

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Цибизова Валентина Ивановна

**Значимость биохимических маркеров в прогнозе перинатальных
исходов при многоплодной беременности**

14.01.01 - Акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Бицадзе Виктория Омаровна

Москва - 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Многоплодная беременность - эпидемиология	11
1.2 Особенности течения беременности у двоен в зависимости от типа плацентации.....	14
1.2.1 Монохориальная двойня. Фето-фетальный трансфузионный синдром.....	14
1.2.2 Синдром анемии-полицитемии	18
1.2.3 Синдром обратной артериальной перфузии (СОАП)	21
1.2.4 Монохориальная моноамниотическая двойня.....	23
1.2.5 Неразделившаяся двойня	25
1.2.6 Дихориальная двойня.....	27
1.3 Сывороточные белки PAPP-A и β-ХГЧ.....	29
1.3.1 PAPP-A	29
1.3.2 β -ХГЧ.....	32
1.4 Пренатальный скрининг первого триместра и его роль в диагностике осложненного течения многоплодной беременности.....	35
1.4.1 Ультразвуковой этап скрининга.....	35
1.4.2 Биохимический этап скрининга	37
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Общая характеристика обследованных пациенток	39
2.2 Критерии включения и не включения	39
2.3 Методы исследования	40
2.3.1 Методы статистического анализа	43
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	45
3.1 Клиническая и демографическая характеристика групп.....	45
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	55
4.1 Возраст и методы наступления беременности	55
4.2 Оценка сывороточных белков	57
4.3 Оценка срока родоразрешения	62
4.3.1 Оценка количества преждевременных родов	64
4.4 Оценка веса плодов	72
4.5 Оценка антенатальной гибели в двойне	74
ВЫВОДЫ	81
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В настоящее время распространенность многоплодной беременности неуклонно возрастает в связи с широким внедрением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а также по причине того, что женщины все чаще откладывают беременность на более старший возраст, отдавая приоритет образованию и карьерным достижениям (Alhamdan D., et al. 2009). По оценкам ряда специалистов, распространенность многоплодной беременности в мире приобрела масштабы «эпидемии» (Л.Г. Сичинава, 2014). В старшей возрастной группе (в возрасте старше 35 лет) доля беременностей, наступивших в результате ВРТ, включая экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), инъекцию сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ), выше, чем в более молодом возрасте.

Многоплодная беременность относится к группе высокого риска, поскольку может сопровождаться развитием целого ряда специфических и неспецифических осложнений (Santolaya J., Faro R., 2012). Так, известно, что чем старше возраст матери, тем выше риск возникновения хромосомных аномалий у плодов. Кроме этого, при многоплодной беременности выше риск развития акушерских осложнений (выкидышей, преждевременных родов, внутриутробной задержки роста плода, его антенатальной гибели), фето-фетального трансфузионного синдрома, встречающегося при монохориальной двойне (частота его встречаемости при монохориальной диамниотической двойне от 10 до 15%, при моноамниотической - до 6%), селективной внутриутробной задержки развития (частота встречаемости до 30% у монохориальных двоен), а также неонатальных осложнений (частота встречаемости неврологического дефицита в группе монохориальных двоен составляет 5–25 %, при дихориальных двойнях – 1%).

При многоплодной беременности наблюдается 8–10-кратное увеличение перинатальной смертности по сравнению с беременностью одним плодом. Данный феномен может быть обусловлен более высокой долей недоношенных

среди новорожденных при многоплодной беременности - по некоторым данным, до 40–70% (Luke B., Brown M.B., 2006). Антенатальные потери, как правило, имеют место в I триместре беременности. При этом потеря одного плода из двойни происходит в 2–5% случаев. Также у монохориальных моноамниотических двоен имеет место более высокий риск перинатальной смертности, которая достигает 8-42% по причине врожденных пороков и осложнений, связанных с повреждениями пуповины (А.В. Михайлов с соавт., 2019).

Хотя частота перинатальной смертности при многоплодных беременностях в последние два десятилетия снизилась, несмотря на значительные изменения в подходах к ведению многоплодных беременностей она все еще остается относительно высокой (Сичинава Л.Г., 2014; Цивцивадзе Е.Б. , Новикова С.В., 2014).

Важно отметить, что бремя заболеваний и состояний, являющихся осложнениями многоплодной беременности, является чрезвычайно высоким как в финансовом, так и в морально-этическом аспекте. В этих условиях особую ценность приобретают способы своевременного прогнозирования осложнений многоплодной беременности. Широкое распространение в клинической практике приобретают высокоэффективные методы скрининга в I триместре для формирования групп беременных высокого риска хромосомной патологии у плода и осложнений беременности (Brizot M.I. et al., 2001). Мало- и неинвазивными методами скрининга признаны методы ультразвукового исследования (УЗИ) и измерение уровня сывороточных белков РАРР-А (англ. pregnancy-associated plasma protein-A, ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы) и β -ХГЧ (свободная бета-субъединица хорионического гонадотропина человека)(Маркелова А.Н. с соавт., 2019).

Целью комбинированного скрининга I триместра, является выделение группы высокого риска хромосомной патологии плодов (Cuckle H., 2001). Скрининг включает определенный алгоритм УЗИ, учет анамнестических данных и биохимических маркеров, определяющихся в сыворотке крови – РАРР-А и β -

ХГЧ. Данный комбинированный скрининг обладает высокой чувствительностью (до 95%) при использовании всех предложенных параметров (возраст, этническая принадлежность, вес, способ наступления беременности, оценка у плода толщины воротникового пространства, кровотока в венозном протоке, трикуспидальной регургитации, а также исследование биохимических маркеров в сыворотке крови), а частота ложноположительных результатов комбинированного скрининга I триместра не превышает 5% для многоплодной беременности. При использовании только двух параметров (возраст матери и оценка толщины воротникового пространства у плода) чувствительность метода снижается до 83%. Определение хориальности (монохориальная, дихориальная) на основании ультразвукового признака – Т-признака либо λ -признака (определяющийся на стыке оболочек амниотических полостей и плацентарной ткани) является важным фактором в прогнозировании исходов многоплодной беременности и принятии профилактических и/или активных лечебных мероприятий с целью снижения вероятности неблагоприятных акушерских исходов. Оценка показателей биохимических маркеров PAPP-A и свободного β -ХГЧ, вырабатываемого синцитиотрофобластами, напрямую влияющего на имплантацию и развитие плаценты, при проведении скрининга I триместра может быть использована не только для выделения группы риска хромосомной патологии, но и в прогнозировании развития состояний, связанных с нарушениями имплантации и плацентации, включая выкидыши, преждевременные роды, задержку роста плода, антенатальную гибель одного или двух плодов (Morssink L.P. et al., 1998; Bersinger N.A. et al., 1987, Poulsen H.K., 1987).

Надежные диагностические маркеры, с помощью которых было бы возможным точно определить прогноз неблагоприятных исходов при многоплодной беременности, на настоящее время не определены. В научных публикациях имеются ограниченные данные по концентрации PAPP-A и β -ХГЧ в сыворотке крови в I триместре у женщин, вынашивающих многоплодную беременность. В частности, отсутствует детальная оценка содержания данных сывороточных белков при многоплодных беременностях, наступивших в

результате различных методов зачатия (спонтанной или наступившей в результате ВРТ), а также взаимосвязи уровней PAPP-A и β -ХГЧ с исходами многоплодной беременности. Эти пробелы научных знаний определили цель исследования в рамках данной диссертационной работы - изучение диагностической ценности сывороточных концентраций PAPP-A и β -ХГЧ в пренатальном скрининге I триместра при многоплодной беременности. При этом большой научный и практический интерес представляет подход, предполагающий оценку показателя МоМ (англ. multiples of median – значение, кратное медиане) (Khalil A., 2017). Референсные значения составляют 0,5-2,0 МоМ. Предмет изучения представляет анализ исходов многоплодной беременности у женщин с отклонением индивидуального показателя МоМ ниже или выше референсных значений.

Цель исследования

Оценить возможность использования сывороточных белков β -ХГЧ и PAPP-A при выполнении комбинированного скрининга в первом триместре беременности в качестве биохимических маркеров для определения прогноза исходов многоплодной беременности.

Задачи исследования

- Оценить показатели PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ в сыворотке крови у женщин с многоплодной беременностью, наступившей спонтанно или в результате ЭКО.
- Установить частоту ранних преждевременных родов при многоплодной беременности, наступившей спонтанно или в результате ЭКО, при различном типе плацентации у женщин с различными показателями PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ.

- Выявить частоту антенатальной гибели плодов при многоплодной беременности, наступившей в результате спонтанного зачатия и в результате ЭКО при различном типе плацентации.
- Определить взаимосвязь между различными показателями PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ и частотой антенатальной гибели плода у женщин с многоплодной беременностью.

Научная новизна

Впервые проведен анализ исходов многоплодной беременности, наступившей в результате ЭКО и беременности, наступившей спонтанно, с оценкой корреляций сывороточных белков PAPP-A и β -ХГЧ.

Показана корреляция между низкими показателями PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ в первом триместре с 11⁺⁰ нед. по 13⁺⁶ нед. и увеличением количества осложнений при многоплодной беременности. Ведущими осложнениями оказались антенатальная гибель и преждевременные роды.

Выявлено, что многоплодная беременность имеет более высокие риски неблагоприятных исходов, главным образом связанные с типом многоплодия.

Проведена оценка распределения монохориального и дихориального многоплодия в группах женщин, у которых беременность наступила спонтанно и в результате ЭКО, при этом наибольшее количество монохориальных двоен отмечалось при спонтанном зачатии.

Практическая значимость

В связи с увеличением количества многоплодных беременностей и связанных с ними акушерских и неонатальных осложнений обоснована необходимость поиска и внедрения в клиническую практику эффективных методов прогнозирования неблагоприятных исходов.

По результатам исследования установлена взаимосвязь между низкими показателями PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ и такими неблагоприятными

исходами многоплодной беременности как антенатальная гибель плода и преждевременные роды.

Продемонстрированы различия между группами женщин с многоплодной беременностью, наступившей в результате ЭКО (группа ЭКО) и спонтанной беременностью (группа СБ): в группе СБ имело место достоверно большее количество преждевременных родов. Это обусловлено большей встречаемостью монохориального многоплодия в данной группе. Как известно, монохориальные двойни ассоциируются с большим количеством осложнений, связанных именно с особенностью единой плаценты. Это демонстрирует важность более тщательного дородового наблюдения женщин с монохориальными двойнями по сравнению с беременными дихориальными двойнями.

Эффективность пренатального биохимического скрининга первого триместра при многоплодной беременности с оценкой PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ показана не только с целью выделения групп риска анеуплоидий у плодов, но и для прогнозирования осложнений многоплодной беременности.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Уровень PAPP-A в группе многоплодных беременностей, наступивших в результате ЭКО, достоверно выше такового в группе спонтанных многоплодных беременностей. На величины показателей свободного β -ХГЧ и β -ХГЧ МоМ при многоплодии способ зачатия влияние не оказывает.
2. Многоплодная беременность, наступившая в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий, ввиду меньшей частоты монохориального многоплодия не является более угрожаемой в отношении преждевременных родов по сравнению со спонтанно наступившей многоплодной беременностью.
3. При монохориальной двойне риск задержки роста плода и маловесного плода достоверно выше, чем при дихориальной двойне независимо от способа зачатия

Вес плодов не различается у женщин, беременность которых наступила спонтанно, и у тех женщин, у которых беременность наступила в результате ЭКО.

4. Уровни PAPP-A МоМ и β – ХГЧ МоМ ниже 0,5 являются предиктором антенатальной гибели плодов при многоплодной беременности, наступившей в результате ЭКО и спонтанно с частотой 42,85% и 32,25%, соответственно.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объёмом материала, использованием современных методов исследования и оборудования.

По теме диссертационной работы опубликованы 4 печатные работы в ведущих российских и зарубежных рецензируемых журналах. Результаты исследования используются в работе клинико-диагностического отделения, а также отделения патологии беременности Перинатального Центра ФГБУ «Национального Медицинского Исследовательского Центра им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, и Медико-генетической консультации при Ленинградской Областной Клинической Больнице.

Автором проведено амбулаторное ультразвуковое исследование пациентов и выполнен комбинированный анализ результатов ультразвукового и биохимического исследования у беременных с многоплодием в консультативно-диагностическом отделении ФГБУ «Национального Медицинского Исследовательского Центра им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, Медико-генетической консультации при Ленинградской Областной Клинической Больнице. Сбор материала, анализ результатов исследования, статистическую обработку данных автор выполнил самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего отечественные и зарубежные

источники. Работа иллюстрирована 3 таблицами, 10 рисунками. Список литературы содержит 234 источника, из них 7 отечественных, 227 зарубежных источников.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 — «Акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно — пунктам паспорта «Акушерство и гинекология» 1, 2.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Многоплодная беременность - эпидемиология

Многоплодная беременность – это вид беременности, при котором количество плодов более одного. Такая беременность может развиваться в результате одного из двух возможных механизмов. Первый механизм заключается в том, что овуляция и последующее оплодотворение происходят в разных яйцеклетках, и в этом случае беременность называется разнояйцевой (или, в случае двух плодов, dizиготной многоплодной беременностью). У этих плодов будут различный набор генов. Другой механизм возникновения многоплодия заключается в делении одной оплодотворенной яйцеклетки, в результате чего образуются однояйцевые близнецы (в случае двух плодов говорят о монозиготной беременности). В этом случае набор генов у обоих близнецов будет одинаковым. Такие плоды всегда одного пола за исключением случаев синдрома Клайнфельтера (47,XXY). При dizиготном многоплодии каждый плод будет располагаться в отдельной полости амниона, иметь свой хорион (плаценту). Монозиготное многоплодие характеризуется наличием общей плаценты для обоих плодов, и двумя видами амниальности: диамниотическая, при которой имеется индивидуальная амниотическая полость для каждого плода, и моноамниотическая, когда полость общая для обоих плодов. При формировании такого специфического осложнения, как «не разделившиеся близнецы», их органы тоже могут быть общими. Дихориальная диамниотическая двойня формируется при разделении оплодотворенной яйцеклетки в первые 3 дня. В результате такого деления у каждого плода формируется собственная амниотическая полость и собственная плацента. Данный вид многоплодия формируется в 1/3 случаев. В более поздние сроки деления, а именно 4-8 сутки, формируется монохориальная диамниотическая двойня (одна плацента и две амниотические полости). Если деление оплодотворенной яйцеклетки происходит на 9-12 день, то формируется монохориальная моноамниотическая двойня. При

делении яйцеклетки в более поздний период, а именно после 12 дня, формируются «не разделившиеся близнецы»

Вероятность многоплодной беременности принято определять с помощью так называемого «закона Хеллина». Эта закономерность, сформулированная американскими учеными, говорит о том, что вероятность N-плодной беременности равна $1:89^{N-1}$ (1). Таким образом шанс рождения составляет:

- Для двойни – $1:89$ (=1,1%)
- Для тройни – $1:89^2$ (=0,013%), и т.д.

Вместе с тем «закон Хеллина» используется только для расчета вероятности наступления спонтанных беременностей. Однако, в настоящее время увеличение количества многоплодных беременностей связывают преимущественно с распространением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). При этом удельный вес ВРТ в качестве причины многоплодной беременности возрастает вместе с порядком многоплодия. Так, в США в 2011 году 36% близнецов и 78% тройняшек были рождены в результате зачатия, наступившего с помощью ВРТ (2). Вместе с тем, в последние годы отмечен тренд на сокращение числа многоплодных беременностей высокого порядка, что является благоприятным результатом административного регулирования в сфере ВРТ. Кроме того, известно, что вероятность такой беременности растет с увеличением возраста женщины. Этот факт связывают с более высоким уровнем фолликуло-стимулирующего гормона (ФСГ) у женщин более старшей возрастной группы (3). Совместное влияние этих двух факторов обуславливает тренд на ежегодное увеличение количества многоплодных беременностей. Например, в Канаде в период между 1979 и 1999 годами число рождений близнецов увеличилось на 35%. В России частота многоплодной беременности выросла на 48,6% за период 2000-2012 гг (4). В российских мегаполисах этот показатель достигает 2,4%.

Частота dizиготных двоен также варьирует в зависимости от географического положения рассматриваемой популяции. Так, к примеру, в Южной и Юго-Восточной Азии они встречаются реже (6-9:1000 родов), чем в Нигерии (>18:1000 родов) (5). Одновременно, количество монозиготных двоен не

зависит от этнической принадлежности, от возраста и количества родов у женщины, но существуют данные, что при разрушении прозрачной зоны (*zona pellucida*), при ИКСИ количество монозиготных двоен может быть в 2–3 раза выше, чем в общей популяции, хотя точный механизм данного феномена не установлен.

Многоплодная беременность может являться патологической, поскольку может быть связана с развитием целого ряда неспецифических и специфических нарушений. Среди неспецифических осложнений, т.е. таких нарушений, которые могут встречаться и при одноплодной беременности, выделяют преждевременные роды, малый вес ребенка при рождении, развитие преэклампсии у матери и детского церебрального паралича (ДЦП) у ребенка. Частота развития осложнений многоплодной беременности также возрастает с увеличением числа вынашиваемых плодов.

Двойни рождаются раньше срока в 51% случаев, тройни – в 91% случаев, что значительно превышает соответствующий показатель при одноплодной беременности (9,4%) (6). При этом 14% двоен и 41% троен рождаются в срок 28–32 недели гестации, в то время как при одноплодной беременности данный показатель составляет 1,7% (6). При этом возможности фармакологической профилактики преждевременных родов при многоплодной беременности остаются ограниченными. То же самое справедливо и в отношении хирургических методов, что было продемонстрировано в недавнем Кохрейновском обзоре (7).

ДЦП развивается в 2,3 случаях на 1000 живорождений при одноплодной беременности среди недоношенных или маловесных к сроку гестации. Частота развития ДЦП возрастает до 13:1000 при двойнях, и до 45:1000 при тройнях (8). По-видимому, в этих случаях ДЦП является результирующим фактором нескольких негативных влияний, таких как преждевременные роды и малый вес плода.

Следует отметить, что риски акушерских и перинатальных осложнений выше при монохориальной, чем при дихориальной беременности. Кроме того,

ввиду особого типа гемодинамики при монохориальной плацентации могут возникать и свойственные только ей осложнения, такие как фето-фетальный трансфузионный синдром (ФФТС), синдром селективной задержки плода (сЗРП), синдром анемии-полицитемии (САП), синдром обратной артериальной перфузии (СОАП) (9). Эти синдромы объединяет несбалансированное распределение крови между плодами в монохориальной двойне. Все вместе это приводит к тому, что при монохориальной двойне уровень перинатальной смертности значительно превосходит таковой при дихориальной двойне (2,8% vs 1,6%) (10).

В связи с высокими рисками, сопровождающими многоплодие во всем мире, специалистами охраны материнства и детства предпринимаются меры по ранней диагностике возможных осложнений и их предотвращению. Среди них особое место занимает комбинированный скрининг первого триместра.

1.2 Особенности течения беременности у двоен в зависимости от типа плацентации

1.2.1 Монохориальная двойня .Фето-фетальный трансфузионный синдром

Для монохориального многоплодия характерно наличие одной плаценты. В данном многоплодии существуют характерные осложнения, которые включают: ФФТС (11), САП, СОАП, моноамниотическую беременность и неразделившуюся двойню. ФФТС выявляется в 10% случаев монохориального диамниотического многоплодия. Сегодня во всем мире принята и широко используется универсальная классификация, разработанная пионером в области фетальной терапии и фетальной хирургии, профессором R.Quintero (12). Она позволяет определить степень гемодинамического дисбаланса среди сформировавшихся анастомозов на поверхности плаценты, а именно артерио-венозных анастомозов, которые имеют однонаправленный поток и ведут к возникновению анемии-полицитемии. Скрининг ФФТС должен начинаться с 16 недель беременности, как только почки начинают более интенсивную продукцию мочи, количество которой можно отследить как по размеру самого мочевого пузыря, так и по объему формирующейся амниотической жидкости, в ходе осмотров в динамике

каждые две недели. В 16 недель гестации у обоих плодов оценивают наличие визуализации мочевого пузыря и размеров кармана амниотической жидкости. Начиная с 20 недель к оценке данных параметров добавляется оценка скорости кровотока в средней мозговой артерии (СМА), которая является универсальным методом оценки недостаточности кровоснабжения ЦНС. По сравнению с монохориальной диамниотической двойней, при монохориальной моноамниотической двойне ФФТС встречается гораздо реже (в 6%)(11). Основным критерием, используемым в этой группе близнецов, становится наличие/отсутствие наполненных мочевых пузырей.

Если обнаруживаются данные критерии, то рекомендуется планировать более частые визиты беременной женщины к акушеру-гинекологу – до 1 раза в неделю. Если количество околоплодных вод у каждого из плодов различается, но находится в пределах нормы (не превышает 8 см (полигидрамнион) и не меньше 2 см (олигогидрамнион) у второго плода), и по данным доплерометрии показатели скорости кровотока в артериях пуповин, венозном протоке и СМА являются нормальными, то прогноз в отношении выживаемости можно охарактеризовать как благоприятный (выживают более 93% таких плодов). Риск развития ФФТС при этом составляет не более 14% (13) (14) (15).

На сегодняшний день единственным эффективным методом лечения ФФТС в монохориальной двойне является внутриутробная коагуляция однонаправленных артерио-венозных анастомозов. Лазерная фотокоагуляция применяется в лечении данного заболевания со второй стадии и выше. При первой стадии, характеризующееся полигидрамнионом у одного плода и олигогидрамнионом у второго плода, беременность рекомендуется вести консервативно с постоянным ультразвуковым и доплерометрическим мониторингом с интервалом в 7 дней. В случае невозможности применения лазерной фотокоагуляции проводят серию амниоредукций. На сегодняшний день окклюзия артерио-венозных анастомозов на поверхности плаценты прямо вдоль экватора (место разделительных оболочек, сформированных амниотическими полостями) является лучшим методом лечения ФФТС, диагностированного до 26

недель гестационного срока. В сравнительном анализе было доказано преимущество данного метода над серийной амниоредукцией и септотомией (9), (16). Тщательное наблюдение за беременными в первой стадии ФФТС по классификации Ruben Quintero необходимо, так как при ней развитие осложнений со стороны плода практически минимально, но нарастание многоводия составляет значительный риск для беременной, приводя к развитию дискомфорта, укорочению длины шейки матки и как следствие к разрыву плодных оболочек и преждевременным родам. В свою очередь, стремительное нарастание симптоматики диктует необходимость проведения эндоскопического вмешательства. В систематическом обзоре, посвященном ведению монохориальных беременностей, осложненных ФФТС I-й стадии, проводилось сравнение вида лечения и выживаемости. Результаты не сильно отличались как при фотокоагуляции, так и при выжидательной тактике (85% и 86%, соответственно), но при редукции околоплодных вод выживаемость была ниже (77%) (17). В 14% случаев происходит рецидив заболевания, что связывают с пропущенными или морфологически неправильно расцененными анастомозами, так как и артерио-артериальные и вено-венозные анастомозы, являющиеся двунаправленными, не коагулируются. Задача данного вида анастомозов состоит в «уравновешивании» гемодинамики (18). Существует два вида коагуляции: селективная, при которой выборочно коагулируют только артерио-венозные анастомозы и методика Соломона, когда формируют «экватор» от края до края плаценты (лазерная дихорионизация) (19) (20).

После выполнения коагуляции артерио-венозных анастомозов при ФФТС и в случае внутриутробной гибели одного из близнецов необходимо выполнение магнитно-резонансной томографии (МРТ) с целью оценки состояния структур головного мозга у выжившего близнеца с последующим выполнением оценки психомоторного развития в возрасте два года. На сегодняшний день нет прямых доказательств, которые бы позволили рекомендовать определенную частоту выполнения УЗИ после выполнения лазерной коагуляции при ФФТС. Но считается, что в течении двух недель уровень амниотической жидкости должен

прийти в норму. Сердечная функция реципиента, как правило, восстанавливается в течении месяца, если не идет речь об уже сформированном врожденно-приобретенном пороке сердца, таком как обструкция выходного тракта правых отделов сердца. У донора транзиторные нарушения, связанные не только с основным осложнением (ФФТС), но и с сопровождающим его ЗРП наблюдаются в течении длительного времени (21). Рутинное УЗИ в динамике включает оценку длины цервикального канала, оценку высоты максимального вертикального кармана амниотической жидкости, оценку фетометрических показателей. В результате доплерометрии оценивается кровоток в артериях пуповин, оценивается функция миокарда и сократительная способность в ходе исследования венозного протока, вычисляется индекс производительности миокарда (ИПМ) при исследовании систолической и диастолической функции. Также оценивается состоятельность трикуспидального клапана, скорость кровотока в СМА. Несмотря на успешно проведенное лечение примерно у 8% процентов таких близнецов в возрасте 10 лет определяются сердечно-сосудистые патологии, как правило, связанные со стенозом легочной артерии и различной степенью выраженности дисфункции миокарда (22), а в 4% случаях выявляются и повреждения структур мозга (23). Очень важно при динамическом наблюдении проводить тщательную оценку структур головного мозга, оценку ликвородинамики, выполнять эхокардиографию с оценкой состояния миокарда и вычислением систолической и диастолической функции, применяя ИПМ, оценку ВП и ТК. Необходима оценка конечностей плодов, поскольку в ходе коагуляции может быть нарушена целостность амниотических оболочек, что является потенциальным риском ампутации конечностей из-за амниотических тяжей.

