УДК 618.3-008.6:616.379-008.64-07
DOI: 10.17816/JOWD663110-115

ОЦЕНКА УРОВНЯ микроРНК В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ТЯЖЕЛОМ ГЕСТОЗЕ НА ФОНЕ ГЕСТАЦИОННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

© В.С. Пакин, Е.С. Вашукова, Р.В. Капустин, О.Н. Аржанова, А.С. Глотов, В.С. Баранов

ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург

Для цитирования: Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – № 3. – С. 110–115. doi: 10.17816/JOWD663110-115

Поступила в редакцию: 17.04.2017 Принята к печати: 19.05.2017

■ Методом полногеномного секвенирования нового поколения (NGS) проведен сравнительный анализ изменения уровня микроРНК в плаценте при преэклампсии (ПЭ) в зависимости от наличия гестационного сахарного диабета (ГСД). Выявлены статистически значимые различия в экспрессии his-miR-45a ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0050) при ПЭ, развившейся на фоне ГСД, в сравнении с таковой без ГСД. Показано изменение уровня трех микроРНК в плаценте: hsa-miR-4532 ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0008), hsa-miR-34c-5p ($p < 0{,}000$, FDR = 0,0083) и hsa-miR-193b-5p ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0139) при беременности, осложненной ПЭ, в сравнении с беременностью, осложненной ГСД. Исследования указывают на наличие изменений содержания микроРНК в плацентарной ткани при ГСД и ПЭ и позволяют рассматривать их в качестве потенциальных биомаркеров сочетанного развития ПЭ и ГСД. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения роли этих биомаркеров в молекулярно-генетических и эпигенетических механизмах развития ГСД и ПЭ.

■ **Ключевые слова:** гестационный сахарный диабет (ГСД); преэклампсия (ПЭ); гестоз; микроРНК; секвенирование нового поколения (NGS).

PECULIARITIES OF PLACENTAL MICRORNA EXPRESSION IN PREGNANCIES COMPLICATED BY GESTATIONAL DIABETES MELLITUS AND PREECLAMPSIA

© V.S. Pakin, E.S. Vashukova, R.V. Kapustin, O.N. Arzhanova, A.S. Glotov, V.S. Baranov

FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia

For citation: Journal of Obstetrics and Women’s Diseases. 2017;66(3):110-115. doi: 10.17816/JOWD663110-115

Received: 17.04.2017 Accepted: 19.05.2017

■ The aim of study was to determine feasible changes of placental miRNAs expression profiles revealed by next generation sequencing (NGS) in pregnancies with GDM complicated or not with PE. Out of 27 miRNAs, studied expression was significantly different (FDR < 0.05) only for his-miR-45a. Comparative analysis of revealed reliable differences in expression of hsa-miR-4532 ($p < 0.0001$, FDR = 0.0008), hsa-miR-34c-5p ($p < 0.0001$, FDR = 0.0083), and hsa-miR-193b-5p ($p < 0.0001$, FDR = 0.0139) in pregnancy complicated by PE, without of GDM. The present results suggest that GDM and PE are associated with specific alterations in the placental miRNA expression profiles. Further studies are needed to verify the role of these microRNA in molecular mechanisms underlying GDM and PE pathogenesis.

■ **Keywords:** Gestational diabetes mellitus; preeclampsia; gestosis; miRNA; next-generation sequencing (NGS).

Актуальность

Гестационный сахарный диабет (ГСД) представляет собой серьезную медицинскую и социальную проблему во всем мире [1, 2]. Одним из частых осложнений беременности на фоне ГСД является преэклампсия (ПЭ), играющая важную роль в перинатальной заболеваемости и смертности [3]. Метаболические изменения у беременных женщин при ГСД в определенной мере могут быть связаны с нарушением транспортных и регуляторных функций плаценты. Молекулярно-генетические механизмы этих нарушений изучены недостаточно. В ряде исследований была отмечена роль микроРНК в патогенезе ГСД [4] и ПЭ [5].

