

На правах рукописи

ДУБОВОЙ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ТЯЖЕЛАЯ ПРЕЭКЛАМПСИЯ:
ОСОБЕННОСТИ АНГИОГЕННОГО СТАТУСА**

14.01.01 — акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград, 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Аксененко Виктор Алексеевич**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Милованов Андрей Петрович**

Официальные оппоненты:

Петрухин Василий Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель акушерского физиологического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Курочка Марина Петровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицины №4 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Защита диссертации состоится _____ в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.10 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте: www.volgmed.ru, с авторефератом на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: www.vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н., профессор

Селихова Марина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Преэклампсия (ПЭ) осложняет течение от 2 до 8% всех беременностей [Anderson U.D., 2012; Gaillard R., 2013], при этом тяжелая форма развивается в каждом десятом случае [Clark S.L., 2014]. Каждый год в мире регистрируется 8,5 миллионов случаев ПЭ, а в структуре материнской смертности ПЭ и ее осложнения ежегодно занимают II-IV место [Сидорова И.С., 2014]. В России с 2014 года ПЭ является второй по распространенности причиной материнской смертности, уступая только экстрагенитальной патологии [Байбарина Е. Н., 2015]. Ежегодно погибают более 500 тысяч детей от матерей с ПЭ [Duley L., 2009], а заболеваемость новорожденных достигает 640-780‰ [Радзинский В.Е., Фукс А.М., 2016]. Таким образом, ПЭ по-прежнему представляет одну из самых серьезных и, к сожалению, нерешенных проблем современного акушерства.

Современные клинические, лабораторные и экспериментальные методы исследования направлены на изучение механизмов возникновения и развития этого акушерского осложнения. Предложено множество теорий, однако и сегодня ПЭ – «болезнь загадок и предположений», до сих пор большинство современных статей, посвященных изучению ПЭ, начинается с утверждения, что полностью причины развития этого заболевания неизвестны [Taal M.W., 2011; Chaiworapongsa T., 2013]. Диагностические критерии по-прежнему основаны на неспецифических клинических и лабораторных признаках и своевременное точное распознавание развития ПЭ является важной задачей современных исследователей [Herraiz I., 2015].

В ходе многочисленных исследований показано, что при дисфункции эндотелия, имеющей место при ПЭ и приводящей к осложнениям на уровне сосудов плаценты, изменяется активность факторов, синтезируемых эндотелием, либо являющихся его элементами. Кроме того, повышенное внимание уделяется факторам, участвующим в инвазии трофобласта на рубеже I-II триместров беременности. Существует много сообщений об

изменении при ПЭ уровня про- и антиангиогенных факторов, играющих центральную роль в процессе имплантации, пролиферации клеток, ангиогенезе [Taylor R. N., 2014; Cunningham F., 2014]. Однако в подавляющем большинстве работ внимание уделяется отдельным факторам без учета содержания других соединений, участвующих в патогенезе обсуждаемого осложнения беременности. В результате проработки научной литературы нами не найдено информации о взаимосвязи этих факторов между собой, о корреляции с основными проявлениями ПЭ после ее манифестации. Зависимость же концентрации в крови от их экспрессии тканью плаценты по данным литературы представлена фрагментарно и, немаловажно отметить, без привязки к отдельным типам клеток плаценты. Все вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования – совершенствование методов оценки тяжелой преэклампсии путем определения показателей ангиогенного статуса беременной женщины.

Задачи исследования:

1. Изучить современные особенности анамнеза, течения беременности и перинатальных исходов при тяжелой ПЭ у жительниц Ставропольского края.
2. Выявить при тяжелой ПЭ и при беременности, протекающей без гипертензивных осложнений, закономерности содержания про- и антиангиогенных факторов, а также показателей эндотелиальной дисфункции.
3. Определить зависимость между степенью выраженности клинических проявлений тяжелой преэклампсии и уровнем маркеров ангиогенного статуса в сыворотке крови беременной женщины.
4. Исследовать при тяжелой преэклампсии особенности ангиогенеза на основании морфологических и иммуногистохимических

исследований экспрессии матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов и их ингибиторов.

Научная новизна

Впервые при тяжелой ПЭ одновременно изучены уровни VEGF-A, sFlt-1, ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, TIMP-2 и MMP-9 в крови беременных с определением их взаимной корреляции и связи с клиникой ПЭ.

Получены приоритетные данные о морфологических и иммуногистохимических особенностях строения плацент при тяжелой ПЭ. Расширены представления о патогенезе ПЭ.