К сожалению, проявление стойких сердечно-сосудистых изменений и нарушение структур головного мозга происходит, как правило, в третьем триместре внутриутробной жизни. В большинстве перинатальных центров, занимающихся ведением и лечение данных осложнений, сопровождающих многоплодие, МРТ с целью оценки структур головного мозга и выявления нарушения миграции нейронов проводится на гестационном сроке в 30 недель.

Идеальным результатом после лечения ФФТС является пролонгация беременности до 34 недель беременности (24). Несмотря на успешность проведения процедуры лазерной терапии по поводу ФФТС, такая беременность должна относиться к категории высокого риска по развитию неблагоприятных исходов (9). Как сказано ранее «риск развития патологии головного мозга и задержки психомоторного развития при беременности двойней, осложненной ФФТС - высокий» (25) (26). В ходе сравнения различных методов лечения ФФТС выявлено, что патология головного мозга после лазерной коагуляции имеет место в 5% случаев, после серии частичной эвакуации амниотической жидкости (амниоредукции) – в 14%, и в 21% случаев, если лечения не проводилось (27). При оценке отдаленных исходов, а именно неврологического статуса, выявлено что как в группе детей в возрасте 6 лет, так и в группах детей в возрасте 2 лет и 10 месяцев параметры значимо не различались: около 9% таких детей имели тяжелую форму психомоторной задержки развития (28).

1.2.2 Синдром анемии-полицитемии

Другим специфичным осложнением течения беременности при монохориальном многоплодии является синдром анемии-полицитемии (САП). Возникновение САП наблюдается в 5% спонтанно, а после лазерной коагуляции при лечении ФФТС САП имеет место в 13% случаев. Механизм развития САП, как и методы лечения, все еще остаются не до конца изученными (18). Полагают, что развитие САП связано с образующимися мелкими (диаметром < 1 мм) артерио-венозными анастомозами в толще плаценты, по которым происходит гемотрансфузия, приводящая к развитию анемии у одного плода и полицитемии другого (Таблица 1). Диагностика данного состояния проводится при помощи доплеровской оценки кровотока – максимальной систолической скорости в среднемозговой артерии (МСС-СМА): МСС-СМА > 1,5 МоМ у донора является показателем развившейся анемии, а МСС-СМА < 1,0 МоМ у реципиента является показателем полицитемии (Таблица 2). Также анализируют состояние плаценты,

а именно ее эхогенность и толщину. Для донора свойственны такие изменения, как утолщение плаценты и увеличение эхогенности. У реципиента, напротив, плацента истончается, значительно снижается ее эхогенность. Еще одним УЗ-маркером полицитемии служит снижение эхогенности паренхимы печени плода с ярко выраженными стенками портальных вен – симптом «звездного неба» (29) (30).

Таблица 1 Критерии синдрома анемии-полицитемии (САП)

Аntenатальные критерии	Постнатальные критерии
МСС-СМА > 1,5 МоМ у донора	Разница в уровне гемоглобина между близнецами > 8 г/л
МСС-СМА < 1,0 МоМ у реципиента	Разница в количестве ретикулоцитов составляет 1.7 Наличие плацентарных анастомозов диаметром < 1 мм

Таблица 2

Классификации САП (антенатальная)

Стадии	Признаки
«1»	МСС-СМА донора > 1,5 МоМ и МСС-СМА реципиента < 1,0 МоМ.
«2»	МСС-СМА донора > 1,7 МоМ и МСС-СМА реципиента < 0,8 МоМ.
«3»	Дискордантность кровотока в СМА, наблюдаемая при стадиях 1 и 2 с критическим аномальным кровотоком (наличие реверсивного кровотока в артериях пуповины или отсутствие конечного диастолического компонента, пульсация в пупочной вене. Повышение ПИ или реверсивный кровоток в ВП), изменениями в сердечной функции у донора

«4»	Водянка реципиента
«5»	Внутриутробная гибель одного или обоих плодов

Таблица 3

Классификация САП (постнатальная)

Стадии постнатально	Разница в уровне гемоглобина между близнецами, г/л
«1»	Свыше 8,0
«2»	Свыше 11,0
«3»	Свыше 14,0
«4»	Свыше 17,0
«5»	Свыше 20,0

Предсказать исходы беременности при многоплодии, осложненной САП, очень сложно, так как вариабельность является достаточно высокой. При тяжелой форме оба плода могут погибнуть, а при умеренной форме могут родиться практически здоровые дети, но имеющие существенную разницу в уровне гемоглобина (Таблица 3).

К причинам, способным привести к развитию тяжелых перинатальных осложнений, нужно отнести анемию, и полицитемию, требующие требующую переливания крови [111]. Также в литературе описываются такие связанные с САП осложнения, как поражения головного мозга, приводящие к задержке психомоторного развития [112]. При этом частота развития данных осложнений не превышает 20 % (как и при других осложнениях в монохориальном многоплодии) [113].

Протокол наблюдения за двойней с осложнённым САП во многом зависит от срока гестации, на котором был установлен диагноз, согласия родителей на

продолжение беременности, формы тяжести и возможностей для проведения внутриутробного переливания и/или лазерной фотокоагуляции анастомозов. Данные беременности необходимо вести согласно индивидуальному протоколу с ультразвуковыми и доплерометрическими измерениями в динамике. В случаях нарастания тяжести заболевания проводится лечение с целью купирования анемии с применением как гемотрансфузии, так и лазерной фотокоагуляции. При нарастании симптомов анемии и или отсутствии эффекта от лечения данную беременность родоразрешают досрочно (31) (32).

1.2.3 Синдром обратной артериальной перфузии (СОАП)

СОАП в монохориальной двойне встречается не часто и составляет 1% от всех монохориальных двоен или 1 на 35 000 беременностей. При данном осложнении беременности наблюдается один нормально сформированный плод и акардиальная масса (АМ) - плод с грубыми пороками развития и отсутствием нормального сердца, гемодинамика которого поддерживается нормально сформированным плодом (плод-помпа) (ПП) (33). Гемоциркуляция осуществляется ретроградным путем по артерио-артериальными анастомозам (двунаправленный тип циркуляции), определяющимся обычно в месте прикрепления пуповин к плаценте (34). На внутриутробном этапе развития оксигенированная кровь поступает к плодovому сердцу по венозному протоку, который являет собой продолжение пупочной вены. Венозный проток несет в правое предсердие оксигенированную кровь для головного мозга. В дальнейшем «обедненная» кислородом кровь возвращается в правые отделы сердца, затем в нисходящий отдел аорты, поступает в артерии пуповины, далее по ним же данная кровь возвращается к плаценте для насыщения кислородом.

Связывающий две системы гемоциркуляции ПП и АМ артерио-артериальный анастомоз, который формируется вследствие данного вида осложнения монохориального многоплодия, несет обедненную кислородом кровь от ПП к АМ, где кровь поступает в обратном направлении, а кровь из пупочной

вены идет в плаценту для реоксигенации. Вследствии перечисленных особенностей циркуляции кровотока и была названа данная патология: синдром обратной артеральной перфузии (СОАП). При СОАП сердце плода не развивается и присутствует в рудиментарном виде, либо лишь в виде «центрального сосуда» (35). 30% осложненных СОАП беременностей при консервативном ведении прерываются до срока 18 недель (36). Данная беременность ведется под динамическим ультразвуковым контролем и при возникновении показаний, угрожающих благополучию плода-помпы, проводится внутриутробное хирургическое вмешательство с целью окклюзии сосудов пуповины, питающих акардиальную массу.

К таким показаниям относятся соотношение фетометрических показателей между ПП и АМ, и показателей сердечной декомпенсации у ПП при УЗИ. В случае соотношения размеров ОЖ АМ и ПП $< 50\%$ и отсутствии сердечной недостаточности проводят осмотры в динамике каждые 2 недели. Также тактика наблюдения применяется при данном соотношении ОЖ, но с уже с признаками сердечной декомпенсации. При соотношении ОЖ $> 50\%$ без признаков декомпенсации функции сердца ПП показано проведение внутриутробного вмешательства в плановом порядке. При соотношении ОЖ $> 50\%$ в сочетании с сердечной недостаточностью оперативное лечение показано в экстренном порядке. На сегодняшний день применяются различные методики, такие как лазерная фотокоагуляция абдоминального отдела пуповины, наложение лигатуры на пуповину, а также интрафетальные методы, в частности, радиочастотная и лазерная абляция с доступом как к абдоминальному отделу пуповины так и к центральному сосуду «рудиментарному сердцу» (9) (37). Частота выживаемости после проведения внутриутробного вмешательства является достаточно высокой и составляет около 80% с минимальными акушерскими осложнениями ($< 10\%$ при использовании инвазивных методов внутриутробного вмешательства и $> 10\%$ при использовании фетоскопического оборудования для наложения лигатуры на пуповину АМ). Учитывая высокий процент развития осложнений для

продолжения беременности и для благополучия ПП предпочтительнее выполнение данной манипуляции на сроке до 16 недель гестации, так как в данный период внутриутробного развития выполнение абляции проводится малоинвазивными методами с минимальным риском развития как акушерских осложнений, так и риском для здорового плода (38). Частота преждевременных родов в сроке до 32 недель беременности при данной патологии монохориального многоплодия составляет около 10% (38). По последним исследованиям авторы предполагают, что чем раньше проводится внутриутробное вмешательство, тем позже наступают роды (39).

1.2.4 Монохориальная моноамниотическая двойня

Монохориальная моноамниотическая двойня – это вид многоплодия, при котором оба плода находятся в единой амниотической полости. Формирование такого вида многоплодия, при котором не только общая плацента, но и общая амниотическая полость, возможно, если деление произошло в интервале 8-12 дней беременности (40). Частота встречаемости таких двоен составляет 5% от всех монохориальных беременностей (41). При данном виде многоплодия достаточно высокие потери имеют место на ранних сроках гестации с частотой прерывания до 50% к 16 неделям беременности. Это обусловлено выделением цитокинов и простагландинов при гибели одного плода из двойни (11) (42), а также более высоким риском возникновения хромосомных аномалий (43). За последние 50 лет по данным литературы частота таких репродуктивных потерь снизилась с 40% (44) (45) до 10-15% (46). Такое снижение связано как с внедрением специализированных медицинских центров, которые ориентированы на ведение женщин с беременностью высокой группы риска, так и с техническим и профессиональным прогрессом в сфере медицины матери и плода.

Высокая частота неблагоприятных перинатальных исходов, связанных с моноамниотическим многоплодием, прежде всего обусловлена более высоким числом внутриутробных потерь. Согласно исследованию исходов беременности 98 двоен, перинатальная смертность, наступившая в период с 20 недель

беременности до 28 дней после рождения, составила 19%. Кроме того, данный показатель снижался на 2% при исключении из группы беременностей с аномалиями развития, а при гестационном сроке свыше 32 недель показатель перинатальной смертности не превышал 4% (46). Частота ФФТС в данной группе составляла 6%, поражение головного мозга определялось в 5% случаев (46).

В группе монохориальных моноамниотических двоен рекомендовано проводить родоразрешение при сроках гестации 32-34 недели, что связано с более высоким риском внутриутробной гибели. Данный риск намного выше в сравнении с респираторными осложнениями в неонатальном периоде (47). Исходя из вышесказанного, выбор срока для родов должен проводиться в индивидуальном порядке. Выбор метода является достаточно сложной задачей. Многие авторы отдают предпочтение кесареву сечению, нежели родам через естественные родовые пути (48) (49). В качестве показаний для оперативного родоразрешения можно рассматривать показания, аналогичные таковым при одноплодной беременности и при беременности с тазовым предлежанием. Частота наблюдаемого головного предлежания обоих плодов у данного вида беременности определяется в среднем в 40% случаев. В настоящее время существует такое понятие как комбинированное родоразрешение. При нем родоразрешение для первого плода проходит через естественные родовые пути, а для второго – при помощи кесарева сечения (50) (51). Обычно это касается тех женщин чья беременность протекает с осложнениями либо при наличии соматической патологии. Также данный подход применяется при таких осложнениях, как отслойка плаценты, выпадение петель пуповины, предлежание пуповины, запущенное неправильное положение плода. Одним из присущих монохориальной двойне осложнений является коллизия пуповин, но данное осложнение выявляется практически у всех таких двоен (52). По данным научной работы, в ходе которой авторами были проанализированы 114 двоен с моноамниотическим типом с «переплетением» пуповин увеличение перинатальной заболеваемости и смертности не выявлялось (46). Более того,

даже при таком доплерографическом признаке неблагоприятного кровотока в пуповинах, как «наличие дикротической выемки» при отсутствии других признаков ухудшения состояния плодов ухудшения исходов беременности отмечено не было (53). Показаниями для селективного фетоцида являются: грубые аномалии одного из плодов; прогрессирующий ФФТС; прогрессирующий сСЗРП одного из плодов; СОАП с выраженными рисками для ПП. В качестве метода применяется коагуляция пуповины с наложением лигатуры и ее пересечением. Пересечение пуповины является обязательным для предотвращения гемотрансфузии к погибшему плоду и сохранения благополучия здорового плода (54) (55). Исходы после проведения селективной терминации сходны с исходами при проведении в монохориальной диамниотической двойне селективной окклюзии по причине задержки развития одного из плодов или при проведении селективного фетоцида при наличии патологии у одного из плодов. Но следует отметить, что частота преждевременного излития вод и преждевременных родов при данном типе монохориальности выше.

1.2.5 Неразделившаяся двойня

Не разделившаяся двойня встречается крайне редко и составляет около 1 случая на 100 000 беременностей (1% от всех монохориальных двоен). Неразделившаяся двойня всегда является монохориальной моноамниотической (11) и возникает на сроке 13-15 дней после оплодотворения, что является своего рода поздним незавершенным разделением. Данный диагноз устанавливается во время выполнения пренатального скрининга в первом триместре по данным ультразвукового исследования (близнецы могут быть не разделены любой частью своих тел). Данное позднее незавершённое разделение является пороком развития. Даже раннее разделение эмбрионов нельзя считать полностью нормальным процессом, так как встречаемость пороков развития при этом значительно выше в сравнении с одноплодной беременностью и дизиготным многоплодием (56). По данным анализа 14 случаев пренатально выявленных

неразделившихся двоен, только 20% таких беременностей были прерваны искусственно, в 10% беременность прервалась самостоятельно. В тех случаях, когда родителями было принято решения пролонгировать беременность, выживаемость составила не более 1,25 детей из двоен при наличии тяжелой заболеваемости (57).

Система классификации такого вида двоен построена на определении локализации неразделения.

- 1) Торакопаги – область «неразделения»: грудные клетки и брюшные полости. Плоды обращены лицом к друг другу. Чаще всего наблюдается единый кишечник, общая печень, общий перикард и два сердца. Данная форма самая частая (57).
- 2) Омфалопаги – соединены брюшными полостями, определяется общая печень, билиарная система, иногда и общая двенадцатиперстная кишка. Выживаемость при разделении данного вида выше, но достаточно часто в этой группе выявляется врожденный порок сердца, что и влияет на постнатальный период.
- 3) Цефалопаги – общий череп, как правило одно лицо, но встречаются и два лица, расположенных на противоположных сторонах черепа, общая грудная клетка, верхний отдел желудочно-кишечного тракта до разделения дивертикулом Мекеля. Такая форма не жизнеспособна.
- 4) Иسخиопаги – соединены нижней частью тела. Наблюдается диастаз симфиза, общий дистальный отдел кишечника и прямой кишки, общее анальное отверстие, общий мочевой пузырь, две пары почек, отдельные гениталии.
- 5) Краниопаги – соединены частью свода черепа, мозговыми оболочками и венозным синусом, они не объединены ни грудными клетками, ни брюшными полостями.
- 6) Рахиопаги – встречаются крайне редко. Общий позвоночник и спина. Близнецы располагаются лицами противоположно друг другу, у каждого отдельная пара рук и ног. Из-за общего позвоночника типичное разделение невозможно, и поэтому одним из новорожденных жертвуют.
- 7) Пигопаги – объединены крестцом и копчиком, непрерывная твердая мозговая оболочка, иногда с продолжающимися ветвями спинного мозга, отдельный

кишечник и два анальных отверстия, хотя в 50% случаев определяется общая прямая кишка и анус, в 15% случаев имеет место общий мочевой пузырь, две уретры, но они объединены между собой. Общие наружные половые органы встречаются редко. Чаще всего гениталии разделены, но прилегают друг к другу.

8) Парапаги – соединены боковой стороной. Степень сращения различна. Как правило, определяется общий таз, брюшная полость, однако уровень сращения грудной клетки является различным. Определяются общая диафрагма, печень, дистальный отдел толстого кишечника и прямая кишка, одно анальное отверстие, общий таз, мочевой пузырь, гениталии. Отдельные позвоночники, два сердца, две пары легких, две пары почек. В отличие от исхиопагов, разделение парапагов практически невозможно.

При пролонгировании данной беременности должны быть проведены МРТ и УЗИ экспертного уровня в условиях акушерско-гинекологического учреждения III уровня (перинатальный центр). Необходимо провести детальную диагностику анатомии и функции систем жизнедеятельности плодов, определить тактику родоразрешения. Даже при наличии описанных естественных родов в данном виде многоплодия, риск осложнений в родах велик (дистоция плечиков, разрыв матки) поэтому предпочтительнее проводить данные роды с плановым оперативным родоразрешением (58). Как было указано ранее, данный вид многоплодия должен наблюдаться в условиях перинатального центра с возможностью оказания помощи как беременной, так и детям в постнатальном периоде специалистами с опытом ведения беременности неразделившимися близнецами.

1.2.6 Дихориальная двойня

Дизиготная двойня образуется в результате оплодотворения нескольких ооцитов в рамках одного менструального цикла. Такой тип двоен характеризуется формированием генетически различных детей. У каждого плода формируется «своя» амниотическая полость и «свой» хорион/плацента без сосудистой коммуникации между ними. Деление происходит с 1 по 3 сутки после

оплодотворения с образованием двух амниотических оболочек и плацент. Как указано ранее, данный вид многоплодия связан как с наследственным фактором, так и с увеличением возраста беременной. Но на сегодняшний день количество дихориальных двоен выше в беременностях, наступивших в результате ВРТ. За последние почти 40 лет количество женщин, обращающихся за вспомогательными репродуктивными технологиями, возросло и каждый год более 200 000 детей во всем мире рождается в результате ВРТ (59) (60) (61). Количество многоплодных беременностей в результате ВРТ возросло во всем мире и составляет сегодня 21,8% от всех родов (62). При сравнении исходов беременностей, наступивших спонтанно и в результате ЭКО перинатальная заболеваемость и смертность оказалась выше в группе ЭКО при одноплодной беременности (63) (64) (65) (66) (67) и ниже на 40% при многоплодной беременности дихориальной двойней, наступившей в результате ЭКО (63). Однако, в других работах исходы беременности, наступившей спонтанно и в результате ЭКО оказались схожими (68) (69) (70). В ряде исследований были продемонстрированы лучшие перинатальные исходы многоплодных беременностей после ЭКО, нежели чем исходы спонтанных беременностей (71) (72). В группе дихориальных беременностей риск врожденных пороков развития составляет 1:25, в то время как при монохориальной – 1:15 и при монохориальной моноамниотической – 1:6, соответственно (73). Родоразрешение в данной группе в подавляющем большинстве проводилось в плановом порядке посредством кесарева сечения (74). Частота спонтанных преждевременных родов была выше при двойне по сравнению с одноплодной беременностью. При этом 60% двоен рождаются до 37 недель гестации (11) (75). Задержка развития определяется как снижение веса плода < 10 перцентилиа и/или дискордантность в массе плодов более 20%. При выявлении данных показателей на УЗИ отмечается повышенный риск неблагоприятного исхода беременности. После постановки данного диагноза должен проводиться поиск причин, приведших к задержке роста. Необходимо детальное исследование на врожденные пороки развития, хромосомные аномалии, инфекции (краснуха, токсоплазмоз и цитомегаловирус).

Оценка размеров плода проводится по тем же параметрам, что и при одноплодной беременности. Несмотря на то, что в третьем триместре в многоплодной беременности происходит естественное замедления роста, применение специальных таблиц с определенными параметрами только для двоен не целесообразно, так как это может скрыть истинную плацентарную недостаточность, требующую тщательного наблюдения. Дискордантность между предполагаемыми массами плодов больше 25% достоверно сопряжена с высокими рисками антенатальной гибели при данном виде многоплодия (76).

1.3 Сывороточные белки PAPP-A и β -ХГЧ

1.3.1 PAPP-A

Ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы — протеин, используемый в тестах пренатального скрининга для определения синдрома Дауна.

Будучи обнаруженным в качестве плацентарного протеина, присутствующего в большом количестве в кровотоке у беременных, ассоциированный с беременностью белок-А плазмы (PAPP-A) широко экспрессируется во многих тканях (Рисунок 1). PAPP-A является высокоспецифичной металлопротеиназой, тесно связывающейся с гликозаминогликанами, присутствующими на поверхности клеток. Расщепляя подмножество белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста (IGFBP), PAPP-A, таким образом, функционирует в тканях как стимулирующий рост фермент, высвобождая биоактивный IGF в непосредственной близости от рецептора IGF.

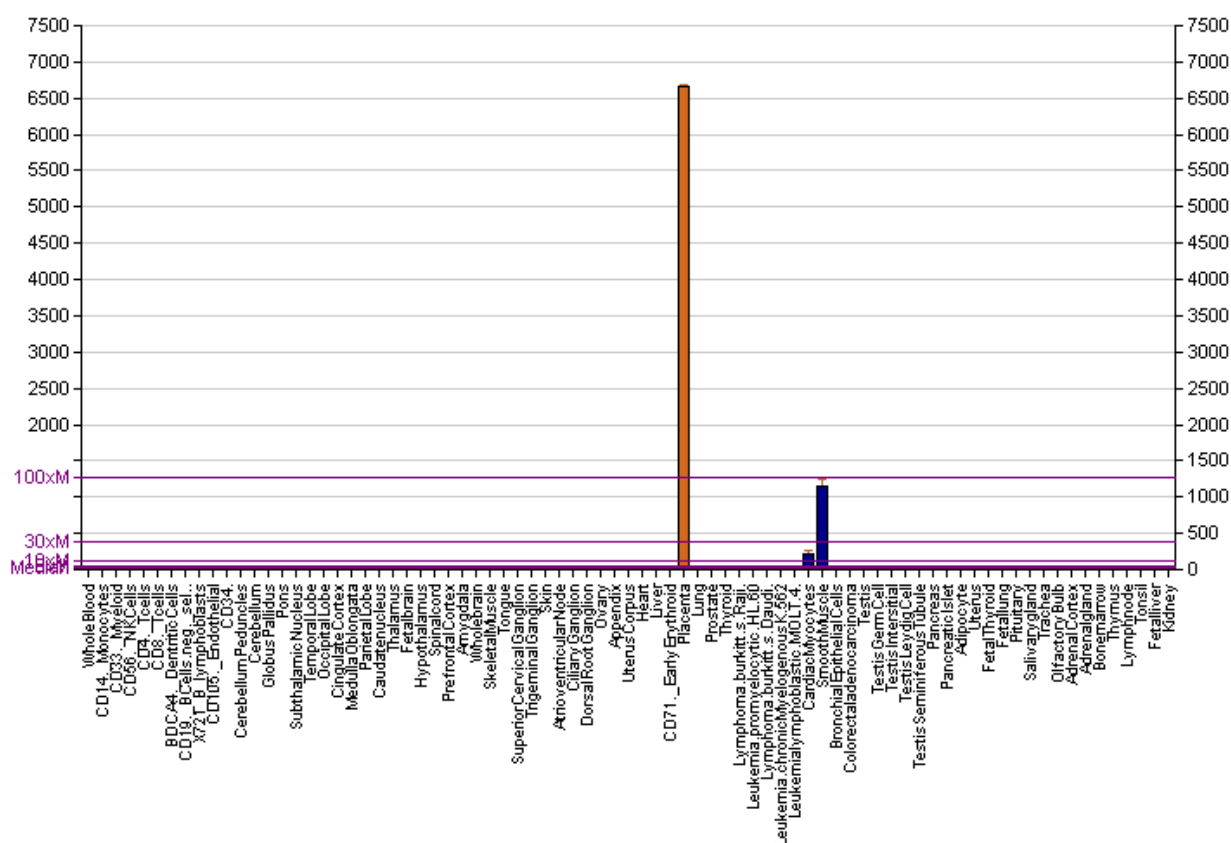


Рисунок 1. Экспрессия гена белка RAPP-A в различных тканях. Наибольший уровень экспрессии отмечается в ткани плаценты, значительно меньший – в гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах.

Диаграмма создана AndrewGNF. Распространяется по лицензии Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported.

В 1993 году было обнаружено, что то, что ранее называлось RAPP-A в плазме беременных женщин, на самом деле представляет собой гетеротетрамёрный дисульфид-связанный комплекс, состоящий из двух субъединиц RAPP-A, размером 200 кДа и двух субъединиц MBR, обозначаемых как RAPP-A / proMBR (77).

Клонирование ДНК (78) показало, что субъединица RAPP-A из 1547 остатков содержит уникальный набор белковых модулей, выделенных из нескольких различных белков. На самом N-конце находится G-подобный модуль из 250 остатков ламинина со слабым сходством, например, с α -цепью ламининов, нейрексинов и глобулина, связывающего половые гормоны. Функция этого модуля неизвестна. За ним следует модуль из 350 остатков, содержащий так называемую консенсусную последовательность удлиненного связывания цинка (79), определяющую особенность большой группы металлопротеиназ

метцинцина, включая MMP (matrix metalloproteinase, матриксную металлопротеиназу) и ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase, дизинтегрин и металлопротеиназа) (80).