МикроРНК — это класс малых некодирующих одноцепочечных РНК длиной 21–27 нуклеотидов, которые функционируют как трансляционные репрессоры. Они участвуют в регуляции экспрессии генов с помощью механизма РНК-интерференции, играющего важную роль в процессах нормального и патологического эмбриогенеза.

Впервые специфичные для плаценты человека микроРНК были выявлены в 2007 г. с помощью методов микрочипов и ПЦР в реальном

времени. По данным различных авторов, число специфичных микроРНК в зрелой плаценте человека колеблется от 300 до 600 [5]. В 2008 г. Chim et al. сравнили уровень экспрессии 157 микроРНК в плацентарной ткани и в образцах венозной крови беременных [6]. Были идентифицированы 34 микроРНК, уровень которых в плацентарной ткани оказался более чем в 10 раз выше, чем в материнской венозной крови. В дальнейших исследованиях 4 из этих микроРНК (miR-141, miR-149, miR-299-5p и miR-135b) не были обнаружены в материнской крови после родоразрешения. Отмечено также, что уровень ряда микроРНК зависит от срока гестации [7]. Изменения содержания различных паттернов микроРНК в плацентарной ткани на разных сроках беременности рассматриваются как один из важных регуляторных молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих нормальное развитие плаценты. Предполагается, что количественные изменения экспрессии некоторых микроРНК могут быть биомаркерами таких грозных осложнений беременности, как гестоз, гестационный сахарный диабет, хроническая плацентарная недостаточность и другие [5]. Так, значительное снижение концентрации трех микроРНК (mir-29a, mir-222 и miR-132) были выявлены при сроке гестации 16–19 недель в крови беременных, у которых в дальнейшим развился ГСД [4].

В данном исследовании методом секвенирования нового поколения (NGS) проведен сравнительный анализ содержания микроРНК в плаценте у беременных с ПЭ при наличии или отсутствии ГСД.

Материалы и методы

Формирование групп. Исследование включало группы пациентов: I группа — беременные с ПЭ без нарушений углеводного обмена (n = 5); II группа — беременные с ПЭ на фоне ГСД (n = 4), а также беременные с ГСД без ПЭ (n = 2), составившие III группу. У всех пациенток был собран подробный анамнез, выполнены клинико-лабораторные и молекулярно-генетические методы исследования. Всем женщинам проводился акушерско-гинекологический осмотр. Беременные были консультированы эндокринологом, терапевтом. Биоптаты плацентарной ткани получали в ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (Санкт-Петербург). Каждая женщина дала информированное согласие на проведение исследования.

В группу I были включены беременные с установленным диагнозом преэклампсии согласно критериям, приведенным в классификации гестоза, утвержденной на Всероссийском форуме акушеров-гинекологов «Мать и дитя» (Савельева Г.М., 2005). Для определения степени тяжести гестоза использовалась шкала Goek, модифицированная Г.М. Савельевой и др. (2001). Срок беременности на момент постановки диагноза был более 20 недель.

Гестационный сахарный диабет диагностирован на основании определения уровня глюкозы венозной плазмы натощак или проведения перорального глюкозотолерантного теста. Диагноз устанавливался согласно критериям, приведенным в Российском национальном консенсусе «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение» [8]. В группу ПЭ на фоне ГСД отобраны беременные, у которых имелось сочетание критериев включения в группы ПЭ и ГСД. Все женщины имели одноплодную беременность. Критерии исключения из исследования: сахарный диабет 1-го и 2-го типов; заболевания, определяющие симптоматический диабет, — тиреотоксикоз, гиперадренокортицизм, соматотропинома, феохромоцитома; тяжелая соматическая патология; онкологические заболевания; многоплодная беременность; гипертоническая болезнь или артериальная гипертензия, диагностированная до 20-й недели беременности; отказ пациента от участия в программе исследования. Беременные, включенные в исследование, были родоразрешены путем операции кесарева сечения в плановом порядке без родовой деятельности.