Получены данные об экспрессии MMPs 2 и 9 типов и их ингибиторов отдельными инвазивными типами клеток при тяжелой ПЭ. Впервые определено значимое повышение концентрации TIMP-2 в сыворотке крови пациенток с тяжелой ПЭ, что коррелирует с выраженной его экспрессией структурами плаценты, в первую очередь интерстициальным цитотрофобластом (ИЦТ).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При тяжелой ПЭ у жительниц Ставропольского края, несмотря на исключение отеков из «больших» критериев, в большинстве случаев (78,28%) отечный синдром имеет место, а в 58,2% выявляется классическая триада симптомов.

2. Тяжелая ПЭ характеризуется значительным преобладанием концентрации антиангиогенных факторов. Наиболее показательно повышение сывороточного уровня sFlt-1 (в 4 раза), отношения sFlt-1/VEGF-A (в 6 раз), а также повышение уровня TIMP-2.

3. У беременных с тяжелой ПЭ изменение содержания про- и антиангиогенных факторов не всегда коррелирует с их локальной экспрессией структурами плаценты. В сыворотке крови ряд факторов (MMP-2 и -9) подавляются специфическими супрессорами и определяются

в неактивном состоянии. Положительная корреляция TIMP-2, продуцируемого интерстициальным цитотрофобластом и оттуда попадающего в кровоток, с содержанием этого фактора в сыворотке крови может являться основой выделения новых дополнительных критериев диагностики тяжелой ПЭ.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных данных нами доказано, что за последние годы имеется некоторое снижение частоты постановки диагноза «тяжелая ПЭ», что скорее всего связано с введением новой классификации ПЭ и применением новых критериев диагностирования этого осложнения. Результаты иммуноферментного, морфологического и иммуногистохимического анализа расширили представление о роли ключевых факторов ангиогенеза и имплантации в прогрессировании ПЭ и их связи с ее исходами. Полученные данные позволяют оптимизировать тактику ведения пациенток с тяжелой ПЭ.

Апробация результатов

Основные положения работы доложены, обсуждены и получили положительную оценку: на научно-практической конференции «Здоровье женщины – здоровье нации» (Кисловодск, 2011), Итоговых конференциях молодых ученых Ставропольского края «Инновации молодых ученых» (Ставрополь, 2011, 2012, 2013), VIII межрегиональной научно-практической конференции «Все о здоровье женщины» (Кисловодск, 2013), межрегиональной научно-практической конференции "Охрана здоровья женщины", (Ставрополь, 2014), II региональной научно-практической конференции "Приоритетные задачи охраны репродуктивного здоровья и пути их решения" (Ростов-на-Дону, 2014), VIII общероссийском семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2015), межрегиональном научно-практическом форуме «Петровские чтения»

(Ставрополь, 2016), научно-практических конференциях «Современные подходы к профилактике и терапии поздних осложнений беременности» и «Актуальные вопросы акушерства и гинекологии» (Ставрополь, 2016).

Внедрение результатов исследования

Основные результаты исследования вошли в отчет по научно-исследовательской работе на кафедре акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет». Материалы исследований используются в практической деятельности крупных родовспомогательных учреждений Ставропольского края (ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический перинатальный центр», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный родильный дом», ГБУЗ СК «Ессентукский межрайонный родильный дом»), а также в учебном процессе при проведении лабораторно-практических занятий, чтении лекций студентам, клиническим ординаторам, врачам-интернам.

Публикации результатов исследования

Основные положения диссертации опубликованы в 15 научных работах, 4 из них – в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, 1 англоязычная работа, опубликованная в международном журнале, индексируемом базой данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 153 страницах и включает в себя введение, обзор литературы, описание клинической характеристики и методик исследования пациентов, главы с изложением и обсуждением результатов, полученных при клиническом исследовании, заключение, выводы, практические рекомендации, библиографический список и список принятых сокращений.

Библиография содержит 81 отечественный и 161 зарубежный источник. В иллюстративный материал работы вошли 25 таблиц и 32 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели и решения задач исследования работа проводилась с использованием когортного проспективного метода.

Работа выполнена в период с 2009 по 2013 гг. на базе кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (зав. кафедрой – профессор, д.м.н. Аксененко В.А.) и ГБУЗ СК "Ставропольский краевой клинический перинатальный центр" (гл. врач – Затона Б.Ф.). За рассматриваемый период времени 86,3% всех беременных с тяжелой ПЭ, имевшей место в Ставропольском крае, были родоразрешены в ГБУЗ СК СККПЦ.

На первом этапе в исследование были включены 244 беременных, находившихся на стационарном лечении по поводу тяжелой ПЭ в течение указанного периода времени (Рисунок 1).

Второй этап заключался в обследовании 34 беременных, составивших основную группу. Беременные были выбраны из числа пациенток с так называемой «чистой» ПЭ (58 человек) путем рандомизации, при помощи генерации случайных чисел в пакете Microsoft Excel 2013.