Во время беременности PAPP-A в основном синтезируется в синцитиотрофобласте, тогда как proMVP синтезируется в экстравиллезных трофобластах (Х-клетках) (81). Комплекс PAPP-A / proMVP образуется во внеклеточной среде (82), но в то время как почти весь (99%) циркулирующий PAPP-A (50 мг/л к концу беременности) присутствует в форме комплекса PAPP-A / proMVP во втором и третьем триместре, переменная фракция (до 30%) PAPP-A существует в виде отдельного димера в первом триместре (83). мРНК PAPP-A можно обнаружить в большинстве тканей, но уровень PAPP-A, синтезируемого в плаценте человека, значительно превышает уровни в любой другой ткани (84). Любопытно, что хотя уровень циркулирующего PAPP-A увеличивается более чем в 10000 раз при беременности человека (85), это не относится к беременным мышам, поскольку PAPP-A не синтезируется в мышинной плаценте (86).

Хотя на основании аминокислотной последовательности было предсказано, что PAPP-A является металлопротеиназой, его протеолитическая активность была продемонстрирована экспериментально только в 1999 году. Было показано, что PAPP-A секретируется фибробластами и остеобластами и отвечает за протеолитическую активность в отношении белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP) -4 (87). Впоследствии было показано, что PAPP-A является протеиназой, ответственной за расщепление IGFBP-4 в фолликулярной жидкости яичника (88), и секретируется клетками гранулезы (88), клетками гладких мышц сосудов (89) и стромальными клетками эндометрия (90). Позднее было показано, что IGFBP-2 (91) и IGFBP-5 (92) также являются субстратами PAPP-A. Важно, что хотя эти белки IGFBP также расщепляются другими протеиназами, физиологическое расщепление IGFBP-4 может быть ограничено PAPP-A (92, 93). По сравнению с PAPP-A, PAPP-A2 в настоящее время гораздо менее изучен. IGFBP-3 и IGFBP-5 являются известными субстратами PAPP-A2 (94), и во время беременности циркулирующий IGFBP-5

подвергается расщеплению, за которое отвечает PAPP-A2 (95). В целом, PAPP-A взаимодействует с большим количеством протеинов, что отражено на Рисунок 2

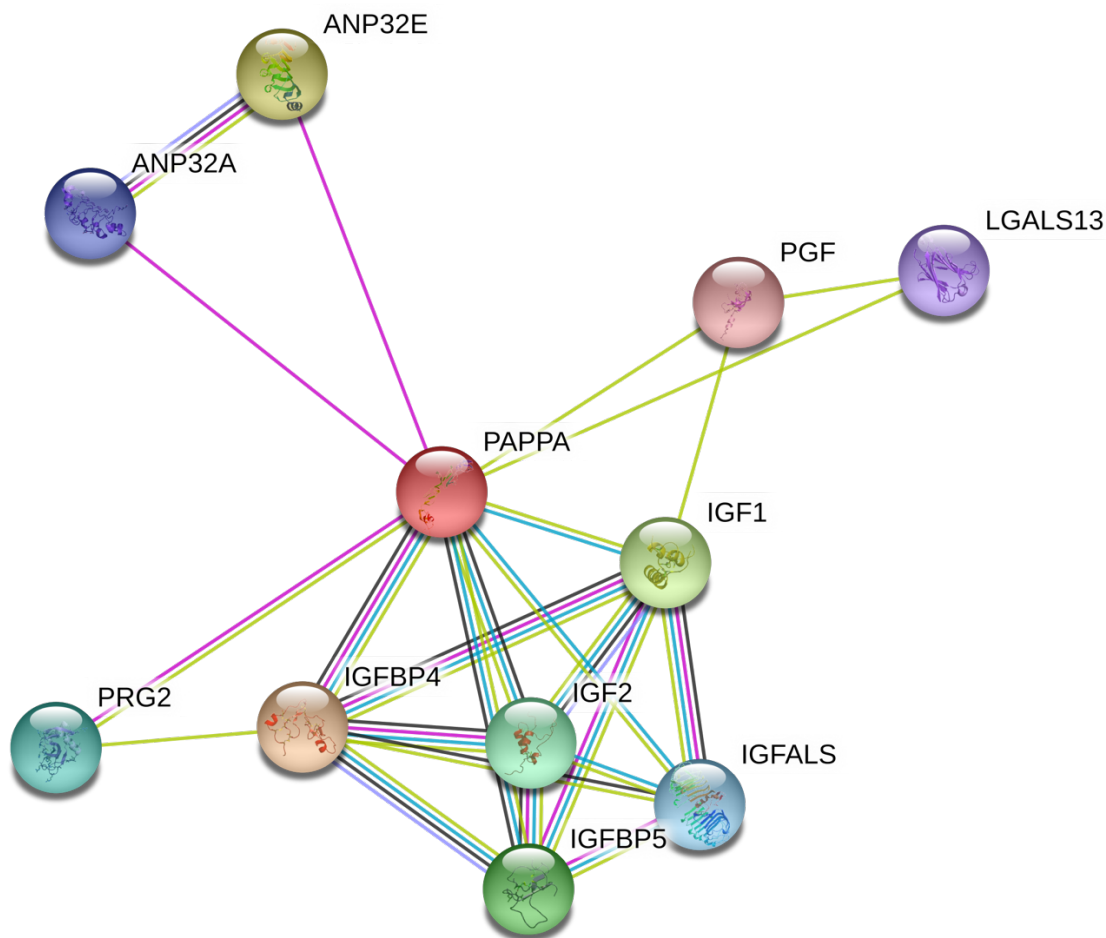


Рисунок 2. Схема взаимодействия сывороточного белка PAPP-а (в центре) с другими белками в организме человека (96).

1.3.2 б-ХГЧ

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) - это гормон, вырабатываемый плацентой после имплантации (97, 98). Присутствие ХГЧ используется в некоторых тестах на беременность (тесты на беременность с ХГЧ). Некоторые злокачественные опухоли также продуцируют этот гормон; следовательно, повышенные уровни у небеременных пациенток свидетельствует в пользу диагноза рак и, если уровень ХГЧ достаточно высок, паранеопластических синдромов, однако неизвестно, является ли эта продукция причиной или эффектом канцерогенеза.

В течение первых шести недель беременности ХГЧ способствует секреции прогестерона, эстрадиола и эстрогена путем трансформации постовульторного яичника в желтое тело беременности (99). Кроме того, ХГЧ связывается со своим рецептором, выполняя специализированные роли в стимулировании ангиогенеза в эндотелии матки (100), поддержании покоя миометрия (101), а также в стимулировании иммуномодуляции посредством изменения активности дендритных клеток, уменьшения активации Т-клеток и производства цитокинов, стимулирование рекрутирования Т-регуляторных (Treg) клеток и увеличение пролиферации клеток естественных киллеров матки (NK) на границе между матерью и плодом (102, 103). Устойчивый уровень ХГЧ достигается за счет его метаболизма плацентой, печенью, кровью и почками (104, 105).

Будучи гетеродимером, состоящим из 237 аминокислот, ХГЧ состоит из субъединиц α - (93 аминокислоты, 14,5 кДа) и β - (145 аминокислот, 22,2 кДа), которые нековалентно связаны и содержат в общей сложности восемь углеводных боковых цепей (106). Он является членом семейства гликопротеиновых гормонов, в состав которого также входят лютеинизирующий гормон (ЛГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). α -субъединица ХГЧ гомологична ТСГ, ЛГ и ФСГ, тогда как β -субъединица на 80–85% гомологична ЛГ (107, 108). В частности, β -субъединица ЛГ содержит 121 аминокислоту, тогда как β -субъединица ХГЧ состоит из 145 аминокислот. Разница в 24 аминокислоты между β -субъединицами ХГЧ и ЛГ, которая включает аминокислоты 121–145, уникальна для ХГЧ и называется С-терминальным пептидом (СТП) (107, 108). Следовательно, некоторые антитела к ХГЧ также распознают ЛГ, и наоборот (107). В результате своей структурной гомологичности по отношению к ЛГ ХГЧ связывается с рецептором лютеинизирующего гормона / хорионического гонадотропина (LHCGR) в течение первых 3-4 недель беременности, стимулируя клетки лютеинового тела, пока стероидогенная активность плаценты не начнет продуцировать достаточное количество прогестерона для поддержания беременности (109-111).

Восемь углеводных боковых цепей в структуре ХГЧ составляют 30% его молекулярной массы. В частности, α -ХГЧ содержит две N-связанные углеводные цепи на Asn52 и Asn78, тогда как β -ХГЧ содержит два N-связанных гликана на Asn13 и Asn30 и четыре O-связанных гликана, связанных с Ser121, Ser127, Ser132 и Ser138 (Рисунок 3) (107).

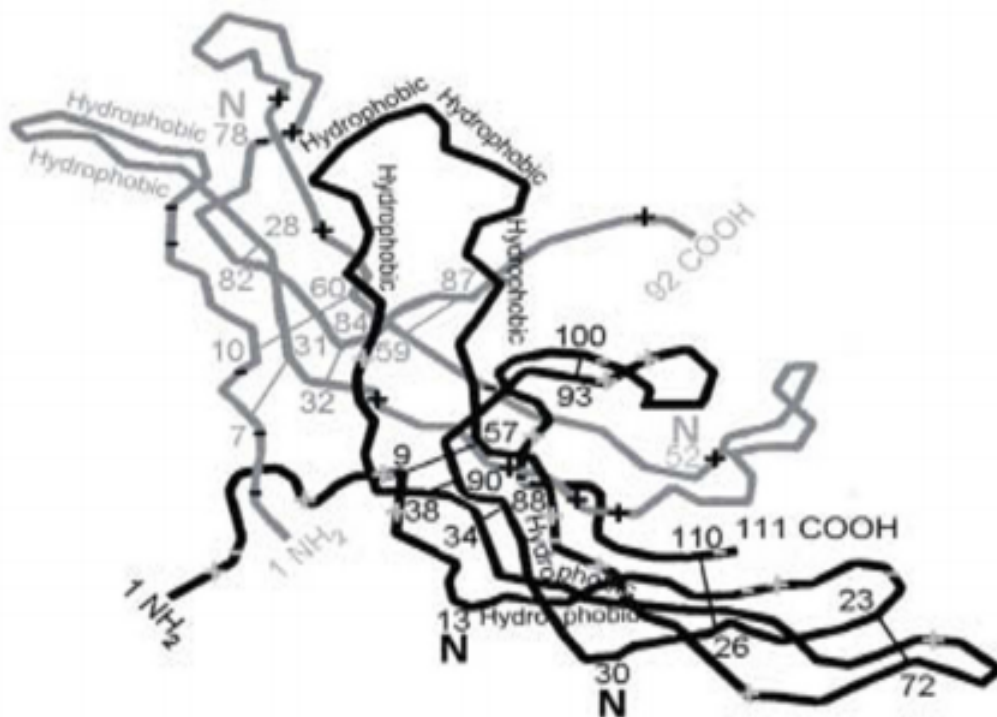


Рисунок 3. Структура хорионического гонадотропина человека, Laurence A. Cole 2012 (82).

Секреция, период полувыведения и функции ХГЧ зависят от его гликозилированного состояния. В частности, содержание сиаловой кислоты (N- или O-замещенных производных нейраминовой кислоты) в ХГЧ играет жизненно важные роли в его аффинности к связыванию с рецептором, функции и выведению из кровообращения (112).

Посттрансляционные модификации ХГЧ приводят к трем димерным изоформам: «обычный» ХГЧ, сульфатированный ХГЧ (ХГЧ-S) и гипергликозилированный ХГЧ (ХГЧ-H). Гипофиз является единственным источником секреции ХГЧ-S. В течение менструального цикла ХГЧ-S опосредует некоторые эндокринные функции, индуцируя выработку тека-клетками андростендиона, выработку желтым телом прогестерона, а также способствуя

процессу овуляции. Во время беременности ХГЧ, происходящий из синцитиотрофобласта, также индуцирует выработку прогестерона клетками желтого тела, тогда как ХГЧ-Н, производимый в цитотрофобласте, по-видимому, действует как аутокринный и паракринный фактор, активируя передачу сигнала, опосредованную β -рецептором трансформирующего фактора роста- (TGF β R) (113-115). ХГЧ-Н, продуцируемый на ранних сроках беременности и при различных онкологических заболеваниях, содержит больше структурно-сложных сialiрированных гликанов, чем ХГЧ-Н, вырабатываемый на средних и поздних сроках беременности (107, 116).

α -субъединица ХГЧ кодируется одним геном (CGA), локализованным в хромосоме 6q21.1-23 (117), а β -субъединица кодируется шестью неаллельными генами (CGB1, 2, 3, 5, 7 и 8).) локализован в хромосоме 19q13.3 (118). Широко распространено мнение, что этот кластер генов развился в результате дупликации из гена LNB, что привело к высокой консервативности их структуры на уровне нуклеотидов (85–99% идентичности ДНК-последовательности) (119). Экспрессия генов ХГЧ регулируется несколькими гормонами (кортикостероиды, прогестерон, ГнРГ), факторами роста (гормон роста плаценты, фактор, ингибирующий лейкемию, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)), цитокинами (интерлейкин (IL) -6, факторы роста эпидермиса (EGF), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), лиганды ядерного рецептора PPAR γ и ген гомеобокса (DLX3) (120-122).

1.4 Пренатальный скрининг первого триместра и его роль в диагностике осложненного течения многоплодной беременности

1.4.1 Ультразвуковой этап скрининга

Целью комбинированного скрининга I триместра, рекомендованного Порядком оказания медицинской помощи по профилю акушерство и гинекология N 1130н от 20 октября 2020 г., является выявление группы высокого риска по наличию хромосомной патологии у плода, а также риска развития таких

возможных акушерских осложнений, как преэклампсия, определение нарушения нормальной плацентации и ассоциированных с ней осложнений. Комбинированный скрининг включает в себя комплексную оценку данных анамнеза (возраст, этническая принадлежность, вес, способ наступления беременности), ультразвукового исследования (УЗИ плода - толщина воротникового пространства, визуализация носовой кости, характер кровотока в венозном протоке, и кровотока через трикуспидальный клапан) и биохимических маркеров сыворотки крови – PAPP-A и β -ХГЧ. Данный скрининг в отношении диагностики анеуплоидий обладает высокой чувствительностью (до 95%), при этом частота ложноположительных результатов для многоплодной беременности не превышает 5%. При использовании только двух параметров, таких как возраст матери и толщина воротникового пространства, чувствительность метода снижается до 83%. Оценка уровней синтезируемых синцитиотрофобластом PAPP-A и свободного β -ХГЧ при проведении комбинированного скрининга I триместра, напрямую влияющих на характер имплантации и последующее развитие плаценты, может быть применена не только для установления степени риска хромосомной патологии у плодов, но и для прогнозирования состояний, связанных с нарушениями имплантации и плацентации, таких как преждевременные роды, задержка роста плода, рождение ребенка, маловесного к сроку, антенатальная гибель одного или двух плодов.

Комбинированный скрининг рекомендован к проведению в период 11+0 до 13+6 недель беременности в период, когда копчико-теменной размер плода (КТР) составляет от 45 до 84 мм (5). В случае спонтанной многоплодной беременности для определения срока беременности должна быть использована величина КТР большего плода. Срок беременности, наступившей в результате ЭКО, рассчитывается исходя из даты переноса и возраста эмбриона на момент его переноса в полость матки.

Кроме того, важнейшей задачей УЗИ в первом триместре при многоплодии является установление хориальности беременности и числа амнионов. Хориальность определяют, ориентируясь на толщину и форму мембраны в месте

присоединения амниотической оболочки к плаценте в виде Т-признака при монохориальной и λ-признака при дихориальной плаценте (11). При установлении вида беременности следует внимательно изучить разделяющую мембрану. В случае ДХДА беременности двойней плоды разделены толстой перегородкой, образованной в центре слоем из двух слившихся между собой хориальных мембран с двумя тонкими амниотическими оболочками по периферии, по одной с каждой стороны, в виде знака “лямбда” (λ-признак) в месте прикрепления к плаценте. МХДА беременность двойней отличает наличие мембраны, состоящей только из соединенных между собой двух тонких амниотических оболочек, которая разделяет плоды и имеет в месте прикрепления вид буквы “Т” (Т-признак). При наличии единого амниона устанавливается монохориальная моноамниотическая двойня, наблюдение и родоразрешение которой ввиду высокого риска развития осложнений должно осуществляться в условиях стационара III уровня.

Проведение пренатального скрининга первого триместра регламентировано в период, когда копчико-теменной размер плода (КТР) составляет от 45 до 84 мм (то есть в сроки 11⁺⁰ до 13⁺⁶ недель беременности) (5)(123).

1.4.2 Биохимический этап скрининга

Для верификации риска наличия хромосомной патологии у плода, а именно синдрома Дауна (трисомия 21) в ходе исследования уровней биохимических маркеров таких как β-ХГЧ в сыворотке крови беременной женщины данный показатель должен быть увеличен (2 МоМ или более) в сравнении с нормальным значением для данного срока беременности, а уровень РАРР-А, наоборот, снижен (около 0,5 МоМ). Следует отметить, что степень различия показателя β-ХГЧ с референсными значениями при синдроме Дауна возрастает с увеличением срока гестации, а различия в концентрации РАРР-А уменьшаются. Изменения уровней маркеров обязательно должны быть внесены в программу для расчета индивидуального риска для пациентки. Использование большого количества анамнестических данных, данных ультразвуковых измерений, а также сопоставления с маркерными белками дает более высокую результативность в

сравнении с использованием только одного из возможных параметров (124). Шесть проспективных исследований подтвердили точность и результативность комбинированного скрининга с использованием в расчетах УЗИ параметров, таких как ТВП плода и концентрации β -ХГЧ и РАРР-А. Мультицентровые исследования, с участием 38804 беременных женщины, включая 182 с плодами с синдромом Дауна, показали, что частота выявления трисомии 21 у плода составляла 86% при частоте ложно-положительных результатов теста 5%(125). При наличии плодов с синдромом Эдвардса и Патау уровни содержания в сыворотке крови β -ХГЧ и РАРР-А снижены. При аномалии половых хромосом у плода концентрация β -ХГЧ в сыворотке крови матери не меняется, а уровень РАРР-А снижен. В случае триплоидного набора хромосом с удвоением отцовского набора хромосом у плода концентрация β -ХГЧ значительно повышается, а РАРР-А снижен. При триплоидии с удвоением материнского набора хромосом у плода происходит значительное снижение концентрации β -ХГЧ и РАРР-А. Комбинированный скрининг с учетом ТВП и концентрации β -ХГЧ и РАРР-А при биохимическом пренатальном исследовании позволяет выявить до 90% плодов с аномалией кариотипа с частотой ЛПР 1% по сравнению с частотой ЛПР скрининга только синдрома Дауна. Одним из самых передовых методов явилось внедрение технологии и организации автоматизированного определения концентраций биохимических маркеров в образце крови матери в течение 30 минут. Это позволило осуществить проведение ультразвукового и биохимического тестирования как части медико-генетического консультирования в рамках «клиники одного дня» с целью оценки индивидуального риска хромосомной патологии на ранних этапах беременности — OSCAR (One-Stop Clinic for Assessment of Risk) (126).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика обследованных пациенток

Настоящее исследование было ретроспективным и включало анализ данных медицинских карт беременных двойней, которые наблюдались в консультативно-диагностическом отделении ФГБУ «Национального Медицинского Исследовательского Центра им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, Медико-генетической консультации Ленинградской Областной Клинической Больницы в период 2012-2019 гг. В число наблюдаемых беременных вошли пациентки, принявшие участие в наших исследованиях (11) (127). Данные были обобщены, дополнены и пересчитаны на основе перераспределения по группам сравнения с учетом критериев включения и не включения, описанных ниже.

Все женщины подписали добровольное информированного согласие, позволяющее использовать деидентифицированные данные биохимического и ультразвукового исследований для исследовательских целей.

2.2 Критерии включения и не включения

Критерии включения пациенток в исследование:

- Многоплодная беременность
- Срок гестации 11⁺⁰-13⁺⁶ нед.
- Наличие информированного согласия
- Наличие документированных в медицинских картах сведений о течении и исходе беременности.

Критерии не включения пациенток в исследование:

- Одноплодная беременность
- Многоплодие более высокого порядка (тройни)
- Анеуплоидия по результатам биопсии хориона
- Преэклампсия

На этапе подготовки исследования были отобраны медицинские карты 347 женщин с многоплодной беременностью. При анализе было установлено, что средняя и тяжелая преэклампсия имела место только у 5 женщин, что не позволило включить данных пациенток в исследование.

После исключения пациенток с не полностью документированными сведениями о течении и исходах беременности, тройнями, и другими характеристиками, не соответствующими критериям включения и невключения, были отобраны медицинские карты 302 женщин, вошедших в исследование. Медиана их возраста составила 31,0 год (28,0; 34,5).

Были сформированы группы пациенток, у которых беременность двойней наступила в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ) и женщин со спонтанно наступившей беременностью двойней (11). В группу женщин, у которых беременность двойней наступила в результате ЭКО, вошли 115 (38,1%) женщин (группа ЭКО). В группу женщин, у которых беременность наступила в результате спонтанного зачатия (группа СБ) вошли 187 (61,9%) женщин. Возраст женщин из группы ЭКО оказались достоверно старше (32,0 года [29,0; 35,3]), нежели чем у пациенток из группы СБ (30,0 лет [26,0; 33,0]) ($p < 0,0001$).

2.3 Методы исследования

Этап ультразвукового исследования в рамках комбинированного скрининга I триместра для исключения хромосомной патологии у плода выполнялся на аппарате Voluson E8 (General Electric) в акушерско-гинекологическом режиме, адаптированном для проведения исследования в 1 триместре беременности (11).. Его выполнение его определено алгоритмом ультразвукового сканирования и предусматривает объединение с анамнестическими данными и результатами определения биохимических маркеров – PAPP-A и β -ХГЧ в сыворотке крови. Данное исследование имеет высокую степени чувствительности (95%) при

использовании широкого набора данных (возраст, этническая принадлежность, вес, способ наступления беременности, оценка толщины воротникового пространства (ТВП), венозного протока, трикуспидальной регургитации, МоМ PAPP-A и МоМ β -ХГЧ) (9). При использовании ограниченного набора данных (только возраст и ТВП) чувствительность метода снижается до 83 % (11). Хориальность определяли на основании ультразвукового признака – Т-знака, либо λ -признака (определяющийся на стыке оболочек амниотических полостей и плацентарной ткани), что является важным в расчете рисков анеуплоидии (9).

Оценка проводилась в период, когда копчико-теменной размер (КТР) составляет от 45 до 84 мм (то есть в сроки 11⁺⁰ до 13⁺⁶ недель беременности).

При спонтанной беременности (СБ) двойней, для оценки срока гестации использовался наибольший из двух копчико-теменных размеров (11). Для определения срока гестации при многоплодной беременности, наступившей вследствие ВРТ, использовался расчет по дате пункции фолликулов или возрасту эмбриона с момента оплодотворения. Ультразвуковую картину, демонстрирующую вид хориальности, сохраняли в медицинской документации для того, чтобы на данные изображения можно было ориентироваться в дальнейшем (11). В ходе исследования оценивал такие параметры, как толщина воротникового пространства (ТВП), пульсационный индекс (ПИ) в венозном протоке (ВП), состоятельность трикуспидального клапана (наличие/отсутствие регургитации), а также частоту сердечных сокращений (ЧСС).

Кровь для анализа уровня сывороточных белков получали посредством венепункции кубитальной вены в пробирку с активатором свертывания после 15 мин покоя в положении лежа. После этого пробирку центрифугировали при ускорении 3000 g в течение 15 мин. Образец сыворотки крови помещали для анализа в анализатор Kryptor (Brahms, Германия) (11).

Использовали принцип измерения, регламентированный в технической инструкции прибора Kryptor (Brahms, Германия):

Метод основан на технологии TRACE™ (усиленное излучение криптоата с временным разрешением), при которой с временной задержкой измеряется сигнал

от иммунокомплекса. Основой технологии TRACETM является безизлучательная передача энергии от донора (клеткообразная структура с ионом европия в центре [криптит]) к акцептору, который является частью химически модифицированного, свето-собирающего водородсодержащего протеина (XL 665). Близость донора (криптита) и акцептора (XL 665), когда они являются частью иммунокомплекса, и перекрывание спектра излучения донора и спектра абсорбции акцептора, с одной стороны, усиливают флуоресцентный сигнал криптита, а с другой стороны, увеличивают время жизни сигнала акцептора, позволяя измерить флуоресценцию с временной задержкой. Точное измерение концентрации аналита происходит описанным ниже способом. При возбуждении образца азотным лазером с частотой 337 нм, донор (криптит) излучает сигнал большой длительности в миллисекундном диапазоне с частотой 620 нм, тогда как акцептор (XL 665) формирует сигнал малой длительности в наносекундном диапазоне с частотой 665 нм. При соединении двух компонентов в один иммунокомплекс усиление сигнала и увеличение долговечности сигнала акцептора происходит на частоте 665 нм и поэтому может быть измерено в микросекундах. Неспецифичные сигналы, например, сигналы краткосрочного и несвязанного акцептора XL 665 и сигналы со средней специфичной интерференцией в зависимости от естественной флуоресценции пробы, исключаются путем временной задержки флуоресцентного измерения. Сигнал, формируемый криптитом на частоте 620 нм, служит как внутреннее опорное значение и измеряется одновременно с сигналом акцептора большой продолжительности с частотой 665 нм, который является специфичным сигналом. Мешающие воздействия, такие как замутнённая сыворотка, автоматически корректируются посредством рассчитанного внутренними средствами соотношения значений интенсивности на этих длинах волны).