Полученные во время операции кесарева сечения образцы плацентарной ткани промывали предварительно охлажденным физиологическим раствором (0,9 % NaCl, 4 °C). Затем под контролем зрения с использованием микроскопа Leica M125 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) были отобраны и «отмыты» от сгустков крови ворсинки плаценты (~ 30 мг). В дальнейшем образцы с целью стабилизации РНК помещали в RNAlater (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) и хранили при –70 °C до момента выделения РНК.

Выделение малых РНК и подготовка библиотек РНК к секвенированию

Экстракция микроРНК из плацентарной ткани проводилась с использованием набора реагентов PureLink miRNA Isolation Kit

(Life Technologies, USA) в соответствии со стандартным протоколом фирмы-производителя. Концентрацию РНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, USA) с набором RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Качество РНК оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза 2200 Tape Station Instrument (Agilent Technologies, USA), используя чипы RNA ScreenTape и реактивы RNA ScreenTape Sample Buffer, RNA ScreenTape Ladder (Agilent Technologies, USA).

Для подготовки библиотек микроРНК использовался набор реагентов Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies, USA) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Молярную концентрацию баркодированных библиотек определяли с помощью прибора 2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies, USA), используя чипы High Sensitivity D1K ScreenTape и реактивы фирмы High Sensitivity D1K Reagents.

Анализ образцов на геномном секвенаторе Ion Torrent

Проведение эмульсионной ПЦР и «обогащение» микросфер проводили согласно инструкции к набору реагентов Ion One touch 200-template kit (Life Technologies, USA).

Секвенирование проводили, используя набор реагентов и микрочип Ion 318™ Chip. Запуск прибора осуществляли согласно руководству к эксплуатации Ion Personal Genome Machine® System.

Анализ полученных данных

Анализ данных был проведен путем выравнивания нуклеотидных последовательностей против референсного генома hg19 (Genome Reference Consortium GRCh37) [9]. Затем оценивался уровень экспрессии микроРНК с помощью miRDeep2. Полученные данные были статистически обработаны с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA). Частота ложных открытий (FDR) рассчитывалась по методу Benjamini [10]. Достоверные различия в уровне экспрессии микроРНК считались при $p < 0{,}01$ и FDR < 0,05.

Результаты

Средний возраст беременных в группе ПЭ — 35,0 ± 4,7 года, в группе ПЭ на фоне ГСД — 31,0 ± 4,24 года и в группе ГСД — 33,5 ± 3,5 года. Количество родов у женщин исследуемых групп достоверно не отличалось. Группы были сопоставимы по возрасту, этнической принадлежности, способу и сроку родоразрешения, весу и росту новорожденных ($p > 0{,}05$). В то же время выявлены статистически значимые отличия по показателям артериального давления у беременных I и II групп по сравнению с III группой ($p < 0{,}05$). Наибольший показатель систолического артериального давления (САД) был в группе ПЭ (160,0 ± 8,9 мм рт. ст.). В группе ПЭ на фоне ГСД он составил 150,0 ± 21,6 мм рт. ст. Наименьший показатель САД был в группе ГСД без ПЭ (117,5 ± 10,6 мм рт. ст.). Показатель диастолического артериального давления (ДАД) в I группе составил 100,0 ± 5,5 мм рт. ст., во II группе — 93,33 ± 5,77 мм рт. ст. и в III группе — 77,50 ± 10,6 мм рт. ст. В I и II группах достоверно чаще по сравнению с III группой ($p < 0{,}05$) встречались протеинурия (0,6 ± 0,4; 1,2 ± 0,5 и 0 г/л соответственно) и наличие отеков (в I и II группах у всех беременных, в III группе у 1 беременной).

Для образцов всех групп наибольшее число чтений было картировано в областях генома, соответствующих генам микроРНК. Доля микроРНК среди всех секвенированных последовательностей для группы больных с ПЭ составила 73,9 %, для группы ПЭ на фоне ГСД — 72,4 %, для группы ГСД — 70,2 %. Подсчет чтений, картировавшихся на гены микроРНК, позволил сравнить образцы плацент при ПЭ, ГСД и ПЭ на фоне ГСД по экспрессии микроРНК.