Критериями включения пациенток в **основную группу** были:

1. Наличие клинических и лабораторных проявлений тяжелой преэклампсии;
2. Одноплодная беременность;
3. Отсутствие выраженной соматической патологии, аутоиммунных заболеваний;

4. Наступления беременности без применения вспомогательных репродуктивных технологий;

5. Информированное согласие пациентки о включении в исследование.

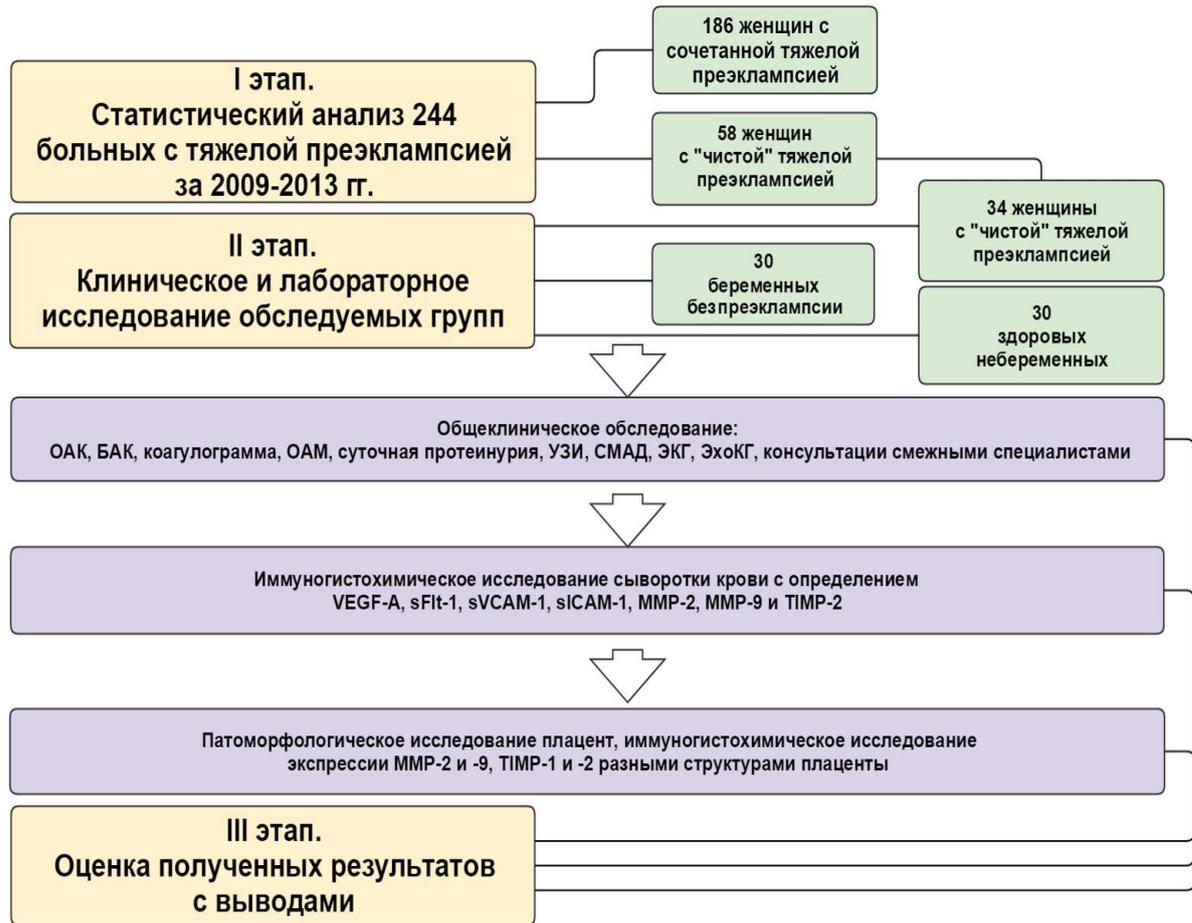
В **группу сравнения** вошли беременные с доношенным сроком гестации (n=30), а в **контрольную группу** – небеременные здоровые женщины (n=30). Критериями включения в обе эти группы были:

1. Отсутствие заболеваний, сопровождающихся изменением ангиогенного статуса женщины, таких как: системные заболевания и коллагенозы, артериальная гипертензия, пороки сердца, заболевания щитовидной железы, хронический гломерулонефрит, сахарный диабет, варикозное расширение вен, заболевания крови, псориаз, аутоиммунная патология, эндометриоз, синдром склерополикистозных яичников, миома матки, а также женщины, не имеющие в анамнезе ПЭ при прошлой беременности;

2. Информированное согласие пациентки о включении в исследование.