В ходе скрининга в 1-м триместре, в период от 11⁺⁰ до 13⁺⁶ недель беременности, можно добиться корректного обнаружения трисомии хромосомы 21 примерно в 95 случаях из 100 путем сопоставления возраста матери с результатами УЗИ толщины воротникового пространства (ТВП) и

биохимического определения свободных β ХГЧ и РАРР-А. Таким образом обнаруживаются характерные модели изменений в каждом из биохимических показателей в случае трисомии хромосомы 21, трисомии хромосомы 18, трисомии хромосомы 13 и триплоидии, в сравнении с беременностью, при которой отсутствуют хромосомные патологии.

В рамках настоящей работы для оценки концентарации биохимических маркеров мы использовали описанные ниже подходы. Согласно существующим рекомендациям, , риск хромосомной патологии рассчитывают, сопоставляя срок беременности и концентрацию этих белков в сыворотке крови. При этом полученное значение концентрации белка конвертируется в значение в МоМ (multiple of median). Референсные значения МоМ получены для каждой недели беременности при измерении концентрации данного белка у женщин при неосложненном течении беременности. По существу, получены распределения Гаусса для десятичного логарифма ТВП в МоМ при трисомии 21 и при нормальном кариотипе, и вершина распределения при определенном значении МоМ будет представлять собой величину отношения правдоподобия для трисомии 21, которую необходимо использовать для вычисления из величины исходного риска по возрасту матери значения индивидуального риска. При дихориальной двойне показатель рассчитывается для каждого плода отдельно. При гибели одного из дихориальной двойни биохимический скрининг не проводится, и расчет производится только по материнскому возрасту и толщине воротникового пространства (11) (123) (127) (128).

2.3.1 Методы статистического анализа

Статистический анализ выполнялся в несколько этапов.

Определение нормальности распределения количественных показателей оценивалось с помощью метода Колмогорова-Смирнова. Ввиду ненормального распределения всех количественных показателей (кроме возраста) (127), для описания центральной тенденции преимущественно использовались медиана и

межквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). Для сравнения количественных переменных использовался U критерий Манна-Уитни. При анализе частоты антенатальной гибели плода между группами использовался критерий хи-квадрат Пирсона, а также точный тест Фишера.

Корреляционный анализ выполнялся для оценки простых связей между переменными с использованием попарной ранговой корреляции Спирмена.

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Статистический анализ производился при использовании пакета программ IBM SPSS 25.0 для операционной системы Mac OS.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Клиническая и демографическая характеристика групп

Из 302 соответствующих критериям включения женщин были сформированы группы из 115 женщин (38,1%) у которых беременность двойнями наступила в результате проведения процедуры ЭКО (группа ЭКО), и 187 (61,9%) женщин, у которых беременность двойнями наступила спонтанно (группа СБ). При этом женщины в группе ЭКО оказались несколько старше (32,0 года [29,0; 35,3]), чем женщины в группе СБ (30,0 лет [26,0; 33,0]), разница была статистически значимой ($p < 0,0001$) (Рисунок 4).

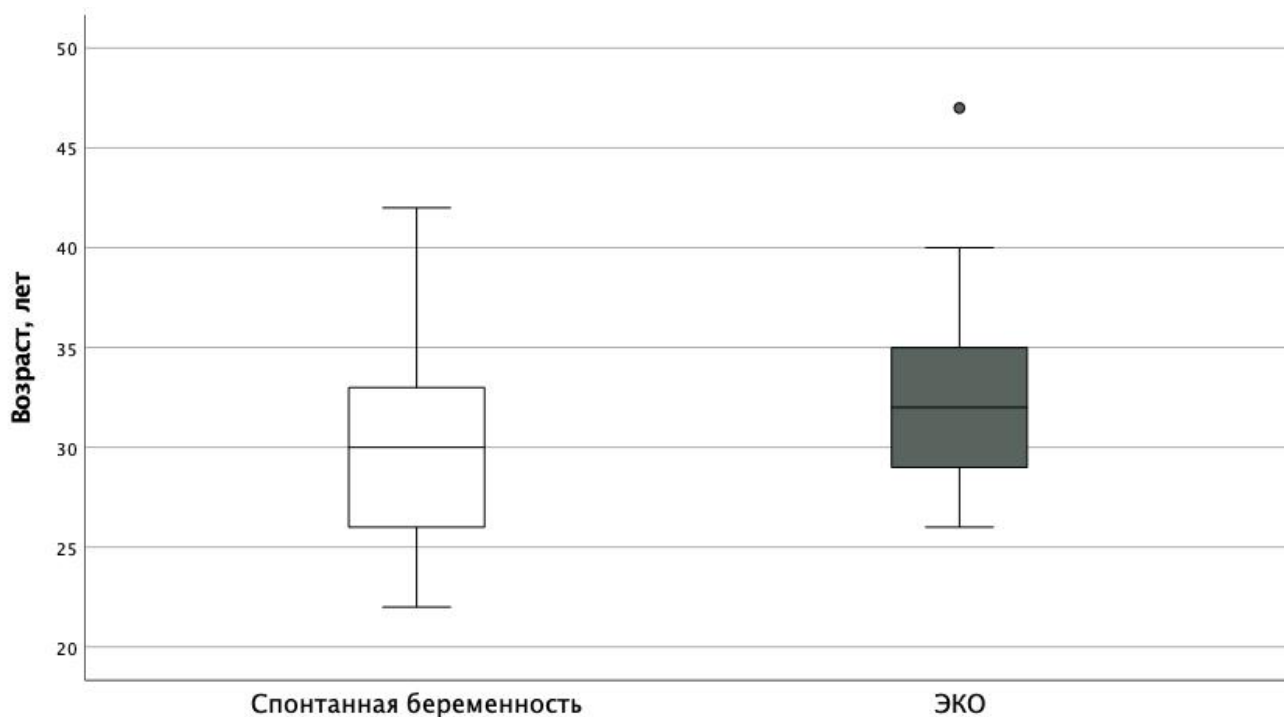


Рисунок 4. Различия в возрасте среди пациенток со спонтанно наступившей беременностью и беременностью, наступившей в результате ЭКО ($p < 0,001$).

Монохориальных двоен было 53 из 302 беременностей (17,5%), дихориальных – 249 из 302 беременностей (82,5%). Обращает на себя внимание высокая частота встречаемости дихориальных двоен при беременностях,

наступивших в результате ЭКО. При этом она оказывается статистически достоверно больше частоты встречаемости дихориальных двоен при спонтанных беременностях (94,78% vs. 74,87%, $\chi^2=19,520$, $p<0,001$).

Диапазон нормальных значений β – ХГЧ МоМ и PAPP-A МоМ принят равным 0,5-2,0. Среди всех пациенток показатель β – ХГЧ МоМ в пределах нормальных значений отмечен у 235 женщин (77,81%); β – ХГЧ МоМ ниже нормальных значений – у 36 пациенток (11,92%), выше нормальных значений – у 31 пациентки (10,26%) (Рисунок 5).

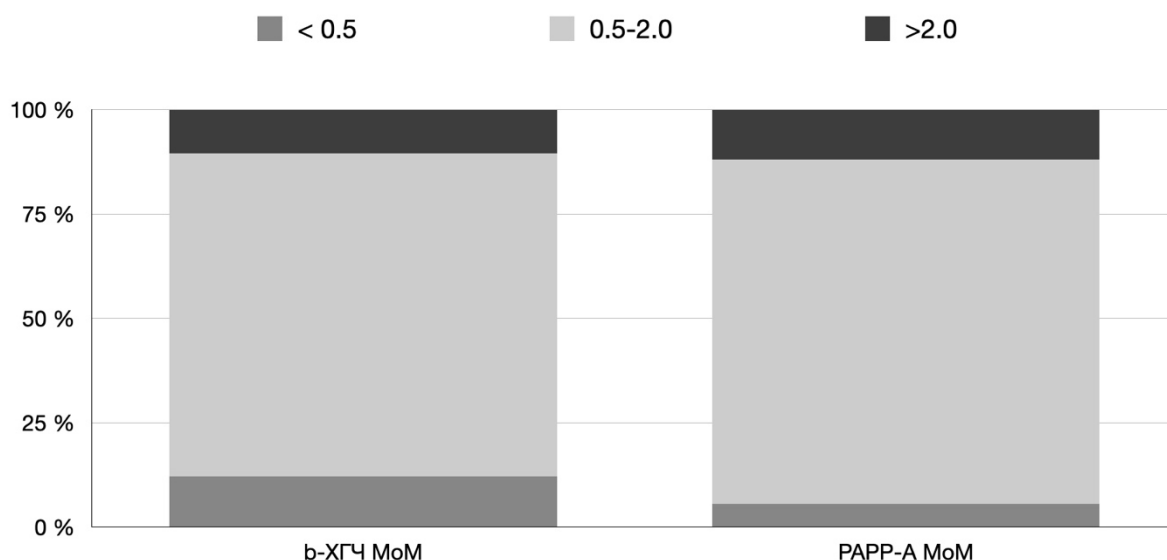


Рисунок 5. Распределение пациенток в зависимости от показателя β -ХГЧ МоМ или PAPP-A МоМ.

Показатель PAPP-A МоМ в пределах нормальных значений был отмечен у 249 пациенток (82,45%); PAPP-A МоМ ниже нормальных значений – у 17 пациенток (5,62%), выше нормальных значений – у 36 пациенток (11,92%) (Рис.5).

Срок родоразрешения в группах сравнения не различался ($p = 0,373$), в среднем беременность продолжалась 37 1/7 [34; 38 5/7] недель в группе СБ и 37 [33; 38 6/7] недель в группе ЭКО. Также, не было обнаружено статистически

значимых различий в частоте ранних преждевременных родов: роды на 22-34 неделях отмечались у 23,24% женщин из группы СБ и у 23,68% женщин из группы ЭКО, соответственно ($\chi^2=0,006$, $p=0,939$).

Вместе с тем в группе монохориальных двоен беременность продолжалась 36 [32; 38] недель, а в группе дихориальных двоен – 37 5/7 [34; 39] недель. Различия при этом были статистически значимыми ($p=0,024$).

Родоразрешение путем кесарева сечения в группе СБ имело место у 58,06%, а в группе ЭКО – у 62,96% женщин ($\chi^2=0,562$, $p = 0,454$).

Средний вес плодов значимо не различался между группами СБ и ЭКО ($p = 0,956$ и $p = 0,854$ для первого и второго плода соответственно). При этом средний вес плодов отличался в группах, сформированных на основе хориальности. Медиана веса первого и второго плодов в группе монохориальных двоен составила 2285 г [1482,50;2762,50] и 2300 г [1475,00;2600,00], в группе дихориальных двоен – 2535 г [2100,00; 2950,00] и 2500 г [2000,00; 2904,00] для каждого из плодов ($p = 0,013$ и $p = 0,008$, соответственно).

Уровень свободного β -ХГЧ в сыворотке крови (среднее значение с вычетом осложненных беременностей) в группе спонтанных беременностей составил 68,06 МЕ/мл [49,05; 88,98], а в группе беременностей, наступивших в результате ЭКО – 71,20 МЕ/мл [59,77; 122,00], ($p=0,108$). Различия не были статистически значимыми.

Показатель β -ХГЧ МоМ (среднее значение с вычетом осложненных беременностей) в группе СБ составил 0,96 [0,71; 1,28], а в группе ЭКО – 0,91 [0,73; 1,58] ($p=0,624$). Различия не были статистически значимыми.

Уровень РАРР-А (среднее значение с вычетом осложненных беременностей) в группе СБ составил 7,45 МЕ/мл [4,45; 10,16], а в группе ЭКО – 9,67 МЕ/мл [5,69; 13,27] ($p=0,012$). Различия были статистически значимыми (Рисунок 6).

Показатель РАРР-А МоМ (среднее значение с вычетом осложненных беременностей) в контрольной группе составил 1,12 [0,87; 1,52], а в исследуемой

группе – 1,41 [1,15; 1,78] ($p < 0,006$). Различия были статистически значимыми (Рисунок 7).

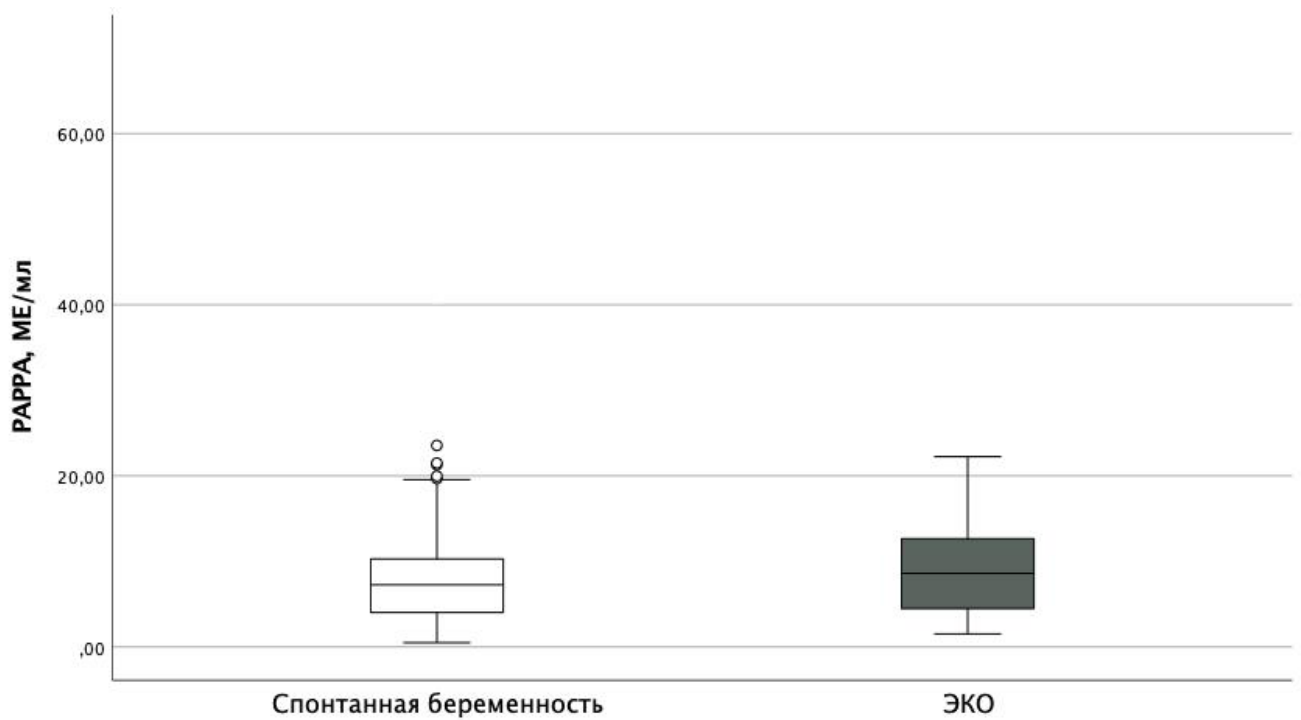


Рисунок 6. Различия в содержании белка PAPPA в сыворотке крови пациенток, чья беременность двойней наступила спонтанно, и в результате процедуры ЭКО, ($p=0,012$).^o-данные находятся за пределами нормального распределения значений.

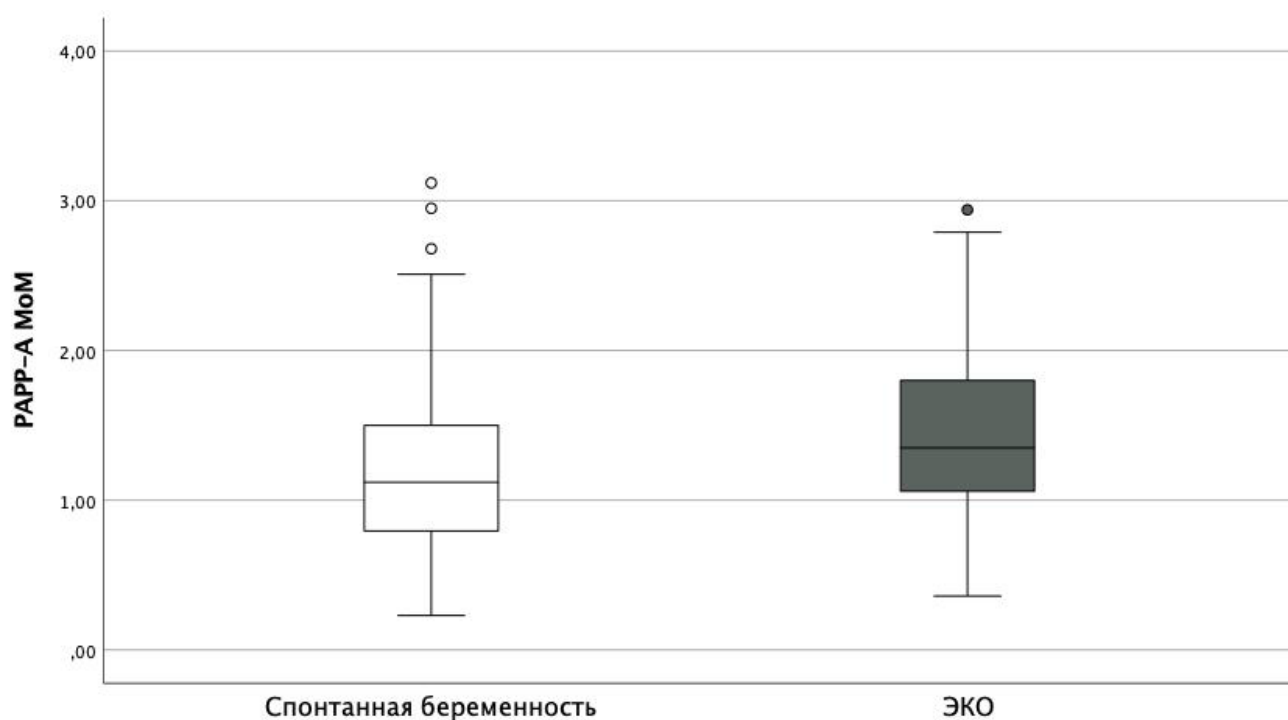


Рисунок 7. Различия в рассчитываемом показателе PAPP-A MoM у пациенток, чья беременность двойней наступила спонтанно, и в результате процедуры ЭКО, ($p < 0,0006$).^o-данные находятся за пределами нормального распределения значений.

Всего у 17 пациенток (5,62%) показатель PAPP-A MoM был ниже нижней границы референсного интервала ($< 0,5$ MoM). В группе ЭКО таких женщин было 9 (52,94%), в группе СБ – 8 (47,05%). Среди этих 17 пациенток монохориальную двойню вынашивали было 3 (17,64%), а дихориальную – 14 (82,35%) женщин. В этой группе уровень свободного β – ХГЧ составил 80,00 МЕ/мл (42,28-112,10); показатель β – ХГЧ MoM составил 1,15 (0,54-1,91).

Показатель PAPP-A MoM превышал верхнюю границу референтных значений ($> 2,0$) у 36 пациенток (11,92%). При дихориальном многоплодии показатель PAPP-A MoM $> 2,0$ наблюдался в 30 случаях (83,3%); при монохориальном многоплодии – в 6 случаях (16,66%); у 19 женщин из 36 (52,77%) беременность наступила в результате ЭКО, а у 17 из 36 (47,72%) – спонтанно. Антенатальная гибель плода наступила у 2-х женщин (11,76%) из 17, забеременевших спонтанно, и у 6 из 19 женщин (31,58%), забеременевших в результате ЭКО.

В подгруппе показателя PAPP-A МоМ ниже референсных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 35,29 % (6/17), в подгруппе PAPP-A МоМ в пределах референсных значений – 11,24 % (28/249), а в подгруппе PAPP-A МоМ выше референсных значений с частотой 22,22% (8/36). Различия между подгруппой с показателем PAPP-A МоМ < 0,5 и подгруппой с показателем PAPP-A МоМ 0,5-2,0 статистически значимы ($\chi^2=8,256$; $p=0,005$) (Рис. 8). Различия между подгруппой с показателем PAPP-A МоМ в пределах референсных значений (0,5-2,0) и подгруппой с показателем PAPP-A МоМ выше референсных значений (>2,0), а также между подгруппами с показателями PAPP-A МоМ <0,5 и >2,0 были незначимыми ($\chi^2=3,434$; $p=0,064$ и $\chi^2=1,015$; $p=0,314$ соответственно).

У 36 женщин показатель β -ХГЧ МоМ составил <0,5. В этой подгруппе показатель PAPP-A МоМ составил 0,79 (0,57-1,33), соответственно. В данной подгруппе монохориальных беременностей было 4 (12,9%), дихориальных – 27 (87,1%). У 16 женщин (51,6%) беременность наступила спонтанно, у 15 (48,4%) - в результате ЭКО.

В подгруппе показателя β – ХГЧ МоМ ниже референсных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 27,78 % (10/36), в подгруппе β – ХГЧ МоМ, соответствующего референсным значениям – 8,93% (21/235), в подгруппе β – ХГЧ МоМ выше референсных значений – 9,67 % (3/31). Различия между подгруппами с показателем β – ХГЧ МоМ < 0,5 и подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ 0,5-2,0 статистически значимы ($\chi^2=10,940$; $p<0,001$) (Рисунок 8). Различия между подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ в пределах референсных значений (0,5-2,0) и подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ выше референсных значений (>2,0), а также между подгруппами с показателями β – ХГЧ МоМ <0,5 и >2,0 были незначимыми ($\chi^2=0,018$; $p=0,893$ и $\chi^2= 3,490$; $p=0,062$, соответственно).

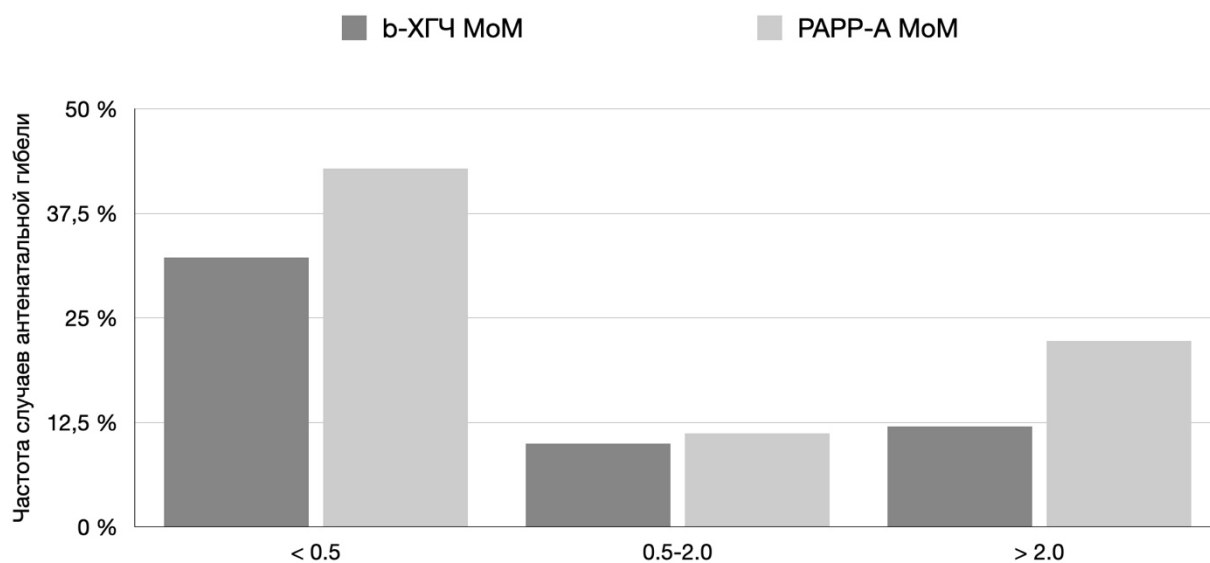


Рисунок 8. Различия в частоте случаев антенатальной гибели в подгруппах, имеющих показатели МоМ сывороточных белков PAPP-A и β -ХГЧ, ниже (<0,5), в пределах (0,5-2,0) и выше (>2,0) референсных значений, соответственно.

Аntenатальная гибель одного плода встречалась с частотой 11,25 % (34/302), двух плодов – 1,98 % (6/302). Частота наступления смерти одного плода не значительно отличалась между двойнями при спонтанной беременности и двойнями при беременности в результате ЭКО ($\chi^2=2,166$; $p = 0,142$), а также между моно- и дихориальными двойнями ($\chi^2=1,216$; $p = 0,271$).

Значения свободного β -ХГЧ (Рисунок 9) и PAPP-A МоМ (Рисунок 10) были статистически значимо выше в группе неосложненных беременностей в сравнении с осложненными.