Сравнительный анализ уровня микроРНК в плаценте при преэклампсии в зависимости от наличия ГСД показал различия в уровне 27 микроРНК, из которых статистически значимыми оказались различия в экспрессии hsa-miR-451a ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0050) (рис. 1). При сравнительном анализе уровня микроРНК в плаценте при беременности, осложненной ПЭ, и при беременности, осложненной ГСД, были выявлены различия в уровне 53 микроРНК, из которых статистически значимыми оказалось изменение уровня трех микроРНК: hsa-miR-4532 ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0008), hsa-miR-34c-5p ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0083) и hsa-miR-193b-5p ($p < 0{,}0001$, FDR = 0,0139) (рис. 2).

Обсуждение

Отмеченное в данном исследовании повышение уровня miR-451a в плаценте при наличии ПЭ у беременных с ГСД может приводить к подавлению активности PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути [11] и VEGF-опосредованного ангиогенеза в ответ на нарушение процессов

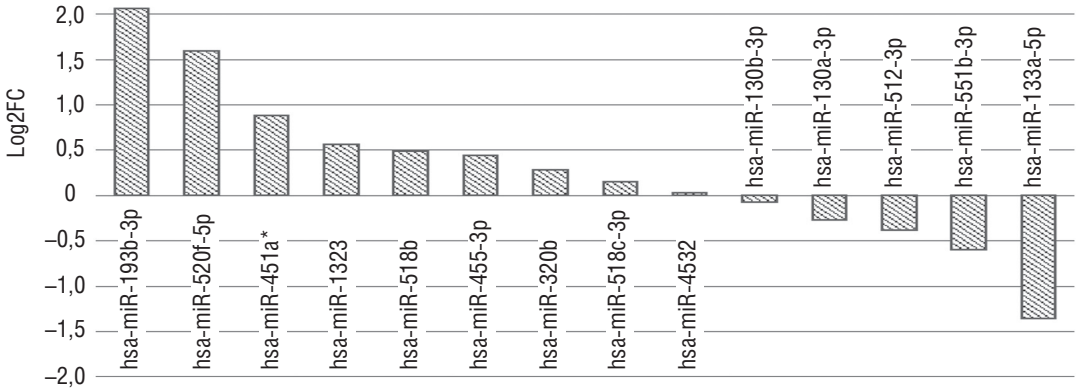

Рис. 1. Значения кратности изменения уровней 14 микроРНК в образцах плаценты при ПЭ в зависимости от наличия ГСД ($p < 0{,}01$). *Примечание:* Log2FC (FC — fold change) отражает кратность изменения содержания РНК в плацентах пациенток с ПЭ и ГСД по сравнению с ПЭ без ГСД

Fig. 1. Placental miRNAs detected as differentially expressed in pregnancies complicated by PE with GDM, when compared with those in the PE ($p < 0.01$). Log2FC (FC – fold change) reflects of changes in RNA content in the placenta of patients with PE and GDM compared to PE without GDM

