы, фамилия



подпись, дата

к .б. н., биолог КДЛ Н.Н.Молокова

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

Е.В.Васильева

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

д.м.н., профессор Ю.И. Гринштейн

инициалы, фамилия

Красноярск 2021