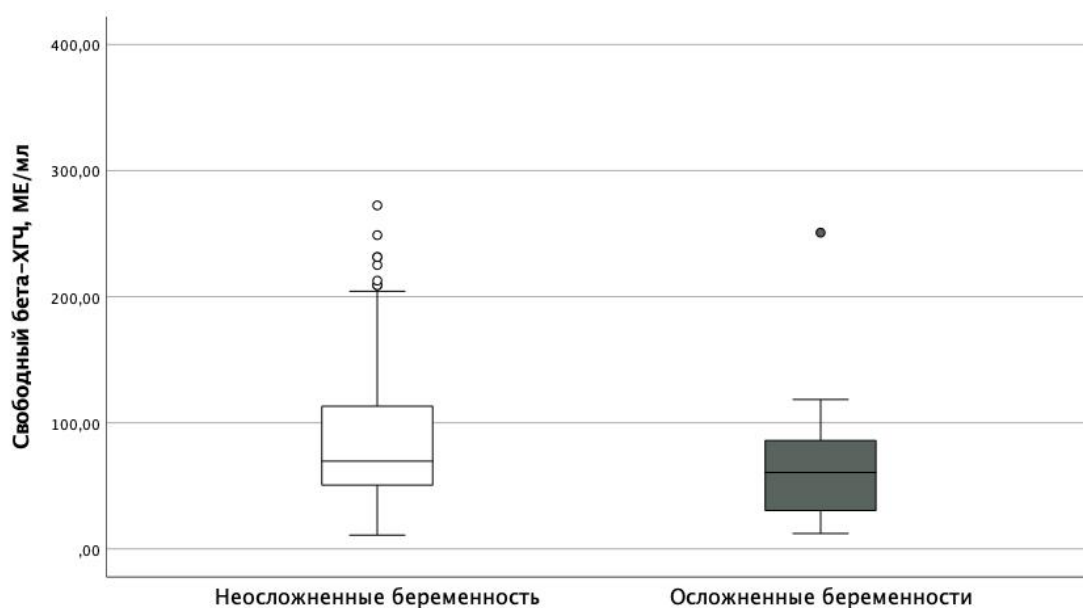


Рисунок 9. Различия в содержании β – ХГЧ в сыворотке крови среди пациенток, у которых беременность двойней закончилась рождением живых детей и тех, беременность которых осложнилась наступлением антенатальной гибели плода ($p < 0,006$). $^{\circ}$ -данные находятся за пределами нормального распределения значений.

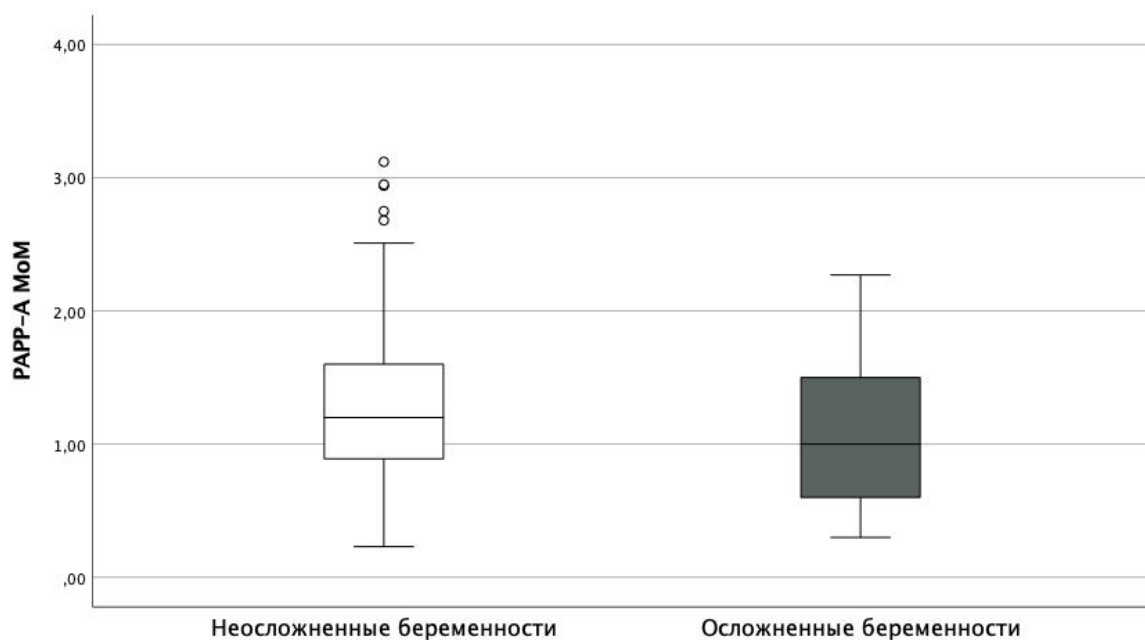


Рисунок 10. Различия в рассчитываемом показателе PAPP-A MoM среди пациенток, у которых беременность двойней закончилась рождением живых детей и тех, беременность которых осложнилась наступлением антенатальной гибели плода, ($p < 0,020$). $^{\circ}$ -данные находятся за пределами нормального распределения значений.

При использовании регрессии Кокса для анализа выживаемости мы обнаружили, что с увеличением возраста пациентки на один год риск антенатальной гибели плода возрастает в 1,21 раза (ОШ- 1,21, 95% ДИ= 1,02-1,43, $p=0,027$).

Ранние преждевременные роды (22-34 недели) встречались в 65 (21,5%) случаях из 302 беременностей – 21 случай из 65 (32,3%) имел место у женщин из группы ЭКО, 44 из 65 (67,7%) – у женщин из группы СБ, соответственно. Частота преждевременных родов от общего числа беременностей в группе ЭКО составила 18,26%, а в группе СБ 23,52%, соответственно. Частота ранних преждевременных родов в подгруппе беременных монохориальными двойнями составила 18 преждевременных родов из 53 монохориальных двоен (33,96%). Частота ранних преждевременных родов в подгруппе беременных дихориальными двойнями составила 47 преждевременных родов из 249 дихориальных двоен (18,88%). Различия были статистически достоверны ($\chi^2=5,889$, $p=0,016$).

В подгруппе показателя PAPP-A МоМ ниже референсных значений преждевременные роды (22-34 недели) не встречались (0 из 17), в подгруппе PAPP-A МоМ в пределах референсных значений – 21,29 % (53 из 249), а в подгруппе PAPP-A МоМ выше референсных значений с частотой 30,55% (11 из 36). Различия между подгруппой с показателем PAPP-A МоМ < 0,5 и подгруппой с показателем PAPP-A МоМ 0,5-2,0 были статистически значимы ($p=0,03$). Различия в количестве преждевременных родов между подгруппой с показателем PAPP-A МоМ в пределах референсных значений (0,5-2,0) и подгруппой с показателем PAPP-A МоМ выше референсных значений (>2,0) были статистически не значимы ($\chi^2 =1,552$, $p=0,21$), в то время как они отличались между подгруппами с показателями PAPP-A МоМ <0,5 и >2,0 ($p=0,01$).

В подгруппе показателя β – ХГЧ МоМ ниже референсных значений преждевременные роды встречались с частотой 16,66 % (6 из 36), в подгруппе β – ХГЧ МоМ, соответствующего референсным значениям – 19,14 % (45 из 235), в подгруппе β – ХГЧ МоМ выше референсных значений с частотой 22,58 % (7 из 31). Различия между подгруппами с показателем β – ХГЧ МоМ < 0,5 и

подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ 0,5-2,0 статистически не значимыми ($\chi^2= 0,001$; $p= 0,97$). Различия в количестве преждевременных родов между подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ в пределах референсных значений (0,5-2,0) и подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ выше референсных значений ($>2,0$), а также между подгруппами с показателями β – ХГЧ МоМ $<0,5$ и $>2,0$ были статистически не значимыми ($\chi^2= 0,308$; $p=0,579$ и $\chi^2= 0,144$; $p= 0,705$, соответственно).

В группе с показателем PAPP-A МоМ ниже референсных значений ($<0,5$) одна беременность (1/17; 5,88%) прервалась на сроке 10 недель. В остальных случаях роды наступили после 36 недель.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Возраст и методы наступления беременности

Количество многоплодных беременностей за последние две декады колоссально возросло. Это связывают с общемировым трендом увеличения возраста матери к первым родам, а также широким распространением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Существует два уникальных типа многоплодия: dizygotная (ДЗ) и monozygotная (МЗ) беременности. Monozygotные близнецы встречаются спорадически, в то время как частота возникновения dizygotных близнецов увеличивается с возрастом матери в результате применения технологий индукции овуляции (129). В проведенном исследовании средний возраст обследованных в группе СБ составил 30 лет (26;33), а в группе ЭКО пациентки были несколько старше - 32 года (29;35). По данным многих исследований, пациентки, беременность которых наступила в ходе ВРТ, в частности, ЭКО, действительно оказываются несколько старше женщин со спонтанной многоплодной беременностью. При этом разница обычно не превышает 3-4 года (130). Также современные условия жизни не способствуют тому, чтобы большинство женщин обзаводились детьми раньше наступления 30 лет. Это связано как с удлинением, так и интенсификацией образовательного процесса и карьерного роста. Подобный тренд приводит как к увеличению возраста первых родов, что является фактором, ассоциированным с наступлением многоплодной беременности, так и к увеличению количества хронических заболеваний, накоплению негативных влияний от вредных привычек, нередко увеличению индекса массы тела. Вместе, эти факторы затрудняют естественность процесса наступления беременности, а значит требуют в дальнейшем помощи ВРТ. Кроме того, известную роль играют комбинированные оральные контрацептивы, получившие широкое распространение, поскольку вскоре после их отмены повышается вероятность возникновения многоплодных беременностей (131). Обращает на себя внимание преобладающее большинство дихориальных двоен в беременностях, наступивших

в результате ЭКО (Табл.4). При этом их частота оказалась статистически больше таковой при спонтанных беременностях (94,78% vs. 74,87%, $\chi^2=19,520$, $p < 0,001$).

Ключевая причина преобладающего количества многоплодия при проведении ВРТ заключается в том, что переносится сразу несколько эмбрионов. Это происходит ввиду желания пар увеличить шансы на достижение желаемого результата и, нередко, высокой цены на услуги ВРТ. Кроме того, в некоторых странах, где существуют государственные ограничительные меры, направленные на рождение второго ребенка, беременность более высокого порядка может являться предпочтительным исходом для некоторых женщин. Так, многоплодная беременность составляет от 20% до 25% от всех беременностей ЭКО. Следует отметить, что риск неблагоприятного перинатального исхода в таких беременностях, по-видимому, не превышает таковой при многоплодных беременностях, наступивших при естественном спонтанном зачатии или после стимуляции яичников. Вместе с тем, акушерские и неонатальные осложнения чаще встречаются в многоплодных беременностях (монохориальных или дихориальных), чем при одноплодной беременности (134).

Учитывая вышеизложенное, снижение частоты заведомо многоплодной беременности при переносе большого количества эмбрионов в настоящее время считается важной задачей для программ ВРТ, несмотря на то, что некоторые пациенты могут настаивать на обратном с целью повышения шансов на успех (136). Существующие рекомендации предписывают клиникам ВРТ предпринимать необходимые меры по снижению частоты многоплодной беременности, утвердив перенос не более 2-х эмбрионов (137).

Монохориальный вид двойни является относительно редким явлением и встречается в 3,5 случаях на 1000 родов (138). Одновременно известно, что число монохориальных беременностей выше при натуральном зачатии (139). Также некоторые исследования демонстрируют, что использование методов, предполагающих воздействия на *zona pellucida* (к примеру ИКСИ), приводит к тому, что такой вид хориальности встречается чаще (140). Базовым механизмом формирования монозиготных близнецов является деление эмбриона на раннем

этапе его развития. Разделение клеток теоретически может происходить до или после формирования внутренней клеточной массы. Женщины, проходящие лечение с помощью методов ВРТ, особенно в возрасте старше 35 лет и у кого планируется проведение ИКСИ, должны быть проинформированы о низком, но существующем риске возникновения монозиготного многоплодия (141). Также имеет место тенденция к более частому монозиготному многоплодию при переносе 5-дневной бластоцисты в сравнении с 3-дневной, но для подтверждения этого вывода требуются более масштабные исследования (142).

Двойня, зачатая при помощи ВРТ, имеет гораздо меньший шанс возникновения МХ плацентации. А также, по данным исследований, риски антенатальных потерь выше при спонтанным многоплодии, несмотря на более старший возраст матерей, забеременевших в результате применения ВРТ (130)(143). В данном исследовании нами были проанализированы сывороточные белки β -ХГЧ и PAPP-A в процессе пренатального скрининга первого триместра. Также провели сравнительный анализ их количества в обеих группах: у женщин, беременность которых наступила спонтанно и у женщин, беременность которых наступила в следствие ЭКО.

4.2 Оценка сывороточных белков

β -ХГЧ является одним из биохимических маркеров, используемых в скрининговом тесте первого триместра. Высокие уровни β -ХГЧ в первом триместре связаны с риском синдрома Дауна, тогда как его повышенные уровни во втором триместре в большей степени связаны с плохими акушерскими исходами (144). Кроме того, уровень свободного β -ХГЧ изменяется по мере прогрессирования беременности и в каждый момент измерения строго зависит от гестационного возраста. Поскольку β -ХГЧ имеет плацентарное происхождение, ожидаемо плацента вырабатывает большее количество β -ХГЧ при многоплодии, чем при одноплодной беременности (145) (146) (147) (148). Однако, при интерпретации результатов необходимо дифференцировать монохориальные и дихориальные двойни, поскольку уровни биохимических маркеров обычно ниже

при монохориальных, чем при дихориальных беременностях (149). В нашем исследовании нам не удалось обнаружить статистически значимых различий между уровнем свободного β -ХГЧ при монохориальных и дихориальных двойнях (76,04 МЕ/мл [56,70; 99,15] и 68,78 МЕ/мл [49,95; 112,18], соответственно, $p=0,541$). Это может быть связано с недостаточной выборкой, оцениваемой в данном исследовании.

В ряде исследований изучалось возможное влияние ЭКО на результаты биохимического скрининга в первом триместре и исходы беременности. Однако данные о влиянии вида беременности (спонтанная или наступившая в результате ЭКО) на уровень β -ХГЧ в сыворотке крови остаются противоречивыми. Эти различия приписывают неодинаковым размерам выборки, гетерогенности исследуемых популяций и различиям в уровне β -ХГЧ в разные недели беременности (129) (150). В нашей работе, как и в ряде работ других исследователей было обнаружено, что пациентки, беременность которых наступила в результате ЭКО, имеют более высокий уровень свободного β -ХГЧ, чем пациентки со спонтанно наступившей многоплодной беременностью (127) (150) (151) (152) (153). Вместе с тем, данное различие не было статистически значимым, а именно уровень свободного β -ХГЧ в группе спонтанных беременностей составил 68,37 МЕ/мл [49,00; 95,26], а в группе беременностей, наступивших в результате ЭКО – 69,51 МЕ/мл [54,15; 118,60], ($p=0,429$).

Исследуя уровни рассчитываемого показателя β – ХГЧ МоМ мы обнаружили, что нормальный уровень этого показателя (соответствующий референсным значениям (0,5-2,0) был у 235 женщин (77,81%), уровень ниже референсных значений – у 36 пациенток (11,92%), выше референсных значений – у 31 пациенток (10,26%).

Согласно проведенным исследованиям, при беременностях двойнями, наступивших в результате ЭКО, показатели β -ХГЧ МоМ оказываются выше (в среднем 2,20 МоМ), чем у двоен из беременностей, наступивших спонтанно (1,83 МоМ) (154) (155) (156) (157). В нашей работе β -ХГЧ МоМ в группе СБ составил

0,95 [0,70;1,27], а в группе ЭКО – 0,94 [0,62;1,50] ($p=0,961$). Наши результаты показывают аналогичные данные, что и в исследовании Plat et al (158).

В другом исследовании медиана концентрация свободного ХГЧ была аналогична нашим результатам (1,00 по сравнению с 1,01). Авторы пришли к выводу, что нет никаких статистически значимых различий между уровнями свободного ХГЧ между монохориальными и дихориальными двойнями (158).

Во время проведения скрининга у беременных дихориальной двойней следует учитывать более высокие уровни β -ХГЧ при беременности, наступившей в результате ЭКО, чтобы избежать высокого уровня ложноположительных результатов (148).

Интересно, что в подгруппе показателя β – ХГЧ МоМ ниже референсных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 27,72 % (10/36), в группе β – ХГЧ МоМ в пределах референсных значений – 8,93 % (21/235), в группе β – ХГЧ МоМ выше референсных значений – 9,67 % (3/31), соответственно. Различия между подгруппами с показателем β – ХГЧ МоМ $< 0,5$ и подгруппой с показателем β – ХГЧ МоМ 0,5-2,0 оказались статистически значимы ($\chi^2= 11.940$; $p<0,001$); β По данным других исследований их авторы отмечают, что медиана уровня свободного β -ХГЧ не меняется при «исчезающем близнеце» и/или гибели одного из плодов в отличие от медианы уровня РАРР-А, который значительно увеличивается (159).

РАРР-А – высокомолекулярный гликопротеин, уровень которого постоянно увеличивается во время беременности и снижается в течение 3 суток после рождения ребенка. Он синтезируется в цитотрофобласте и в децидуальной ткани. Данный белок определяется и вне беременности, но в меньших количествах. Его основной функцией при беременности является регуляция и стимуляция клеточного роста (160).

Нормальный уровень РАРР-А во время беременности говорит о адекватной имплантации и течении беременности с минимальными рисками неблагоприятных исходов.

В случае хромосомной аномалии уровень данного белка определяется ниже референтных значений.

Так как наибольшая чувствительность анализа данных маркеров отмечается в 10-11 недель, рекомендуется разделять пренатальный скрининг и сначала проводить биохимический тест, а затем – УЗ-сканирование. Низкие уровни данных биохимических маркеров определяются не только при синдромах Эдвардса, Патау и Дауна, но и при беременностях, которые в процессе развития осложняются преэклампсией, фето-плацентарной недостаточностью, угрозой преждевременных родов, задержкой развития плода (161).

Влиянию ВРТ на уровень PAPP-A посвящен ряд исследований, при этом большинство из них сообщили о более низких значениях PAPP-A при беременности как при ЭКО, так и при ИКСИ (162) (152) (163). Это приводит к повышенному числу ложноположительных результатов при выполнении комбинированного скрининга у беременных после ЭКО. Поскольку PAPP-A - белок, синтезируемый плацентой, логично ожидать его снижение при заболеваниях, затрагивающих дифференцировку клеток синцитиотрофобласта, например синдром Дауна. Однако, учитывая, что беременность, наступающая в результате ЭКО, не повышает частоту возникновения трисомии 21, должны существовать некоторые другие механизмы, которые могли бы дать правдоподобное объяснение феномену пониженного уровня PAPP-A и более высокому уровню ложноположительных результатов скрининга в первом триместре при этих беременностях. На сегодняшний день выдвинуто несколько гипотез для объяснения данного явления. Tul и Novak-Antolic продемонстрировали, что существует обратная связь между количеством аспирированных ооцитов и значениями PAPP-A МоМ, и что уровень ингибина А, продуцируемого желтым телом, прямо пропорционален увеличению количества полученных ооцитов (152). Основываясь на этих результатах, исследователи выдвинули гипотезу, что стимуляция яичников была связана с генерацией множественных желтых тел и более высоким уровнем эндогенного уровня ингибина А, который, в свою очередь, ингибирует секрецию PAPP-A. В

настоящее время это предположение неспособно объяснить выводы других исследователей, демонстрирующих нормальные уровни PAPP-A при беременности, наступившей в результате ЭКО по сравнению со спонтанно наступившей беременностью (163) (157) (155) (153). Кроме того, более низкие уровни PAPP-A были также зарегистрированы при беременности, наступившей в результате ЭКО после циклов с переносом размороженных эмбрионов, в которых яичники не стимулировались, и, следовательно, не было множества желтых тел или повышенных уровней ингибина-A в сыворотке крови.

Пониженные уровни PAPP-A не являются специфичными для трисомий, поскольку он также определяется при эуплоидных беременностях, сопровождающихся изменениями в плаценте, преэклампсией и задержкой роста плода (164). На основании этих наблюдений любопытной оказывается гипотеза о том, могут ли более низкие уровни PAPP-A свидетельствовать о дефектной имплантации при беременностях после ЭКО. В настоящее время нет достаточных доказательств, подтверждающих это утверждение, но известно, что беременность при ЭКО более склонна к развитию неблагоприятных акушерских исходов, чем спонтанная беременность. Таким образом, возникает вопрос, могут ли более низкие уровни PAPP-A при этих беременностях предполагать неблагоприятные акушерские исходы? Результаты проведенных исследований противоречивы. Наши результаты предполагают ассоциацию низких значений PAPP-A и неблагоприятных исходов. Так, среди пациенток, чей показатель PAPP-A МоМ был ниже нижней границы референтного интервала ($<0,5$), 52,94% (9/17) беременностей наступили в результате ЭКО, а антенатальная гибель встречалась в 35,29% случаев (6/17). Эти данные согласуются с другими исследованиями, в которых большинство многоплодных беременностей были связаны с ВРТ и в которых также отмечались низкие уровни PAPP-A МоМ. Авторы также предлагают использовать биохимический скрининг первого триместра для прогнозирования неблагоприятного развития плаценты и связанных с этим акушерских осложнений (165) (166). Напротив, в других исследованиях сообщалось о более низких уровнях PAPP-A даже при неосложненной

беременности после ЭКО и в отсутствие акушерских осложнений (154) (151). Недавнее исследование, в котором сравнивались объемы трофобласта и сосудистого плацентарного русла в первом триместре между беременностью, наступившей в результате ЭКО и спонтанной одноплодной беременностью, не продемонстрировало различий (167).

Таким образом, в совокупности эти данные свидетельствуют о том, что беременность после ЭКО, вероятно, отличается от спонтанной беременности, и что сама процедура ЭКО может влиять на процесс имплантации, приводя к более низким уровням PAPP-A. Важно отметить, что последние не всегда связаны с клинически установленными аномальными исходами беременности.

4.3 Оценка срока родоразрешения

Срок родоразрешения в группах не различался ($p=0,373$), в среднем беременность продолжалась 37 1/7 [34; 38 5/7] недель в контрольной группе и 37 [33; 38 6/7] недель в основной группе.

Вместе с тем в группе монохориальных двоен беременность продолжалась 36 [32; 38] недель, а в группе дихориальных двоен – 37 5/7 [34; 39] недель. Разница при этом была статистически значимой ($p=0,024$).

Родоразрешение путем кесарева сечения в группе СБ имело место в 58,06% случаев, а в группе ЭКО – в 62,96% случаев, соответственно ($\chi^2=0,562$, $p = 0,454$).

По сравнению со спонтанным многоплодием, беременность двойней после оплодотворения *in vitro* с большей вероятностью будет родоразрешена путем кесарева сечения и будет иметь более высокую частоту преждевременных родов, а также связанных с недоношенностью респираторных осложнений (168) (169). Согласно существующим клиническим рекомендациям дихориальная неосложненная двойня родоразрешается на сроке 37-38 недель гестации, монохориальная неосложненная - 36-37 недель гестации. На практике наблюдается совсем другая картина, а именно до 58% двоен рождаются до 37 недели беременности (170). Одновременно существуют доказательства как

увеличения перинатальной смертности после 38 недель гестации, так и отсутствие различий при родоразрешении до 37 недель, вне зависимости от способа родоразрешения или связи с осложнениями со стороны матери. Тем не менее, ретроспективное исследование родов в группе многоплодных беременностей, проведенное в 2013 году, предложило альтернативную точку зрения (171). Оно представляло собой большое проспективное рандомизированное контролируемое исследование, направленное на сравнение планового кесарева сечения с плановыми естественными родами. Роды проходили в период 32-38 недель, при головном предлежании. Оказалось, что при плановом кесаревом сечении риск гибели новорожденного не снижается, как и не снижается заболеваемость новорожденных по сравнению с естественными родами. Для второго плода был более высокий риск неблагоприятных перинатальных исходов (127), но он не снижался при выполнении планового кесарева сечения. Текущая практика поддерживает политику запланированных вагинальных родов при неосложненной многоплодной беременности при головном предлежании первого плода. Вместе с тем, оправданным считается подход, при котором такие роды проводятся в условиях, в которых доступен непрерывный кардио-токографический мониторинг сердечной деятельности плода и есть условия для проведения экстренного кесарева сечения. Опытный специалист КТГ-мониторинга должен присутствовать при родах, в особенности, в случае тазового предлежания второго плода. В целом при многоплодной беременности существует более высокий риск выполнения экстренного кесарева сечения для срочного родоразрешения второго плода после рождения первого через естественного родовые пути. В монохориальных двойнях практика вагинальных родов осложняется возможным присутствием фето-фетального трансфузионного синдрома (развивающегося в 10% случаев). Более того, в настоящее время нет ни одного национального руководства, которое бы рекомендовало естественные роды вместо кесарева сечения в этой группе (172). Другие исследования также подтверждают высокие показатели оперативного родоразрешения при многоплодных беременностях. При многоплодных беременностях, наступивших в результате ЭКО, этот показатель оказывается еще

выше, что связано как с большим количеством осложнений в течении беременности, так и с отягощенным анамнезом будущей матери (168).

4.3.1 Оценка количества преждевременных родов

Частота преждевременных родов [22-34 недели] была сопоставима между пациентками группы ЭКО – 21/115 (18,26%), и группы СБ – 44/187 (23,52%)($\chi^2=1.170$, $p=0,280$).

В целом преждевременные роды (<34 недель) в нашем исследовании наступили у 65 женщин (21,5%) из 302; частота преждевременных родов в группе ЭКО составила 21 случай (18,26%), что ниже, чем в группе СБ - 44 случая (23,52%). Из них на долю монохориальных беременностей пришлось 18 преждевременных родов из 53 монохориальных беременностей (33,96%), а на долю дихориальных - 47 преждевременных родов из 249 дихориальных беременностей (18,87%) ($\chi^2=5,889$, $p=0,016$).