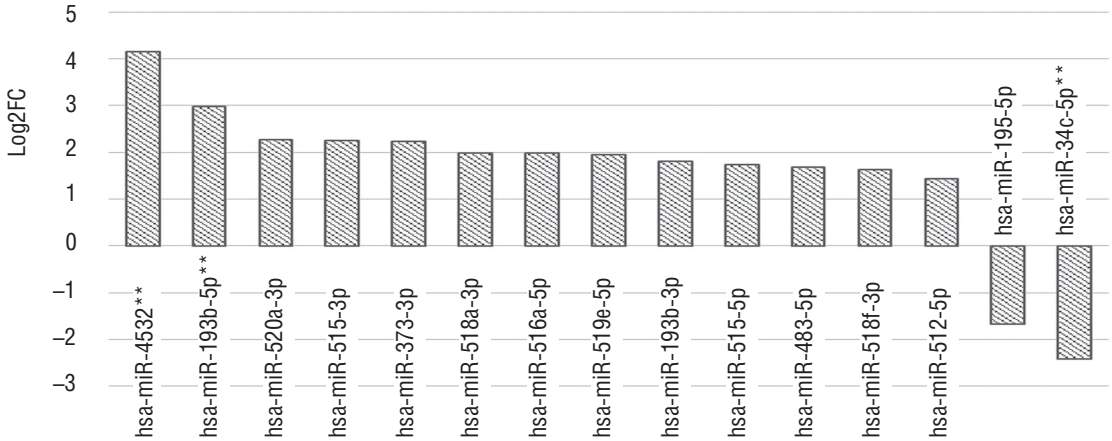

Рис. 2. Значения кратности изменения уровней 15 микроРНК в образцах плаценты при ПЭ и при ГСД ($p < 0{,}01$). *Примечание*: Log2FC (FC — fold change) отражает кратность изменения содержания РНК в плацентах пациенток с ПЭ по сравнению с ГСД

Fig. 2. Placental miRNAs detected as differentially expressed in pregnancies complicated by PE, when compared with those in the GDM ($p < 0{,}01$). Log2FC (FC – fold change) reflects of changes in RNA content in the placenta of patients with PE compared to GDM

оксигенации в условиях гипергликемии [12]. Снижение экспрессии VEGF приводит к нарушению трофической функции плаценты, недостаточности маточно-плацентарного кровотока и к развитию генерализованной эндотелиальной дисфункции.

Повышение содержания miR-4532 в плаценте подавляет экспрессию гена альфа-1 цепи коллагена I типа (*COL1A1*) [13]. Экспрессия данного гена в плаценте у беременных с ранней ПЭ снижена, что доказывает участие miR-4532 в патогенезе этого заболевания.

Повышение уровня содержания miR-193b в плацентарной ткани ведет к подавлению трансляции урокиназного активатора плазминогена PLAU [14]. В то же время снижение PLAU во время беременности может быть причиной ингибирования процессов фибринолиза и вызывать нарушения реологических свойств крови, что также способствует развитию ПЭ [15, 16].

Снижение уровня miR-34c в плацентарной ткани ведет к повышению экспрессии гена *PAI1* [17]. Это может вызывать снижение инвазии трофобласта на ранних сроках беременности и повышение свертываемости крови, обусловливая ухудшение маточно-плацентарного кровотока, отложения фибрина в маточных сосудах и микроциркуляторном русле плаценты, то есть способствовать развитию ПЭ.

Полученные данные относительно изменения содержания микроРНК в плаценте при таких осложнениях беременности, как ПЭ и ГСД, требуют дальнейшей верификации на большей выборке пациентов с применением альтернативных молекулярно-генетических методов.

Заключение

Проведенный анализ позволил выделить микроРНК (miR-451a), содержание которой отличается в образцах плаценты пациенток с ПЭ в зависимости от сопутствующего ГСД. Полученные данные подтверждают взаимосвязь гипергликемии, возникшей во время беременности, с изменением содержания микроРНК в плацентарной ткани. Изменения содержания в плаценте таких микроРНК, как hsa-miR-4532, hsa-miR-34c-5p и hsa-miR-193b-5p, могут приводить к нарушениям инвазии трофобласта, дисфункции эндотелия, гиперкоагуляции — процессам, составляющим основу патогенеза ПЭ. Однако в настоящее время для ряда из них пока неизвестны гены-мишени и их роль в патогенезе ПЭ и ГСД можно только предполагать.

Поиск новых биомаркеров на ранних сроках беременности представляется перспективным для своевременного выявления беременных групп высокого риска развития ГСД и ПЭ. Тестирование этих маркеров позволит осуществлять эффективные профилактические мероприятия, а в случае развития данных осложнений — оценку прогрессирования заболевания с целью коррекции нарушений и улучшения исходов беременности.