В подгруппе PAPP-A МоМ ниже референсных значений (<0,5) одна беременность из 17 (7,14%) прервалась на сроке 10 недель. Остальные беременности завершились родами позже 36-й недели.

В подгруппе с показателем PAPP-A МоМ выше референсных значений (>2) роды до 34 недель имели место у 11 женщин из 36 (30,55%).з них при беременностях, наступивших в результате ЭКО – у 6 из 11 (54,54%); при спонтанных беременностях у 5 из 11 (45,45%). В 9 случаях из 11 (81,81%) это были дихориальные двойни; в 2-х случаях из 11 (18,18%) – монохориальные двойни. Полученные результаты демонстрируют необходимость более масштабных исследований в данном направлении.

Наше исследование выявило тенденцию к ассоциации между показателями PAPP-A МоМ ниже референсных значений (<0,5) и повышенным риском преждевременных родов. Вместе с тем, для более детального изучения ассоциации также необходимо большее количество пациентов.

Выявление беременностей с риском преждевременных родов может оказаться полезным в выборе тактики ведения таких женщин. Этот подход может фактически продлить беременность и улучшить исходы.

Средний вес плодов значимо не различался между группой СБ и группой ЭКО ($p = 0,956$ и $p = 0,854$ для первого и второго плода соответственно). При этом средний вес плодов отличался в группах, сформированных на основе хориальности. Медиана веса первого и второго плодов в группе монохориальных двоен составила 2285 г [1482,50; 2762,50] и 2300 г [1475,00; 2600,00], в группе дихориальных двоен – 2535 г [2100,00; 2950,00] и 2500 г [2000,00; 2904,00] для каждого из плодов ($p = 0,013$ и $p = 0,008$ соответственно).

Частота встречаемости двойни различается в зависимости от страны и составляет от 2% до 3% новорожденных (173). Вместе с тем на их долю приходится от 10 до 15% неблагоприятных неонатальных исходов (174). Преждевременные роды (<37 недель беременности), низкая масса тела при рождении (<2500 г) и экстремально низкий вес при рождении (<1500 г) чаще встречаются среди двоен, чем среди одноплодных беременностей (175). Также многоплодие ассоциировано с повышением уровня смертности, заболеваемости, и долгосрочной нетрудоспособности (176). Очевидно, что в группе многоплодия для снижения смертности и заболеваемости, связанных с преждевременными родами и экстремально низким весом при рождении, необходим отличный от стандартного для одноплодной беременности подход как к антенатальному ведению, так и к родоразрешению. Несомненно то, что многоплодные беременности отличаются от одноплодных, как по темпу роста, так и по сроку родов. Оптимальный вес плодов при рождении при многоплодной беременности также может быть ниже в сравнении с одноплодной. То же самое справедливо и для срока родов, который в норме наступает раньше, чем при одноплодной беременности. Minakami и Sato (49) предположили, что оптимальным сроком родов для многоплодных беременностей является срок 37-38 недель гестации, а не 40 недель, как при одноплодной беременности. Ими был проведен сравнительный анализ двоен и одноплодных беременностей в Японии в период с

1983 по 1993 гг. Антенатальная и ранняя неонатальная смертность наблюдалась значительно реже в сроках 37-38 недель. Анализ беременностей в США в период с 1989-1991 гг. показал схожие результаты, где показатели перинатальной смертности для одноплодных беременностей были ниже в 40 недель, а для двоен - в 38 недель (177). Следует отметить исследование, в рамках которого авторы стремились определить срок гестации при рождении, который ассоциировался с наименьшим уровнем перинатальной смертности, минимальной частотой респираторного дистресс-синдрома (РДС) и самыми низкими показателями длительности пребывания в родильном доме (178). В этой работе исследователи рассматривали в качестве положительного исхода благополучие обоих плодов, а не одного. Подход, используемый большинством других исследователей при расчете уровня смертности для одного плода из двойни, не позволяет оценить риск для обоих плодов из двойни. Предположим, что 20 неонатальных смертей приходится на 1000 новорожденных детей из двоен. Если 20 погибших приходится на 10 пар близнецов, в которых умирают оба ребенка, тогда коэффициент неонатальной смертности составляет 20/1000 новорожденных или 10/500 пар близнецов. Если 20 смертей приходится на 20 пар близнецов и если погибает 1 из пары, то коэффициент неонатальной смертности оставляет 20/1000 или 20/500 пар близнецов. Только парная оценка (оценка для обоих плодов) показывает, что риски для двоен значительно выше (178). Пролонгирование беременности с двойней позже 37 недель нецелесообразно, по их мнению, так как такое может стать потенциально опасным и увеличить риски неонатальной смертности и заболеваемости. Также, в исследовании авторы не обнаружили статистически значимых различий между результатами родов в 37, 38 и 39 недель беременности, однако при сравнении результатов показателей перинатальной смертности, заболевания, РДС и длительности пребывания в стационаре выявили, что результаты были несколько лучше на 38 неделе беременности, чем в 37 недель и хуже на сроке 39 недель, чем на 38 неделе. Таким образом, консервативный подход приемлем на сроке от 37-38 недель гестации. Авторы сделали вывод, что пролонгирование многоплодной беременности не должно

превышать срок 39 недель из-за описанных рисков. Менее известен факт, свидетельствующий о том, что риск антенатальной гибели в двойне выше, чем при одноплодной беременности в сроке ≥ 36 недель беременности. Авторы продемонстрировали, что для детей от одноплодных беременностей, родившихся на сроке ≥ 36 недель беременности, перинатальная смертность составила 3,6 случая на 1000 новорожденных, а неонатальные потери при многоплодных беременностях составили 10,7 смертей / 1000 новорожденных, что примерно в 3 раза выше (177). Однако в другом исследовании показано, что $>90\%$ потерь при беременности среди двоен при сроке ≥ 36 недель беременности приходится на потерю только одного плода из двойни, а это означает, что уровень перинатальной смертности в паре для двойни примерно в 1,8 раза выше, чем при одноплодной беременности. Если мы предположим, что 90% потерь из двойни на сроке ≥ 36 недель беременности в Соединенных Штатах сопряжены потерей одного из пары близнецов, тогда мы можем оценить перинатальную смертность как 19,3 потерь/1000 пар. Таким образом матери, родившие детей на сроке беременности ≥ 36 недель встречаются с пятикратным риском неблагоприятного исхода беременности (антенатальной или неонатальной смерти одного или обоих детей), в сравнении с матерями родившими детей из одноплодных беременностей на сроках ≥ 36 недель беременности. Авторы призывают врачей учитывать этот повышенный риск и рекомендует родоразрешение на сроке от 37 до 38 недели беременности, указывая этот период в качестве наилучшего срока для разрешения многоплодной беременности. Другие исследования также подтверждают, что оптимальный момент для родов детей из многоплодной беременности наступает раньше, чем в одноплодной беременности (179) (180) (177) (181) (182).

Многоплодие несет в себе большое количество рисков неблагоприятных исходов беременности и хориальность является важным аспектом в прогнозе как родоразрешения, так и возможных осложнений в течение гестационного периода. В последнее время для точного определения хориальности пользуются данными первого пренатального скрининга. А антенатальное обследование в последующем отталкивается от типа хориальности. Также необходимо отметить, что уникальная

плацентация, присущая монохориальному многоплодию, имеет ряд связанных с этим состояний и осложнений. А именно состояние, связанное с развитием фето-фетального трансфузионного синдрома, значительно сказывается на продолжительности срока гестации. Так, прогрессирующее многоводие вследствие декомпенсации гемодинамики между плодами приводит к напряжению в амниотической полости плода реципиента и, как следствие, укорочению шейки матки, разрыву плодных оболочек, преждевременному излитию околоплодных вод. Критическое изменение в гемодинамике плодов, связанное как с фето-фетальным трансфузионным синдромом, синдромом селективной внутриутробной задержки, синдромом анемии-полицитемии, а также синдромом обратной артериальной перфузии, требует немедленного родоразрешения и, в подавляющем большинстве, происходит до достижения доношенного срока.

По данным исследований родоразрешение через естественные родовые пути связано с большим риском для второго плода. При монохориальной диамниотической беременности, осложненной селективной внутриутробной задержкой роста, кесарево сечение представляется приемлемым способом родоразрешения (183).

В другом исследовании (2008-2015 год) авторы также оценили частоту случаев гибели плода при монохориальном многоплодии в 4,7%. Медиана родов была позже при дихориальной двойне ($34,16 \pm 4,65$), чем при монохориальной двойне ($31,1 \pm 3,83$). Роды до 34-й недели беременности наступали в 71,4% при монохориальной и в 35% при дихориальной беременности двойнями, соответственно. Монохориальная беременность имела в 13 раз выше риск родов до 37-й недели и в 4 раза выше риск родов до 34-й недели по сравнению с дихориальной. Кроме того, в монохориальных двойнях риск отслойки плаценты был в 7 раз выше, чем у дихориальных. Показатели госпитализации новорожденных в отделения интенсивной терапии составили 61,3% в дихориальных и 85,7% в монохориальных двойнях. Кроме того, монохориальные двойни имели в 3,7 раза больший риск поступления в отделение интенсивной

терапии новорожденных по сравнению с дихориальными двойнями. Авторы рекомендуют наблюдение за беременностью с гибелью одного из плодов вне зависимости от хориальности. Кроме того, тщательный мониторинг рекомендуется для монохориальных беременностей с гибелью одного из плодов с точки зрения преждевременных родов до 34 недель беременности, отслойки плаценты, необходимости интенсивной терапии новорожденных и респираторного дистресс-синдрома (184).

В исследовании сроков родоразрешения и зависимости от хориальности, в котором были анализированы только неосложненные двойни, срок родоразрешения был несколько выше (достигая 38 недель), а неонатальная заболеваемость была относительно невысокой. Важно, что неонатальные исходы зависели не только от гестационного срока, но и от хориальности. Оптимальное время для родов следует рассматривать по-разному и в зависимости от вида многоплодия (монохориальных и дихориальных двоен), принимая во внимание тот факт, что монохориальность связана с увеличением неблагоприятных перинатальных исходов по сравнению с дихориальностью (185). В Руководстве Национального института здравоохранения Соединенного Королевства 2011 года по ведению многоплодных беременностей предложено родоразрешение неосложненных монохориальных двоен в срок 36 недель и 0 дней, а неосложненных дихориальных двоен – в 37 недель и 0 дней (186). Существует еще одна рекомендация Национального института детского здоровья и развития человека и Общества по охране плода, которая гласит, что приемлемыми являются сроки родоразрешения в период от 34 до 37 недель беременности для монохориальных близнецов и на 38 неделе беременности для дихориальных близнецов. Робинсон и соавт. (187) разработали аналитическую модель для сравнения различных сроков родов у неосложненного монохорионического диамниотического многоплодия и продемонстрировали, что родоразрешение между 36 и 38 неделями беременности является предпочтительным. Большинство экспертов считают, что разумно рассмотреть возможность родоразрешения

неосложненных дихориальных близнецов после 37 или 38 недель беременности, но не позднее 39 недель беременности.

Исследования показывают, что медиана срока родов незначительно различалась и роды наступали раньше при монохориальных беременностях (36 недель) по сравнению с дихориальными беременностями (37 недель). Тем не менее, родивших очень недоношенных (менее 32 недель), в 2 раза больше при монохориальных беременностях (9,2%) чем при дихориальных (5,5%). Эти данные показывают, что при монохориальных беременностях значительно выше риск не только невынашивания, но двукратно увеличен риск очень преждевременных родов (188).

Многоплодная беременность в целом подвержена высокому риску спонтанных или ятрогенных преждевременных родов. Частота преждевременных родов до 37 недель может достигать 50%. Частота родов в срок до 32 недель варьирует в зависимости от типа многоплодия, составляя 5% при дихориальных двойнях и 10% для монохориальных близнецов, по сравнению с 1% при одноплодной беременности (172).

Авторы одного из исследований обнаружили, что концентрация свободного β -ХГЧ в первом триместре ≤ 25 -го перцентиля была связана со значительно риском спонтанных преждевременных родов среди двоен при сроке беременности менее 32 недель (189). Таким образом, свободный β -ХГЧ явился более ранним предиктором преждевременных родов, чем укорочение длины шейки матки (190). Однако, β -ХГЧ в первом триместре ≤ 25 -го перцентиля не был связан с преждевременными родами в период между 32 и 37 неделями беременности. Концентрация PAPP-A в первом триместре ≤ 25 -го перцентиля была связана с почти трехкратным увеличением риска преждевременных родов при сроке беременности менее 32 недель, хотя эта связь не была значительной. Не было никаких признаков связи между концентрацией PAPP-A ≤ 25 -го перцентиля и преждевременными родами между 32 и 37 неделями беременности.

Биологический механизм, с помощью которого данные сывороточные белки выступают маркерами преждевременных родов, может быть обусловлен их ролью

в плаценте. ХГЧ имеет множественные взаимодействия на границе между плацентой и децидуальной оболочкой, кроме того было показано, что он участвует в сокращении миометрия матки (191). PAPPA-A является протеазой, которая контролирует активность инсулиноподобного фактора роста (ИПФР) (192). ИПФР, в свою очередь, влияет на инвазию трофобласта в децидуальную оболочку (193). ИПФР также участвуют в регуляции роста плода (194).

Тем не менее, данные результаты отличаются от результатов исследований при одноплодных беременностях. Уровень свободного β -ХГЧ был связан с потерей беременности на сроке ≤ 24 недель в исследовании FASTER (195), но не был связан с преждевременными родами в других исследованиях (196) (197) (198) (199). Стоит отметить, что авторы указывают на то, что их выводы относительно связи между β -ХГЧ и очень ранними преждевременными родами могут отличаться от таковых при одноплодной беременности из-за небольшого числа включенных в исследование. Связь между PAPPA-A и преждевременными родами при одноплодной беременности была неоднозначной, при этом некоторые исследования обнаружили сильную связь (195) (198) (200), а другие исследования, напротив, не обнаружили никакой связи (196) (197).

Наше исследование выявило тенденцию к ассоциации между показателем PAPPA-A MoM $<0,5$ и повышенным риском преждевременных родов. Тем не менее, также возможно, что биохимические маркеры первого триместра могут иметь различную связь с преждевременными родами при многоплодных беременностях по сравнению с одноплодными беременностями, потому что преждевременные роды могут быть обусловлены различными патофизиологическими механизмами при беременности двойней. Считается, что повышенный риск преждевременных родов у двоен, по крайней мере отчасти, обусловлен реакцией миометрия на растяжение матки (201). Доказательства, подтверждающие эту гипотезу, включают тот факт, что профилактика преждевременных родов с помощью 17-гидроксипрогестерона эффективна у одноплодной беременности, но не имеет преимуществ в профилактике преждевременных родов у неосложненных двоен (202). Тем не менее, в одном из

исследований было показано, что как при одноплодной, так и при многоплодной беременности, протекающими с высоким риском преждевременных родов с укороченной шейкой матки ($<1,5$ см), лечение вагинальными суппозиториями прогестерона привело к предотвращению преждевременных родов на сроке <34 недель (203). Однако более позднее хорошо спланированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием женщин с кровотечением на ранних сроках беременности показало, что эффективность лечения вагинальными суппозиториями с микронизированным прогестероном в отношении количества родов живым плодом не отличается от плацебо (204). В нашем исследовании показатель β -ХГЧ в первом триместре $<0,5$ МоМ был связан с риском очень преждевременных родов (менее 32 недель беременности). Выявление беременностей с риском преждевременных родов, может помочь в ведении беременности, в частности, при определении необходимости более раннего вмешательства. Этот подход может фактически улучшить исходы беременности.

4.4 Оценка веса плодов

Средний вес плодов значимо не различался между группами СБ и ЭКО ($p = 0,956$ и $p = 0,854$ для первого и второго плода соответственно). При этом вес плодов отличался в группах, сформированных на основе хориальности. Медиана веса плодов в группе монохориальных двоен составила 2285 г [1482,50;2762,50] и 2300 г [1475,00;2600,00], в группе дихориальных двоен – 2535 г [2100,00; 2950,00] и 2500 г [2000,00; 2904,00] для каждого из плодов ($p = 0,013$ и $p = 0,008$ соответственно).

Полученные нами данные вполне согласуются с мировым опытом, поскольку хорошо известно, что новорожденные из монохориальных двоен в среднем имеют меньший вес, чем из дихориальных. Так, недавнее исследование продемонстрировало, что при сравнении многоплодных беременностей (спонтанных и после применения ВРТ), неблагоприятные исходы связывали с хориальностью, а не с видом наступления беременности (168).

Кроме того, в целом монохориальные беременности после ВРТ имеют худшие акушерские результаты по сравнению с дихориальными беременностями. Поэтому для монохориальных беременностей после ВРТ наблюдение в перинатальном центре (стационаре третьего уровня обеспечивающем помощь в течение беременности и родов пациентам высокого перинатального и акушерского риска) должно быть приоритетным, поскольку увеличивает шансы на достижение благоприятных исходов (205). Известно, что многоплодная беременность подвержена значительно большему риску внутриутробной задержки роста плода, и это частично связано с увеличением риска плацентарной дисфункции, причем показатели варьируют от 20% в дихориальных до 30% в монохориальных двойнях. Две трети антенатальных потерь при многоплодной беременности связано с низким весом при рождении ниже десятого перцентиля. Важно следовать существующим практическим рекомендациям, которые предлагают динамическое ультразвуковое исследование с доплерографией сосудов (пупочная артерия, средне-мозговая артерия (СМА) венозный проток), оценка ширины задних рогов боковых желудочков (ликвородинамика) начиная со срока 20 недель для дихориальной неосложненной двойни каждые 4 недели и каждые 2 недели для монохориальной неосложненной двойни. При отклонениях рекомендуется проводить более частые исследования. Тем не менее оптимальной тактики ведения для двоен сроком более 32 недель гестации так и не было определено. Раннее родоразрешение - это всегда баланс между риском недоношенности и риском воздействия длительной гипоксии (172).

Низкий уровень сывороточного PAPP-A указывает на нарушение плацентаии. Существующая гипотеза предполагает, что низкий PAPP-A может отражать недостаточную функцию плаценты, поскольку биохимически PAPP-A выступает в качестве протеазы белка ИПФ-4, связывающего инсулиноподобный фактор роста (ИПФ), продуцируемый децидуальной и трофобластической оболочкой. Считается, что важное значение играет локальная биодоступность

инсулиноподобного фактора роста II (ИПФII), который важен для инвазии трофобласта и роста плода (206).

4.5 Оценка антенатальной гибели в двойне

С увеличением использования ультразвукового исследования во время беременности многоплодные беременности стали диагностироваться раньше и чаще. По некоторым оценкам, только 50% многоплодных беременностей, выявленных в первом триместре, заканчиваются родами двух живых детей. Антенатальные потери, как правило, происходят в течении первого триместра беременности. Нередко это происходит в отсутствие клинических проявлений. В отношении прогноза для выжившего плода, наиболее благоприятным для него является, если антенатальная гибель второго плода произошла на ранних сроках гестации. Исключая ранние потери, потеря одного плода из двойни происходит в 2-5% случаях (127) (180). Частота антенатальной гибели второго плода различается в зависимости от типа хориальности, и составит 4 % при дихориальном многоплодии, достигая 12% при монохориальном многоплодии (188). Для беременностей более высокого порядка это число значительно выше, и для тройни составляет от 14 до 17% (207). Монохориальные моноамниотические двойни имеют более высокий риск перинатальной смертности из-за врожденных пороков и осложнений, связанных с коллизией пуповин, что приводит к 15% смертности после 20 недель беременности (208) (209). Хотя перинатальная смертность резко снизилась в последние два десятилетия по сравнению с чрезвычайно высокими показателями прошлого (до 70% в этой группе), риск остается относительно высоким, несмотря на улучшения в качестве ведения таких женщин в течении беременности (210). Клиническая тактика при ведении многоплодных беременностей главным образом зависит от гестационного срока, степени зрелости легких и выявленных осложнений со стороны матери и плода. Одна из главных проблем, возникающая при гибели одного из плодов во второй половине беременности, связана с более высоким уровнем заболеваемости и смертности для выжившего плода (127). В ретроспективном анализе

многоплодных беременностей, осложненных внутриутробной гибелью одного из плодов, Enbom обнаружил, что уровень смертности и серьезных нарушений развития достигает 46% среди выживших близнецов (211). Rydhstrom и Ingemarsson сообщили о 27% перинатальной смертности выжившего близнеца после антенатальной смерти одного из плодов (212). В этом ретроспективном исследовании 4,6% выживших близнецов имели неврологический дефицит или детский церебральный паралич в возрасте 8 или более лет. В проспективных исследованиях неврологические повреждения регистрируются у 5–19% выживших детей из двойни (172). Риск возникновения осложнений со стороны нервной системы значительно выше в группе монохориального многоплодия в сравнении с дихориальным и составляет от 12% до 25% при монохориальной плацентации и 1% при дихориальной (213). Чаще всего из неврологических заболеваний в таких случаях встречаются некроз мозжечка, гидранэнцефалия, гидроцефалия, геморрагический инфаркт, микроцефалия, мультикистоз, энцефаломалиция, порэнцефалия и квадриплегия. Чаще всего случаи неврологических повреждений у выживших плодов связаны с гибелью второго плода в третьем триместре. Механизм травматизации выжившего плода в монохориальной двойне чаще всего связывают с особенностями плацентации и, как следствие, спецификой гемодинамики. Потенциальный патофизиологический механизм состоит в активации тканевого тромбопластина и последующей эмболизации плацентарных анастомозов. Другие возможные механизмы возникновения неврологического повреждения включают гипотонию и гипоксемию плода вследствие «обескровливания» - оттока крови в атонические расширенные сосуды погибшего плода. К сожалению, немедленное родоразрешение выжившего ребенка не исключает развития мультикистозной энцефаломалиции. При дихориальной плацентации риски развития неврологического дефицита значительно реже (не превышают 1%) и в большей степени связаны с недоношенностью, так как преждевременное родоразрешение в группе многоплодия занимает от 50-80%. (214) (215) (216)

По данным Ferriman et al. антенатальная гибель одного из двойни несет в себе повышенный риск для оставшегося плода, который выше при монохориальной беременности. Выживший близнец имеет риск гибели в 15%, и развития неврологических осложнений в 26% случаев, преждевременных родов – до 68%. При дихориальных беременностях автор отмечает показатель риска гибели до 1%, неврологические осложнения развиваются в 4% случаев, преждевременные роды имеют место в менее чем в 50%, соответственно. Эта значительная разница в риске была приписана существенным гемодинамическим сдвигам в общей плаценте после смерти одного плода из монохориальной пары близнецов. Автор рекомендует при консультировании пациентов с двойней тщательно информировать относительно прогноза и риска развития осложнений в данной группе, а при монохориальных беременностях рекомендует проводить МРТ головного мозга выжившего плода при антенатальной гибели одного из близнецов (172).

Среди 17 (5,62%) пациенток, чей показатель PAP-A МоМ был ниже нижней границы референтного интервала ($<0,5$) у 9 (52,94%) беременность наступила в результате ЭКО, а у 8 (47,05%) – при спонтанном зачатии.

Показатель PAP-A МоМ превышал верхнюю границу референсных значений ($>2,0$) у 36 пациенток (11,92%). У 30 пациенток из 36 (83,33%) имели место дихориальные двойни, у 6 (16,7%) – монохориальные. У 19 женщин из 36 (52,7%) беременность наступила в результате ЭКО, а антенатальная гибель плода имела место у 6 (31,57%) из числа дихориальных двоен; и у 2 (11,7%) – из числа монохориальных двоен.

В подгруппе показателя PAP-A МоМ ниже референсных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 35,29 % (6 женщин из 17) в группе с показателем PAP-A МоМ, соответствующем референсным значениям – с частотой 11,24 % (28 женщин из 249), а в группе с показателем PAP-A МоМ, превышающим нормальные значения – 22,22% (8 женщин из 36). Различия между подгруппой с показателем PAP-A МоМ $< 0,5$ и подгруппой с показателем PAP-A МоМ 0,5-2,0 оказались статистически значимы ($\chi^2=8,256$; $p=0,005$). Таким

образом, в нашем исследовании пациентки, имеющие низкий показатель PAPP-A MoM в первом триместре, имели достоверно более высокий риск антенатальной гибели плода.

Также, как и в нашем исследовании, другие работы выделяют значение низкого PAPP-A MoM при многоплодной беременности, демонстрируя при этом в среднем в два раза более высокий риск развития преэклампсии, маловесного к сроку плода и антенатальных потерь. При этом отмечается важность изучения уровня данных белков в ходе первого пренатального скрининга на анеуплоидии в регламентированные сроки 11-13 нед. 6 дн. Результаты другого исследования, в рамках которого данные измерения проводились при сроках 8-12 недель гестации, также совпадают с нашими данными. Эти результаты подтверждают положение о том, что плохая плацентарная перфузия является одной из вероятных причин возникновения в следствии этого неблагоприятных исходов (217) (218).

Одни авторы выделяют более низкий уровень PAPP-A при беременностях двойнями, наступивших в результате ВРТ, чем в спонтанных беременностях (219) (220) (153). Другие, напротив, не обнаружили какого-либо влияния ВРТ на уровень PAPP-A (156) (221) (157) (155). Снижение уровня PAPP-A у беременных после ЭКО является еще одним доказательством того, что беременность, наступившая в результате ЭКО, отличается от спонтанных беременностей и это наблюдение может иметь более широкую практическую значимость, выходящую за рамки комбинированного скрининга, направленного на выявление групп риска по анеуплоидиям. PAPP-A увеличивает биодоступность инсулиноподобных факторов роста (ИПФ) (222). PAPP-A присутствует в низких концентрациях в крови мужчин и небеременных женщин, но обнаруживается в высоких концентрациях в крови беременных женщин (223), причем его уровень в крови повышается вскоре после имплантации и увеличивается в течение беременности, достигая пика в третьем триместре (224).

Также известно, что низкие уровни PAPP-A в сыворотке крови связаны с неблагоприятными осложнениями беременности (гипертония, преэклампсия,

гестационный диабет и антенатальная гибель) и неблагоприятными перинатальными исходами (недоношенность, низкая масса тела при рождении и ранняя неонатальная гибель) (195) (196). ВРТ ассоциируется с большим спектром перинатальных осложнений (225) (226). Следовательно, более низкий уровень PAPP-A при беременности после ВРТ может быть просто предиктором этих осложнений, которые, как известно, чаще встречаются при беременностях, наступивших в результате ВРТ (220) (227). Другие авторы, проанализировав данные в соответствии с наличием или отсутствием этих осложнений, обнаружили, что уровни PAPP-A были снижены при беременности после ВРТ в обеих группах (150). Ими подтверждена гипотеза о том, что лечение экзогенными гормонами является основной причиной снижения уровня PAPP-A при беременности после ВРТ (227) (162) (152).

Эндокринные изменения, которые происходят в раннем сроке беременности, включая выработку PAPP-A эндометрием и плацентой, являются результатом сложного и не до конца изученного набора взаимодействий между желтым телом, эндометрием, плацентой и эмбрионом. Вклад различных видов гормональной терапии в снижение уровня PAPP-A при беременностях после ВРТ оценить трудно, поскольку протоколы лечения сильно варьируют и полные данные о лечении отсутствуют. Однако следует отметить, что аналогично сниженные уровни PAPP-A наблюдались для переносов свежих эмбрионов, которые сопровождалась приемом ФСГ и/или кломифена, и для криопереносов эмбрионов, которые сопровождалась различными комбинациями эстрадиола, прогестерона, ХГЧ и кломифена (150).

При нормальной беременности трофобласт проникает через децидуум и превращает небольшую мышечную стенку спиральных артерий беременной в более крупные и эластичные сосуды, что позволяет увеличить приток крови к плаценте. PAPP-A протеаза инсулиноподобного фактора роста, связывающего белок-4 (ИПФР-4), облегчает расщепление этого белка и приводит к высвобождению свободного инсулиноподобного фактора роста (ИПФР) (192). ИПФР играет важную роль в регулировании инвазии трофобласта в децидуум.

Нарушение секреции свободного ИПФР может стать причиной плохой перфузии плаценты, тем самым влияя на рост плода и развитие других неблагоприятные условия беременности (222) (194).

Низкий уровень PAPP-A в материнской крови на ранних сроках беременности является предвестником развития неблагоприятных событий во время беременности, связанных с плохой перфузией плаценты, таких как спонтанная потеря плода, мертворождение, преэклампсия и маловесный к сроку плод. В тех исследованиях, где оценивался эффект низкого значения PAPP-A на исход беременности среди беременностей, не осложненных хромосомными нарушениями, обнаружили связь между низким уровнем PAPP-A и потерей плода, маловесным к сроку плодом, преждевременными родами, антенатальной и неонатальной гибелью, преэклампсией (196) (198) (195) (197) (228) (218). В исследовании уровня PAPP-A, измеренного во втором триместре (22–24 недели беременности), была обнаружена связь между высокими значениями PAPP-A и преэклампсией (229) (230) (231). В этих же исследованиях авторы не отмечают повышения числа антенатальных потерь при высоком уровне PAPP-A. Это соответствует выявленным результатам в нашем исследовании. Повышенный уровень может наблюдаться при «исчезнувшем близнеце», причем как в спонтанных, так и в беременностях вследствие ВРТ (150). Существует гипотеза, согласно которой хорион продолжает вырабатывать сывороточные белки, поэтому Международной Ассоциацией Акушеров и Гинекологов в практических рекомендациях рекомендуется не проводить оценку сывороточных белков при проведении пренатального скрининга первого триместра, а следует проводить расчет риска анеуплоидии только согласно возрасту матери (73).

Основным выводом настоящего исследования является то, что комбинация биохимических маркеров PAPP-A и β -ХГЧ в сочетании с оценкой хориальности позволяет нам прогнозировать исходы беременности при многоплодных беременностях. Результаты, полученные в нашей работе, вполне согласуются с недавними исследованиями, которые связывают низкий уровень сывороточных

белков (РАРР-А и β -ХГЧ) с неблагоприятными акушерскими исходами(127) (232) (196).

По результатам другого исследования низкий уровень РАРР-А не был напрямую связан с плацентарной дисфункцией и развитием осложнений, хотя его авторы и указывают на незначительную выборку (233).

Исходя из того, что основной этиологией развития неблагоприятных исходов беременности является нарушение имплантации с последующим развитием плаценты, происходящее в ранние сроки беременности, выполнение комбинированного пренатального скрининга в первом триместре является наиболее важным. Кроме того, было показано, что ранняя идентификация плодов с риском задержки роста во время беременности улучшает исходы беременности в четыре раза, что приводит к снижению риска неблагоприятных последствий (234).

Таким образом, было продемонстрировано, что показатель РАРР-А МоМ в группе беременностей двойнями, наступивших в результате ЭКО, значительно выше, чем в группе спонтанных беременностей. Выявлено, что преждевременные роды чаще встречались в группе СБ, чем в группе ЭКО, что, вероятно, может свидетельствовать о большем количестве монохориального многоплодия в данной группе. При монохориальных беременностях количество преждевременных родов превалировало над таковым при дихориальных беременностях. В то же время выявлена положительная корреляция между высоким уровнем β -ХГЧ и продолжительностью срока беременности, а именно чем выше уровень β -ХГЧ - тем позже случаются роды. Антенатальная гибель плода встречалась с сопоставимой частотой вне зависимости от способа зачатия и часто сочеталась с выходом из нормальных значений РАРР-А МоМ.

Медиана веса плодов значимо отличалась у женщин с моно- и дихориальными беременностями. Неблагоприятные исходы наступали чаще при многоплодных беременностях, которые характеризовались низкими уровнями исследуемых сывороточных белков во время скрининга первого триместра. Так, в

подгруппе с показателем PAPP-A МоМ ниже нормальных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 35,29%, в то время как в подгруппе с показателем β – ХГЧ МоМ ниже нормальных значений антенатальная гибель плода встречалась с частотой 27,72%. Эти показатели значительно превосходят таковые при нормальных и высоких уровнях данных сывороточных белков. Таким образом, низкие значения показателей PAPP-A МоМ и β – ХГЧ МоМ потенциально можно использовать в прогнозе развития таких неблагоприятных последствий многоплодной беременности, как антенатальная гибель и преждевременные роды.

ВЫВОДЫ

- 1) Сывороточные белки PAPP-A и β -ХГЧ, являются ранними информативными предикторами исходов многоплодной беременности, наступившей спонтанно или в результате проведения процедуры ЭКО.
- 2) Показатель PAPP-A МоМ в первом триместре в сыворотке крови женщин с многоплодной беременностью, наступившей спонтанно, достоверно ниже (1,12), чем у женщин с многоплодной беременностью, наступившей в результате ЭКО (1,41) ($p < 0,006$).
- 3) При показателе PAPP-A МоМ ниже референсных значений ($< 0,5$) ранние преждевременные роды у женщин с многоплодной беременностью не встречались, в то время как при показателе, соответствующем референсным значениям (0,5-2,0) – в 21,29 %. Различия статистически значимы ($p = 0,03$). При показателе β – ХГЧ МоМ ниже референсных значений ($< 0,5$) преждевременные роды у женщин с многоплодной беременностью встречались с частотой 16,66% (6/36 случаев), в то время как при показателе, соответствующем референсным значениям (0,5-2,0) – в 19,14% (45/235 случаев). Различия статистически недостоверны ($\chi^2 = 0,001$; $p = 0,97$).

4) Медиана веса плодов в группе монохориальных двоен составила 2285 г [1482,50; 2762,50] и 2300 г [1475,00; 2600,00], в группе дихориальных двоен – 2535 г [2100,00; 2950,00] и 2500 г [2000,00; 2904,00] для каждого из плодов ($p = 0,013$ и $p = 0,008$ соответственно), что указывает на более высокий риск задержки роста плода и маловесного плода при монохориальных двойнях независимо от способа зачатия

5) Антенатальная гибель плода встречалась с сопоставимой частотой вне зависимости от способа зачатия ($\chi^2=2,166$; $p=0,142$), и вида плацентации ($\chi^2=1,216$; $p=0,271$).

6) При показателе PAPP-A МоМ ниже референсных значений ($<0,5$) антенатальная гибель плода у женщин с многоплодной беременностью наблюдалась в 35,29% (6/17 случаев), в то время как при показателе, соответствующем референсным значениям (0,5-2,0) – в 11,24% (28/249 случаев). Различия статистически достоверны ($\chi^2=8,256$; $p=0,005$). При показателе β – ХГЧ МоМ ниже референсных значений ($<0,5$) антенатальная гибель плода у женщин с многоплодной беременностью встречалась с частотой 27,78% (10/36 случаев), в то время как при показателе, соответствующем референсным значениям (0,5-2,0) – в 8,93% (21/235 случаев). Различия статистически достоверны ($\chi^2= 10,940$; $p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В процессе комбинированного скрининга I триместра оценку содержания ассоциированного с беременностью белка-A плазмы (PAPP-A) и напрямую влияющего на имплантацию и развитие плаценты вырабатываемого плацентой хорионического гонадотропина человека - β (β -ХГЧ) в сыворотке крови следует выполнять не только с целью определения рисков хромосомных аномалий у плода, ЗРП, ранней и поздней преэклампсии, но и для прогнозирования других неблагоприятных исходов многоплодной беременности (АГП и преждевременные роды) независимо от способа ее наступления.

2. В группу риска по развитию преждевременных родов следует относить беременных не только с моно- но и с дихориальной двойней при спонтанно наступившей беременности вне зависимости от показателей PAPP-A МоМ и β -ХГЧ МоМ.

3. Монохориальные многоплодные двойни требуют большей настороженности при ведении беременности с точки зрения более высоких рисков развития задержки роста плода и рождения маловесных плодов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	артерио-артериальный (анастомоз)
АВ	артерио-венозный (анастомоз)
АГП	антенатальная гибель плода
АФП	альфа-фетопротеин
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
ДХ	дихориальная (беременность)
ДХДА	дихориальная диамниотическая (беременность/двойня)
ДЦП	детский церебральный паралич
ЗРП	задержка роста плода
ИКСИ	интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
ИПФР	инсулиноподобный фактор роста
КСК	кривые скорости кровотока
КТГ	кардиотокография
КТР	копчико-теменной размер
ЛГ	лютеинизирующий гормон
ЛПР	ложно-положительные результаты
МоМ	multiple of median, кратное медианы (степень отклонения показателя от медианы)
МРТ	магнитно-резонансная томография
МСС	максимальная систолическая скорость
МХ	монохориальная (беременность)
МХДА	монохориальная диамниотическая (беременность/двойня)

ПМП	предполагаемая масса плода
САП	синдром анемии-полицитемии
СБ	спонтанная беременность
сЗРП	синдром задержки развития плода
СМА	средняя мозговая артерия
СОАП	синдром обратной артериальной перфузии
ТВП	толщина воротникового пространства
ТТГ	тиреотропный гормон
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ФФТС	фето-фетальный трансфузионный синдром
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение
ACOG	Американский колледж акушерства и гинекологии
ISUOG	Международное общество ультразвука в акушерстве и гинекологии
PAPP-A	ассоциированный с беременностью протеин А
β -ХГЧ	бета-субъединица хорионического гонадотропина человека

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bush MC, Pernoll ML. Multiple pregnancy. Current diagnosis and treatment, obstetrics and gynecology 10th ed New York: McGraw Hill. 2007:301-10.
2. Kulkarni AD, Jamieson DJ, Jones Jr HW, Kissin DM, Gallo MF, Macaluso M, et al. Fertility treatments and multiple births in the United States. *N engl j med*. 2013;369:2218-25.
3. Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PG, Lambalk CB. The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1531-2.
4. Сичинава Л. Многоплодие. Современные подходы к тактике ведения беременности. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2014;8(2).
5. Smits J, Monden C. Twinning across the Developing World. *PLoS One*. 2011;6(9):e25239.
6. Alexander GR, Kogan M, Martin J, Papiernik E. What are the fetal growth patterns of singletons, twins, and triplets in the United States? *Clinical obstetrics and gynecology*. 1998;41(1):115-25.
7. Rafael TJ, Berghella V, Alfirovic Z. Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in multiple pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(9):CD009166.
8. Pharoah PO, Cooke T. Cerebral palsy and multiple births. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1996;75(3):F174-7.
9. Tsibizova V, Govorov I, Averkin I, Khamani N, Blinov D. Health technology assessment in obstetrics: advantage of tailored conservative strategy vs surgical therapies of monochorionic twin complicated by TRAP-sequence. *FARMAKOEKONOMIKA Modern Pharmacoeconomic and Pharmacoepidemiology*. 2020;13(1):36-42.
10. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997;104(10):1203-7.
11. Tsibizova V, Govorov I, Pervunina T, Komlichenko E, Kudryashova E, Blinov D, et al. First trimester prenatal screening in multiple pregnancies. Part II: serum proteins PAPP-A and β -hCG as markers of adverse pregnancy outcomes. *Obstetrics, gynecology and reproduction*. 2020;14(1):34-43.
12. Quintero RA, Morales WJ, Allen MH, Bornick PW, Johnson PK, Kruger M. Staging of twin-twin transfusion syndrome. *Journal of Perinatology*. 1999;19(8):550-5.
13. Huber A, Diehl W, Zikulnig L, Bregenzer T, Hackelöer B, Hecher K. Perinatal outcome in monochorionic twin pregnancies complicated by amniotic fluid discordance without severe twin-twin transfusion syndrome. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2006;27(1):48-52.

14. Van Mieghem T, Eixarch E, Gucciardo L, Done E, Gonzales I, Van Schoubroeck D, et al. Outcome prediction in monochorionic diamniotic twin pregnancies with moderately discordant amniotic fluid. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2011;37(1):15-21.
15. Baud D, Windrim R, Keunen J, Kelly EN, Shah P, Van Mieghem T, et al. Fetoscopic laser therapy for twin-twin transfusion syndrome before 17 and after 26 weeks' gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013;208(3):197. e1-. e7.
16. Roberts D, Neilson JP, Kilby MD, Gates S. Interventions for the treatment of twin-twin transfusion syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014(1).
17. Rossi AC, D'Addario V. Survival outcomes of twin–twin transfusion syndrome stage I: a systematic review of literature. *American journal of perinatology*. 2013;30(01):005-10.
18. Robyr R, Lewi L, Salomon LJ, Yamamoto M, Bernard J-P, Deprest J, et al. Prevalence and management of late fetal complications following successful selective laser coagulation of chorionic plate anastomoses in twin-to-twin transfusion syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;194(3):796-803.
19. Baschat AA, Barber J, Pedersen N, Turan OM, Harman CR. Outcome after fetoscopic selective laser ablation of placental anastomoses vs equatorial laser dichorionization for the treatment of twin-to-twin transfusion syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013;209(3):234. e1-. e8.
20. Slaghekke F, Lopriore E, Lewi L, Middeldorp JM, van Zwet EW, Weingertner A-S, et al. Fetoscopic laser coagulation of the vascular equator versus selective coagulation for twin-to-twin transfusion syndrome: an open-label randomised controlled trial. *The Lancet*. 2014;383(9935):2144-51.
21. Van Mieghem T, Lewi L, Gucciardo L, DeKoninck P, Van Schoubroeck D, Devlieger R, et al. The fetal heart in twin-to-twin transfusion syndrome. *International journal of pediatrics*. 2010;2010.
22. Herberg U, Bolay J, Graeve P, Hecher K, Bartmann P, Breuer J. Intertwin cardiac status at 10-year follow-up after intrauterine laser coagulation therapy of severe twin–twin transfusion syndrome: comparison of donor, recipient and normal values. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*. 2014;99(5):F380-F5.
23. Spruijt M, Steggerda S, Rath M, van Zwet E, Oepkes D, Walther F, et al. Cerebral injury in twin–twin transfusion syndrome treated with fetoscopic laser surgery. *Obstetrics & Gynecology*. 2012;120(1):15-20.
24. Stirnemann JJ, Quibel T, Essaoui M, Salomon LJ, Bussieres L, Ville Y. Timing of delivery following selective laser photocoagulation for twin-to-twin transfusion syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012;207(2):127. e1-. e6.

25. Hoffmann C, Weisz B, Yinon Y, Hogen L, Gindes L, Shrim A, et al. Diffusion MRI findings in monochorionic twin pregnancies after intrauterine fetal death. *American journal of neuroradiology*. 2013;34(1):212-6.
26. Hillman SC, Morris RK, Kilby MD. Co-twin prognosis after single fetal death: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 2011;118(4):928-40.
27. Quarello E, Molho M, Ville Y. Incidence, mechanisms, and patterns of fetal cerebral lesions in twin-to-twin transfusion syndrome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2007;20(8):589-97.
28. Graeve P, Banek C, Stegmann-Woessner G, Maschke C, Hecher K, Bartmann P. Neurodevelopmental outcome at 6 years of age after intrauterine laser therapy for twin-twin transfusion syndrome. *Acta Paediatrica*. 2012;101(12):1200-5.
29. Slaghekke F, Kist W, Oepkes D, Pasman S, Middeldorp J, Klumper F, et al. Twin anemia-polycythemia sequence: diagnostic criteria, classification, perinatal management and outcome. *Fetal diagnosis and therapy*. 2010;27(4):181-90.
30. Lopriore E, Slaghekke F, Oepkes D, Middeldorp J, Vandenbussche F, Walther F. Hematological characteristics in neonates with twin anemia-polycythemia sequence (TAPS). *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2010;30(3):251-5.
31. Genova L, Slaghekke F, Klumper F, Middeldorp J, Steggerda S, Oepkes D, et al. Management of twin anemia-polycythemia sequence using intrauterine blood transfusion for the donor and partial exchange transfusion for the recipient. *Fetal diagnosis and therapy*. 2013;34(2):121-6.
32. Dhillon R, Hillman S, Pounds R, Morris R, Kilby M. Comparison of Solomon technique with selective laser ablation for twin-twin transfusion syndrome: a systematic review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;46(5):526-33.
33. Moore TR, Gale S, Benirschke K. Perinatal outcome of forty-nine pregnancies complicated by acardiac twinning. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990;163(3):907-12.
34. Wong AE, Sepulveda W. Acardiac anomaly: current issues in prenatal assessment and treatment. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2005;25(9):796-806.
35. Михайлов А, Романовский А, Кузнецов А, Каштанова Т, Шлыкова А, Кянксеп И. Синдром обратной артериальной перфузии: патофизиологические аспекты и принципы диагностики. *Таврический медико-биологический вестник*. 2018;21(2-2).
36. Lewi L, Valencia C, Gonzalez E, Deprest J, Nicolaidis KH. The outcome of twin reversed arterial perfusion sequence diagnosed in the first trimester. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;203(3):213. e1-. e4.

37. Tan T, Sepulveda W. Acardiac twin: a systematic review of minimally invasive treatment modalities. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2003;22(4):409-19.
38. Pagani G, D'Antonio F, Khalil A, Papageorgiou A, Bhide A, Thilaganathan B. Intrafetal laser treatment for twin reversed arterial perfusion sequence: cohort study and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2013;42(1):6-14.
39. Chaveeva P, Poon LC, Sotiriadis A, Kosinski P, Nicolaides KH. Optimal method and timing of intrauterine intervention in twin reversed arterial perfusion sequence: case study and meta-analysis. *Fetal diagnosis and therapy*. 2014;35(4):267-79.
40. Башмакова Н, Айтов А, Чистякова Г, Косовцова Н, Маркова Т, Ремизова И. Дифференциальная диагностика осложнений монохориальной многоплодной беременности (обзор литературы). *Problemy Reproduksii*. 2017;23(4).
41. Benirschke K, Kim CK. Multiple pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1973;288(24):1276-84.
42. Макацария Н. Монохориальная многоплодная беременность. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2014;8(2).
43. Prefumo F, Fichera A, Pagani G, Marella D, Valcamonico A, Frusca T. The natural history of monoamniotic twin pregnancies: a case series and systematic review of the literature. *Prenatal diagnosis*. 2015;35(3):274-80.
44. Raphael SI. Monoamniotic twin pregnancy: a review of the literature and a report of 5 new cases. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1961;81(2):323-30.
45. Wensinger J, Daly R. Monoamniotic twins. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1962;83(9):1254-6.
46. Rossi A, Prefumo F. Impact of cord entanglement on perinatal outcome of monoamniotic twins: a systematic review of the literature. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2013;41(2):131-5.
47. Van Mieghem T, De Heus R, Lewi L, Klaritsch P, Kollmann M, Baud D, et al. Prenatal management of monoamniotic twin pregnancies. *Obstetrics & Gynecology*. 2014;124(3):498-506.
48. Laros Jr RK, Dattel BJ. Management of twin pregnancy: the vaginal route is still safe. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1988;158(6):1330-8.
49. Minakami H, Sato I. Reestimating date of delivery in multifetal pregnancies. *JAMA*. 1996;275(18):1432-4.
50. Chervenak FA, Johnson RE, Youcha S, Hobbins JC, Berkowitz RL. Intrapartum management of twin gestation. *Obstetrics and gynecology*. 1985;65(1):119-24.
51. Kelsick F, Minkoff H. Management of the breech second twin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1982;144(7):783-6.

52. Dias T, Mahsud-Dornan S, Bhide A, Papageorghiou A, Thilaganathan B. Cord entanglement and perinatal outcome in monoamniotic twin pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2010;35(2):201-4.
53. Auriolles-Garibay A, Hernandez-Andrade E, Romero R, Garcia M, Qureshi F, Jacques SM, et al. Presence of an umbilical artery notch in monochorionic/monoamniotic twins. *Fetal diagnosis and therapy*. 2014;36(4):305-11.
54. Middeldorp JM, Klumper FJ, Oepkes D, Lopriore E, Kanhai HH, Vandenbussche FP. Selective feticide in monoamniotic twin pregnancies by umbilical cord occlusion and transection. *Fetal diagnosis and therapy*. 2008;23(2):121-5.
55. Peeters SH, Devlieger R, Middeldorp JM, DeKoninck P, Deprest J, Lopriore E, et al. Fetal surgery in complicated monoamniotic pregnancies: case series and systematic review of the literature. *Prenatal diagnosis*. 2014;34(6):586-91.
56. GILLIM DL, HENDRICKS CH. Holoacardius: review of the literature and case report. *Obstetrics & Gynecology*. 1953;2(6):647-53.
57. Baken L, Rousian M, Kompanje EJ, Koning AH, van der Spek PJ, Steegers EA, et al. Diagnostic techniques and criteria for first-trimester conjoined twin documentation: a review of the literature illustrated by three recent cases. *Obstetrical & gynecological survey*. 2013;68(11):743-52.
58. Agarwal U, Dahiya P, Khosla A. Vaginal birth of conjoined thoracopagus—a rare event. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2003;269(1):66-7.
59. : ICfMART, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, et al. World collaborative report on assisted reproductive technology, 2002. *Human Reproduction*. 2009;24(9):2310-20.
60. Halliday JL, Ukoumunne OC, Baker HG, Breheny S, Jaques AM, Garrett C, et al. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Human reproduction*. 2010;25(1):59-65.
61. Kissin DM, Jamieson DJ, Barfield WD. Monitoring health outcomes of assisted reproductive technology. *The New England journal of medicine*. 2014;371(1):91.
62. Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti A, Kupka M, De Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*. 2009;24(6):1267-87.
63. Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *Bmj*. 2004;328(7434):261.

64. Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 2004;103(3):551-63.
65. McDonald SD, Murphy K, Beyene J, Ohlsson A. Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*. 2005;27(5):449-59.
66. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*. 2012;18(5):485-503.
67. McGovern PG, Llorens AJ, Skurnick JH, Weiss G, Goldsmith LT. Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization–embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2004;82(6):1514-20.
68. Vasario E, Borgarello V, Bossotti C, Libanori E, Biolcati M, Arduino S, et al. IVF twins have similar obstetric and neonatal outcome as spontaneously conceived twins: a prospective follow-up study. *Reproductive biomedicine online*. 2010;21(3):422-8.
69. Dhont M, De Sutter P, Ruysinck G, Martens G, Bekaert A. Perinatal outcome of pregnancies after assisted reproduction: a case-control study. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;181(3):688-95.
70. Isaksson R, Gissler M, Tiitinen A. Obstetric outcome among women with unexplained infertility after IVF: a matched case–control study. *Human Reproduction*. 2002;17(7):1755-61.
71. Wen SW, Leader A, White RR, Léveillé M-C, Wilkie V, Zhou J, et al. A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;150(2):160-5.
72. Geisler ME, O’Mahony A, Meaney S, Waterstone JJ, O’Donoghue K. Obstetric and perinatal outcomes of twin pregnancies conceived following IVF/ICSI treatment compared with spontaneously conceived twin pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2014;181:78-83.
73. Khalil A, Rodgers M, Baschat A, Bhide A, Gratacos E, Hecher K, et al. ISUOG Practice Guidelines: role of ultrasound in twin pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2016;47(2):247-63.
74. Qin JB, Wang H, Sheng X, Xie Q, Gao S. Assisted reproductive technology and risk of adverse obstetric outcomes in dichorionic twin pregnancies: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2016;105(5):1180-92.
75. Martin JA. United States vital statistics and the measurement of gestational age. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2007;21:13-21.