Литература

1. Петрухин В.А., Бурумкулова Ф.Ф. Гестационный сахарный диабет // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2014. – № 1. – С. 48–51. [Petrukhin VA, Burumkulova FF. Gestatsionnyi sakharnyi diabet. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. VF Snegireva*. 2014;1(1):48-51. (In Russ.)]
2. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(Suppl1): S13-S22.
3. Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. Гестоз: теория и практика. – М.: А36 МЕДпресс-информ, 2008. [Aylamazyan EK, Mozgovaya EV. Gestoz: teoriya i praktika. Moscow: MEDpress inform; 2008. (In Russ.)]
4. Zhao C, Dong J, Jiang T, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *Public Library of Science*. 2011;6(8):23925. doi: 10.1371/journal.pone.0023925.
5. Zhao Z, Moley KH, Gronowski AM. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):953-60. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.026.
6. Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-490. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972.
7. Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(8):836-43. doi: 10.1152/ajpendo.00660.2012.
8. Дедов И.И., Краснопольский В.И., Сухих Г.Т. Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение» // Сахарный диабет. – 2012. – № 4. – С. 4–10. [Dedov II, Krasnopol'skii VI, Sukhikh GT. Rossiiskii natsional'nyi konsensus "Gestatsionnyi sakharnyi diabet: diagnostika, lechenie, poslerodovoe nablyudenie". *Sakharnyi diabet*. 2012;(4):4-10. (In Russ.)]
9. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.1-R25.10. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
10. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*. 2001;125: 279-284.
11. Li T, Mo X, Fu L, Xiao B, Guo J. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7:8601-8612. doi: 10.18632/oncotarget.6926.
12. Madsen H, Ditzel J. Blood-oxygen transport in first trimester of diabetic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1984;63:317-320.
13. He P, Shao D, Ye M, Zhang G. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pathways in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol*. 2015;35(6):578-84. doi: 10.3109/01443615.2014.990430.
14. Ikeda Y, Tanji E, Makino N. MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*. 2012;10(2):259-69. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0035.
15. Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, et al. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2473-2477.
16. Lam KW, Chiu CN, Chung MK, et al. Glycodelin-A as a modulator of trophoblast invasion. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2093-2103. doi: 10.1093/humrep/dep205.

17. Savarimuthu Francis SM, Davidson MR, Tan ME, et al. MicroRNA-34c is associated with emphysema severity and modulates SERPINE1 expression. *BMC Genomics*. 2014;15:88. doi: 10.1186/1471-2164-15-88.

▪ **Адреса авторов для переписки** *(Information about the authors)*

Владимир Степанович Пакин — аспирант. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** pakins@list.ru.

Елена Сергеевна Вашукова — младший научный сотрудник. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** vi_lena@list.ru.

Роман Викторович Капустин — канд. мед. наук, врач акушер-гинеколог. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** kapustin.roman@gmail.com.

Ольга Николаевна Аржанова — д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения патологии беременности. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** arjanova_olga@mail.ru.

Андрей Сергеевич Глотов — старший научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** anglotov@mail.ru.

Владислав Сергеевич Баранов — руководитель лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней, член-корр. РАН, профессор, заслуженный деятель науки. ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. **E-mail:** baranov@vb2475.spb.ed.

Vladimir S. Pakin — PhD student. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** pakins@list.ru.

Elena S. Vashukova — scientist. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** vi_lena@list.ru.

Roman V. Kapustin — PhD. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** kapustin.roman@gmail.com.

Olga N. Arzhanova — head of the Department Pathology of pregnancy, professor. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** arjanova_olga@mail.ru.

Andrey S. Glotov — senior researcher of the Laboratory prenatal diagnosis of hereditary and congenital diseases. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** anglotov@mail.ru.

Vladislav S. Baranov — head of the Laboratory prenatal diagnosis of hereditary and congenital diseases, Corr. RAS, Professor. FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. **E-mail:** baranov@vb2475.spb.ed.