76. D'Antonio F, Khalil A, Dias T, Thilaganathan B, Bahamie A, Bhide A, et al. Weight discordance and perinatal mortality in twins: analysis of the Southwest Thames Obstetric Research Collaborative (STORK) multiple pregnancy cohort. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2013;41(6):643-8.
77. Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L. Circulating Human Pregnancy-Associated Plasma Protein-a Is Disulfide-Bridged to the Proform of Eosinophil Major Basic-Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(17):12243-6.
78. Kristensen T, Oxvig C, Sand O, Moller NP, Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry*. 1994;33(6):1592-8.
79. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J*. 2001;358(Pt 2):359-67.
80. Cerda-Costa N, Gomis-Ruth FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci*. 2014;23(2):123-44.
81. Bonno M, Oxvig C, Kephart GM, Wagner JM, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, et al. Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta. *Lab Invest*. 1994;71(4):560-6.
82. Cole LA. hCG structure: A logical perspective. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2012;1(4):287-92.
83. Gyrop C, Christiansen M, Oxvig C. Quantification of proteolytically active pregnancy-associated plasma protein-A with an assay based on quenched fluorescence. *Clin Chem*. 2007;53(5):947-54.
84. Kodama M, Miyoshi H, Fujito N, Samura O, Kudo Y. Plasma mRNA concentrations of placenta-specific 1 (PLAC1) and pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) are higher in early-onset than late-onset pre-eclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2011;37(4):313-8.
85. Monget P, Oxvig C, editors. PAPP-A and the IGF system. *Annales d'endocrinologie*; 2016: Elsevier.
86. Soe R, Overgaard MT, Thomsen AR, Laursen LS, Olsen IM, Sottrup-Jensen L, et al. Expression of recombinant murine pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and a novel variant (PAPP-Ai) with differential proteolytic activity. *Eur J Biochem*. 2002;269(8):2247-56.

87. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3149-53.
88. Conover CA, Faessen GF, Ilg KE, Chandrasekher YA, Christiansen M, Overgaard MT, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology*. 2001;142(5):2155-8.
89. Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA, Overgaard MT, Christiansen M, Oxvig C, et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(3):335-41.
90. Giudice LC, Conover CA, Bale L, Faessen GH, Ilg K, Sun I, et al. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2359-66.
91. Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel MC, Maniere S, Zapf J, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol Reprod*. 2003;68(1):77-86.
92. Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett*. 2001;504(1-2):36-40.
93. Ning Y, Schuller AG, Conover CA, Pintar JE. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 is both a positive and negative regulator of IGF activity in vivo. *Mol Endocrinol*. 2008;22(5):1213-25.
94. Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21849-53.
95. Yan X, Baxter RC, Firth SM. Involvement of pregnancy-associated plasma protein-A2 in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 proteolysis during pregnancy: a potential mechanism for increasing IGF bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1412-20.
96. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-D13.

97. Cole LA. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7(1):8.
98. Gregory JJ, Jr., Finlay JL. Alpha-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin: their clinical significance as tumour markers. *Drugs*. 1999;57(4):463-7.
99. Hay DL. Placental histology and the production of human choriogonadotrophin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1988;95(12):1268-75.
100. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, et al. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5290-6.
101. Ambrus G, Rao CV. Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 1994;135(6):2772-9.
102. Bansal AS, Bora SA, Saso S, Smith JR, Johnson MR, Thum MY. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(8):747-53.
103. Schumacher A, Heinze K, Witte J, Poloski E, Linzke N, Woidacki K, et al. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J Immunol*. 2013;190(6):2650-8.
104. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem*. 1997;43(12):2233-43.
105. Nisula BC, Blithe DL, Akar A, Lefort G, Wehmann RE. Metabolic fate of human choriogonadotropin. *J Steroid Biochem*. 1989;33(4B):733-7.
106. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*. 1994;369(6480):455-61.
107. Stenman UH, Alfthan H. Determination of human chorionic gonadotropin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(6):783-93.
108. Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, Valmu L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):769-84.
109. Cole LA. hCG, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10(1):24.
110. Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol*. 1998;60(1):461-96.
111. Jameson JL, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev*. 1993;14(2):203-21.
112. O'Connor JF, Birken S, Lustbader JW, Krichevsky A, Chen Y, Canfield RE. Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocr Rev*. 1994;15(5):650-83.
113. Cole LA. hCG, five independent molecules. *Clin Chim Acta*. 2012;413(1-2):48-65.

114. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, Ozaki N, Sauer M, Lindheim S, et al. Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinol.* 2002;172(3):497-506.
115. Kovalevskaya G, Genbacev O, Fisher SJ, Caceres E, O'Connor JF. Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;194(1-2):147-55.
116. Elliott MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine.* 1997;7(1):15-32.
117. Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet.* 1981;1(1):3-18.
118. Boorstein WR, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Human chorionic gonadotropin β -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature.* 1982;300(5891):419-22.
119. Hallast P, Rull K, Laan M. The evolution and genomic landscape of CGB1 and CGB2 genes. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;260-262:2-11.
120. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Endocrinology.* 2007;148(10):5011-9.
121. Knöfler M. What factors regulate HCG production in Down's syndrome pregnancies? Regulation of HCG during normal gestation and in pregnancies affected by Down's syndrome. *Molecular human reproduction.* 1999;5(10):895-7.
122. Murthi P, Kalionis B, Cocquebert M, Rajaraman G, Chui A, Keogh RJ, et al. Homeobox genes and down-stream transcription factor PPAR γ in normal and pathological human placental development. *Placenta.* 2013;34(4):299-309.
123. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal diagnosis.* 2011;31(1):7-15.
124. Spencer K, Crossley JA, Green K, Worthington DJ, Brownbill K, Aitken DA. Second trimester levels of pregnancy associated plasma protein-A in cases of trisomy 18. *Prenat Diagn.* 1999;19(12):1127-34.
125. Bogdan MM. Clinica medicala Centrul de Medicina Fetala-Dr. Muresan.
126. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides K. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11–14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and*

Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2002;20(3):219-25.

127. Tsibizova V, Govorov I, Pervunina T, Komlichenko E, Kudryashova E, Blinov D, et al. First trimester prenatal screening in multiple pregnancies. Part I: comparative analysis of serum proteins PAPP-A and p-hCG in pregnancies conceived spontaneously or by in vitro fertilization. *Obstetrics, gynecology and reproduction*. 2020;14(1):25-33.

128. Clerici G, Romanelli M, Tosto V, Tsibizova V, Di Renzo GC. Fetal transient tricuspid valve regurgitation: sonographic features and clinical evolution. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2019:1-5.

129. Gjerris AC, Tabor A, Loft A, Christiansen M, Pinborg A. First trimester prenatal screening among women pregnant after IVF/ICSI. *Human reproduction update*. 2012;18(4):350-9.

130. Sperling L, Kiil C, Larsen LU, Qvist I, Schwartz M, Jørgensen C, et al. Naturally conceived twins with monochorionic placentation have the highest risk of fetal loss. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: the Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2006;28(5):644-52.

131. Spandorfer SD, Davis OK, Barmat LI, Chung PH, Rosenwaks Z. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1265-9.

132. Zaib-un-Nisa S, Ghazal-Aswad S, Badrinath P. Outcome of twin pregnancies after assisted reproductive techniques—a comparative study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2003;109(1):51-4.

133. Murphy M, Campbell M, Bone M. Is there an increased risk of twinning after discontinuation of the oral contraceptive pill? *Journal of Epidemiology & Community Health*. 1989;43(3):275-9.

134. Fan C, Sun Y, Yang J, Ye J, Wang S. Maternal and neonatal outcomes in dichorionic twin pregnancies following IVF treatment: a hospital-based comparative study. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(10):2199.

135. Pourali L, Ayati S, Jelodar S, Zarifian A, Andalibi MSS. Obstetrics and perinatal outcomes of dichorionic twin pregnancy following ART compared with spontaneous pregnancy. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2016;14(5):317.

136. Olivennes F, Kadhel P, Rufat P, Fanchin R, Fernandez H, Frydman R. Perinatal outcome of twin pregnancies obtained after in vitro fertilization: comparison with twin pregnancies obtained spontaneously or after ovarian stimulation. *Fertility and sterility*. 1996;66(1):105-9.

137. Group ECW. Multiple gestation pregnancy. *Human Reproduction*. 2000;15(8):1856-64.

138. Dias T, Bhide A. Epidemiology/Incidence of Multiple Pregnancy. *Multiple Pregnancy-E-book: Recent Advances in Management of Multiple Pregnancy*. 2019:1.

139. Minakami H, Sayama M, Honma Y, Matsubara S, Koike T, Sato I, et al. Lower risks of adverse outcome in twins conceived by artificial reproductive techniques compared with spontaneously conceived twins. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1998;13(7):2005-8.
140. Pantos K, Kokkali G, Petroutsou K, Lekka K, Malligiannis P, Koratzis A. Monochorionic triplet and monoamniotic twins gestation after intracytoplasmic sperm injection and laser-assisted hatching. *Fetal diagnosis and therapy*. 2009;25(1):144-7.
141. Abusheika N, Salha O, Sharma V, Brinsden P. Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature. *Human reproduction update*. 2000;6(4):396-403.
142. Chow JS, Benson CB, Racowsky C, Doubilet PM, Ginsburg E. Frequency of a monochorionic pair in multiple gestations: relationship to mode of conception. *Journal of ultrasound in medicine*. 2001;20(7):757-60.
143. Daniel Y, Ochshorn Y, Fait G, Geva E, Bar-Am A, Lessing JB. Analysis of 104 twin pregnancies conceived with assisted reproductive technologies and 193 spontaneously conceived twin pregnancies. *Fertility and sterility*. 2000;74(4):683-9.
144. Spencer K. Second-trimester prenatal screening for Down syndrome and the relationship of maternal serum biochemical markers to pregnancy complications with adverse outcome. *Prenatal diagnosis*. 2000;20(8):652-6.
145. Grün JP, Meuris S, De Nayer P, Glinoyer D. The thyrotrophic role of human chorionic gonadotrophin (hCG) in the early stages of twin (versus single) pregnancies. *Clinical endocrinology*. 1997;46(6):719-25.
146. Thiery M, Dhont M, Vandekerckhove D. Serum HCG and HPL in twin pregnancies. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 1977;56(5):495-7.
147. Niemimaa M, Suonpää M, Heinonen S, Seppälä M, Bloigu R, Ryyänen M. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A in twin pregnancies in the first trimester. *Prenatal diagnosis*. 2002;22(3):183-5.
148. Rätty R, Virtanen A, Koskinen P, Laitinen P, Forsström J, Salonen R, et al. Maternal midtrimester serum AFP and free β -hCG levels in in vitro fertilization twin pregnancies. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2000;20(3):221-3.
149. Prats P, Rodríguez I, Nicolau J, Comas C. Early first-trimester free- β -hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenatal diagnosis*. 2012;32(1):64-9.
150. Amor DJ, Xu J, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, et al. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Human Reproduction*. 2009;24(6):1330-8.

151. Engels M, Kooij M, Schats R, Twisk J, Blankenstein M, Van Vugt J. First-trimester serum marker distribution in singleton pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2010;30(4):372-7.
152. Tul N, Novak-Antolic Z. Serum PAPP-A Levels at 10–14 Weeks of Gestation Are Altered in Women After Assisted Conception. *Obstetrical & gynecological survey*. 2007;62(5):295-7.
153. Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, et al. First trimester screening with free β -hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2002;22(8):718-21.
154. Bender F, Hecken J, Reinsberg J, Berg C, van der Ven H, Gembruch U, et al. Altered first-trimester screening markers after IVF/ICSI: no relationship with small-for-gestational-age and number of embryos transferred. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(4):516-22.
155. Lambert-Messerlian G, Dugoff L, Vidaver J, Canick J, Malone F, Ball R, et al. First-and second-trimester Down syndrome screening markers in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies (ART): a FASTER trial study. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2006;26(8):672-8.
156. Niemimaa M, Heinonen S, Seppälä M, Hippeläinen M, Martikainen H, Ryyänen M. First-trimester screening for Down's syndrome in in vitro fertilization pregnancies. *Fertility and sterility*. 2001;76(6):1282-3.
157. Ghisoni L, Ferrazzi E, Castagna C, Setti PL, Masini A, Pigni A. Prenatal diagnosis after ART success: the role of early combined screening tests in counselling pregnant patients. *Placenta*. 2003;24:S99-S103.
158. Platt LD, editor *First-trimester risk assessment: twin gestations*. *Seminars in perinatology*; 2005: Elsevier.
159. Chaveeva P, Wright A, Syngelaki A, Konstantinidou L, Wright D, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies in pregnancies with a vanishing twin. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2019.
160. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth hormone & IGF research*. 2007;17(1):10-8.
161. Barrett SL, Bower C, Hadlow NC. Use of the combined first-trimester screen result and low PAPP-A to predict risk of adverse fetal outcomes. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2008;28(1):28-35.
162. Hui PW, Lam YH, Tang MHY, Ng EHY, Yeung WSB, Ho PC. Maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and free β -human chorionic gonadotrophin in pregnancies conceived with fresh and frozen-thawed embryos from in vitro fertilization and intracytoplasmic

- sperm injection. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2005;25(5):390-3.
163. Wøjdemann K, Larsen S, Shalmi A, Sundberg K, Christiansen M, Tabor A. First trimester screening for Down syndrome and assisted reproduction: no basis for concern. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2001;21(7):563-5.
164. Pihl K, Larsen T, Laursen I, Krebs L, Christiansen M. First trimester maternal serum pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (SP1) as a marker of adverse pregnancy outcome. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2009;29(13):1256-61.
165. Albu D, Sima RM, Ples L, Ionescu AC, Dimitriu M, Popescu M, et al. The Impact of Assisted Reproduction on First Trimester Biochemical Markers in Singleton and Twin Pregnancies. *REVISTA DE CHIMIE*. 2019;70(3):1040-4.
166. Galeva S, Gil M, Konstantinidou L, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2019;53(6):804-9.
167. Rifouna M, Reus A, Koning A, Van Der Spek P, Exalto N, Steegers E, et al. First trimester trophoblast and placental bed vascular volume measurements in IVF or IVF/ICSI pregnancies. *Human reproduction*. 2014;29(12):2644-9.
168. Joy J, McClure N, Cooke I. A comparison of spontaneously conceived twins and twins conceived by artificial reproductive technologies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2008;28(6):580-5.
169. Nassar AH, Usta IM, Rechdan JB, Harb TS, Adra AM, Abu-Musa AA. Pregnancy outcome in spontaneous twins versus twins who were conceived through in vitro fertilization. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;189(2):513-8.
170. Kozinszky Z, Zádori J, Orvos H, Katona M, Pál A, Kovács L. Obstetric and neonatal risk of pregnancies after assisted reproductive technology: a matched control study. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2003;82(9):850-6.
171. Bonney E, Rathod M, Cohen K, Ferriman E. Twin pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2013;23(6):165-70.
172. Ferriman E, Stratton S, Stern V. Twin pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2018;28(8):221-8.
173. Guyer B, MacDorman MF, Martin JA, Peters KD, Strobino DM. Annual summary of vital statistics—1997. *Pediatrics*. 1998;102(6):1333-49.
174. Powers WF, Kiely JL. The risks confronting twins: a national perspective. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994;170(2):456-61.

175. Keith L. Mortality and morbidity among twins: recent observations from the United States. *Acta geneticae medicae et gemellologiae: twin research*. 1994;43(1-2):25-31.
176. Luke B, Keith LG. The contribution of singletons, twins and triplets to low birth weight, infant mortality and handicap in the United States. *The Journal of reproductive medicine*. 1992;37(8):661-6.
177. Kiely JL. What is the population-based risk of preterm birth among twins and other multiples? *Clinical obstetrics and gynecology*. 1998;41(1):3-11.
178. Hartley RS, Emanuel I, Hitti J. Perinatal mortality and neonatal morbidity rates among twin pairs at different gestational ages: optimal delivery timing at 37 to 38 weeks' gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;184(3):451-8.
179. Ghai V, Vidyasagar D. Morbidity and mortality factors in twins: an epidemiologic approach. *Clinics in Perinatology*. 1988;15(1):123-40.
180. Luke B. Reducing fetal deaths in multiple births: optimal birthweights and gestational ages for infants of twin and triplet births. *Acta geneticae medicae et gemellologiae: twin research*. 1996;45(3):333-48.
181. Minakami H, Kimura H, Honma Y, Tamada T, Sato I. When Is the Optimal Time for Delivery?—Purely from the Fetuses' Perspective. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1995;40(3):174-8.
182. Luke B, Minogue J, Witter FR, Keith LG, Johnson TR. The ideal twin pregnancy: patterns of weight gain, discordancy, and length of gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993;169(3):588-97.
183. Florjański JS, Homola W, Fuchs T, Pawłosek A, Kasperski M. Postnatal condition of the second twin in respect to mode of delivery, chorionicity and type of fetal growth. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019;28(2):237-42.
184. Arıñkan SA, Arısoy R, Api M. Assessment of pregnancy outcomes among twin pregnancies with single fetal demise regarding chorionicity and fetal death time. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2019;20(3):147.
185. Sherer DM. Adverse perinatal outcome of twin pregnancies according to chorionicity: review of the literature. *American journal of perinatology*. 2001;18(01):023-38.
186. Visintin C, Mugglestone MA, James D, Kilby MD. Antenatal care for twin and triplet pregnancies: summary of NICE guidance. *Bmj*. 2011;343:d5714.
187. Dodd J, Crowther C, Haslam R, Robinson J, Group TToBT. Elective birth at 37 weeks of gestation versus standard care for women with an uncomplicated twin pregnancy at term: the Twins Timing of Birth Randomised Trial. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2012;119(8):964-74.

188. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1997;104(10):1203-7.
189. Laughon SK, Rebarber A, Rolnitzky L, Fink L, Saltzman DH. Decreased First-trimester Maternal Serum Free- β Subunit Human Chorionic Gonadotropin and Preterm Birth in Twin Gestations. *American journal of perinatology*. 2009;26(07):491-4.
190. Goldenberg RL, Iams JD, Miodovnik M, Van Dorsten JP, Thurnau G, Bottoms S, et al. The preterm prediction study: risk factors in twin gestations. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996;175(4):1047-53.
191. Ticconi C, Piccione E, Belmonte A, Rao CV. HCG—A new kid on the block in prematurity prevention. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2006;19(11):687-92.
192. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(6):3149-53.
193. Irwin J, Suen L-F, Martina N, Mark S, Giudice L. Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia. *Human reproduction*. 1999;14(suppl_2):90-8.
194. van Kleffens M, Groffen C, Lindenbergh-Kortleve DJ, van Neck JW, González-Parra S, Dits N, et al. The IGF system during fetal-placental development of the mouse. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;140(1-2):129-36.
195. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, et al. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(4):1446-51.
196. Ong CY, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH. First trimester maternal serum free β human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2000;107(10):1265-70.
197. Tul N, Pušenjak S, Osredkar J, Spencer K, Novak-Antolič Ž. Predicting complications of pregnancy with first-trimester maternal serum free- β hCG, PAPP-A and inhibin-A. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation with the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2003;23(12):990-6.
198. Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, Thom E, Zachary J, Hallahan TW, et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin- β , pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(4):1452-8.

199. Spencer K, Cowans N, Molina F, Kagan K, Nicolaides K. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2008;31(2):147-52.
200. Kwik M, Morris J. Association between first trimester maternal serum pregnancy associated plasma protein-A and adverse pregnancy outcome. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2003;43(6):438-42.
201. Lockwood CJ, Kuczynski E. Risk stratification and pathological mechanisms in preterm delivery. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2001;15:78-89.
202. Rouse DJ, Caritis SN, Peaceman AM, Sciscione A, Thom EA, Spong CY, et al. A trial of 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate to prevent prematurity in twins. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(5):454-61.
203. Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaides KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(5):462-9.
204. Coomarasamy A, Devall AJ, Cheed V, Harb H, Middleton LJ, Gallos ID, et al. A randomized trial of progesterone in women with bleeding in early pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(19):1815-24.
205. Mascarenhas M, Kamath MS, Muthukumar K, Mangalaraj AM, Chandy A, Aleyamma T. Obstetric outcomes of monochorionic pregnancies conceived following assisted reproductive technology: a retrospective study. *Journal of human reproductive sciences*. 2014;7(2):119.
206. Giudice L, Conover CA, Bale L, Faessen G, Ilg K, Sun I, et al. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(5):2359-66.
207. Heyborne KD, Porreco RP, Garite TJ, Phair K, Abril D, Group OPRS. Improved perinatal survival of monoamniotic twins with intensive inpatient monitoring. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005;192(1):96-101.
208. Hack KE, Derks JB, Schaap AH, Lopriore E, Elias SG, Arabin B, et al. Perinatal outcome of monoamniotic twin pregnancies. *Obstetrics & Gynecology*. 2009;113(2):353-60.
209. Morikawa M, Yamada T, Yamada T, Sato S, Minakami H. Prospective risk of intrauterine fetal death in monoamniotic twin pregnancies. *Twin Research and Human Genetics*. 2012;15(4):522-6.
210. Beasley E, Megerian G, Gerson A, Roberts NS. Monoamniotic twins: case series and proposal for antenatal management. *Obstetrics & Gynecology*. 1999;93(1):130-4.
211. Enbom JA. Twin pregnancy with intrauterine death of one twin. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1985;152(4):424-9.

212. Rydhström H, Ingemarsson I. Prognosis and long-term follow-up of a twin after antenatal death of the co-twin. *The Journal of reproductive medicine*. 1993;38(2):142-6.
213. Mackie FL, Morris RK, Kilby MD. Fetal brain injury in survivors of twin pregnancies complicated by demise of one twin: a review. *Twin Research and Human Genetics*. 2016;19(3):262-7.
214. Fusi L, Gordon H. Twin pregnancy complicated by single intrauterine death. Problems and outcome with conservative management. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1990;97(6):511-6.
215. D'Alton ME, Simpson LL, editors. *Syndromes in twins*. Seminars in perinatology; 1995: Elsevier.
216. Odibo A. Single intrauterine fetal death in twin pregnancies is associated with increased risk of preterm birth and abnormal antenatal brain imaging in the surviving co-twin. 2019.
217. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early-pregnancy origins of low birth weight. *Nature*. 2002;417(6892):916-.
218. Spencer C, Allen V, Flowerdew G, Dooley K, Dodds L. Low levels of maternal serum PAPP-A in early pregnancy and the risk of adverse outcomes. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2008;28(11):1029-36.
219. Liao A, Heath V, Kametas N, Spencer K, Nicolaides K. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Human Reproduction*. 2001;16(7):1501-4.
220. Maymon R, Shulman A. Serial first-and second-trimester Down's syndrome screening tests among IVF-versus naturally-conceived singletons. *Human Reproduction*. 2002;17(4):1081-5.
221. Bellver J, Lara C, Soares SR, Ramírez A, Pellicer A, Remohí J, et al. First trimester biochemical screening for Down's syndrome in singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Human Reproduction*. 2005;20(9):2623-7.
222. Conover CA, Bale LK, Overgaard MT, Johnstone EW, Laursen UH, Füchtbauer E-M, et al. Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development. *Development*. 2004;131(5):1187-94.
223. Lin T-M, Halbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1974;118(2):223-36.
224. Guibourdenche J, Frenco J, Pidoux G, Bertin G, Luton D, Muller F, et al. Expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during human villous trophoblast differentiation in vitro. *Placenta*. 2003;24(5):532-9.
225. Maman E, Lunenfeld E, Levy A, Vardi H, Potashnik G. Obstetric outcome of singleton pregnancies conceived by in vitro fertilization and ovulation induction compared with those conceived spontaneously. *Fertility and sterility*. 1998;70(2):240-5.

226. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(10):731-7.
227. Bersinger NA, Ødegård RA. Second-and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2004;83(1):37-45.
228. Morssink L, Kornman L, Hallahan T, Kloosterman M, Beekhuis J, De Wolf B, et al. Maternal serum levels of free β -hCG and PAPP-A in the first trimester of pregnancy are not associated with subsequent fetal growth retardation or preterm delivery. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 1998;18(2):147-52.
229. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*. 2006;19(1):65-78.
230. Votino C, Fanelli T, Olivieri C, De Robertis V, Rembouskos G, Volpe P. P09. 08: First trimester low PAPP-A (≤ 0.2 MoM) and risk of structural abnormalities in euploid fetuses: a prospective study. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2019;54:183-.
231. Hourrier S, Salomon LJ, Dreux S, Muller F. Screening for adverse pregnancy outcome at early gestational age. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(21-22):1547-52.
232. Kirkegaard I, Henriksen T, Uldbjerg N. Early fetal growth, PAPP-A and free β -hCG in relation to risk of delivering a small-for-gestational age infant. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2011;37(3):341-7.
233. Peterson SE, Simhan HN. First-trimester pregnancy-associated plasma protein A and subsequent abnormalities of fetal growth. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;198(5):e43-e5.
234. Van Ravenswaaij R, Tesselaar-Van der Goot M, de Wolf S, van Leeuwen-Spruijt M, Visser G, Schielen P. First-trimester serum PAPP-A and β -hCG concentrations and other maternal characteristics to establish logistic regression-based predictive rules for adverse pregnancy outcome. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(1):50-7.