Оперативное родоразрешение женщин из группы сравнения осуществлялось при относительно благополучном течении беременности по следующим показаниям: предполагаемые относительно крупные размеры плода в тазовом предлежании (10 случаев); смешанное ягодичное предлежание плода у первородящей или ножное предлежание плода (5 случаев); косое или поперечное положения плода (6 случаев); высокая миопия с изменениями на глазном дне, требующими выключения II периода родов (4 случая); категорический отказ беременных от возможных естественных родов, имеющих рубец на матке после одной операции кесарево сечение (5 случаев).

Рисунок 1 – Дизайн исследования



При постановке диагноза использовалась классификация ПЭ с учетом Федеральных клинических рекомендаций [Сухих Г.Т. и др., 2013]. Диагноз тяжелой ПЭ устанавливался при наличии двух основных критериев тяжелой степени (АГ и протеинурия) или одного основного критерия любой степени и дополнительного критерия.

Имуноферментный анализ (ИФА) проводился на базе лаборатории ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» (г. Ставрополь) под руководством главного врача Центра д. м. н., профессора Батурина В.А. С помощью ИФА проводилось определение концентрации в сыворотке крови VEGF, sFlt-1, ICAM-1 и VCAM-1, MMP-2 и MMP-9, а также TIMP-2. Стандарты, контроли и предварительно разведенные образцы сыворотки инкубировались в лунках планшета, сорбированных антителами к вышеуказанным факторам, согласно инструкциям к

стандартным тест-системам фирм Bender MedSystems GmbH (Австрия) и R&D Systems (США). Измерение оптической плотности проводилось анализатором иммуноферментных реакций УНИПЛАН (АИФР-01, ЗАО «Пикон», Россия).

Патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось в лаборатории патологии репродукции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва (главный научный сотрудник лаборатории Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор Милованов А.П.). Материалом для исследования служили участки плаценты, полученные во время операции кесарева сечения (34 плаценты от женщин с тяжелой ПЭ и 30 плацент от беременных из группы сравнения). На серийных срезах применяли готовые к применению антитела (Novocastra, Leica Microsystems) для выявления MMP-9 (клон 15W2), TIMP-1 (клон 6F6a), MMP-2 (клон 17B11) и TIMP-2 (клон 46E5). С помощью данных маркеров исследованы интерстициальный цитотрофобласт (ИЦТ), отдельные многоядерные гигантские клетки (МГК), промежуточный цитотрофобласт (ПЦТ) и материнские децидуальные клетки (ДК). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали методом полуколичественного анализа по интенсивности окраски.

Статистический анализ данных выполнен в Центре «Биостатистика» под руководством доцента, к.т.н. Леонова В. П. Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью статистического пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США) (серийный номер AXAR306F596204FA-J), а также в среде пакета SPSS Statistics Standard Edition (IBM, США). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистического критерия этой величины, принималась нулевая гипотеза. Проверка нормальности распределения количественных признаков в отдельных группах сравнения проводилась с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, Крамера-фон-Мизеса и

Андерсона-Дарлинга. Для сравнения центральных параметров групп использовались параметрические и непараметрические методы: дисперсионный анализ, в т. ч. с критерием Краскела-Уоллиса и ранговыми метками Вилкоксона, медианный критерий и критерий Ван дер Вардена [Ллойда Э. и др., 1989]. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка средних арифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего, а также коэффициента вариации. При обработке данных использовались: анализ парных таблиц сопряженности, модель логистической регрессии с пошаговым алгоритмом включения и исключения предикторов, метод канонических корреляций [Ким Дж.О., 1989].

Результаты исследования и их обсуждение

С 2009 по 2013 годы в ГБУЗ СК СККПЦ было родоразрешено 24961 беременных. За этот период диагноз «тяжелая преэклампсия» был поставлен 244 женщинам, что составляет 0,98% от всех родоразрешенных в стационаре (Таблица 1). Все пациентки были включены в основную группу первого этапа исследования.

Таблица 1 – Частота выявления умеренной и тяжелой ПЭ у беременных по данным СКПЦ с 2009 по 2013 гг.

	2009		2010		2011		2012		2013	
	абс.	%								
Количество родов	4857		5209		4880		5053		4962	
Беременные с умеренной ПЭ	244	5,02	225	4,32	241	4,94	230	4,55	220	4,43
Беременные с тяжелой ПЭ	59	1,21	46	0,88	54	1,1	44	0,87	41	0,83

Возраст беременных находился в пределах от 14 до 43 лет (средний возраст 27,62; SD 6,4). Только около четверти обследуемых беременных (58

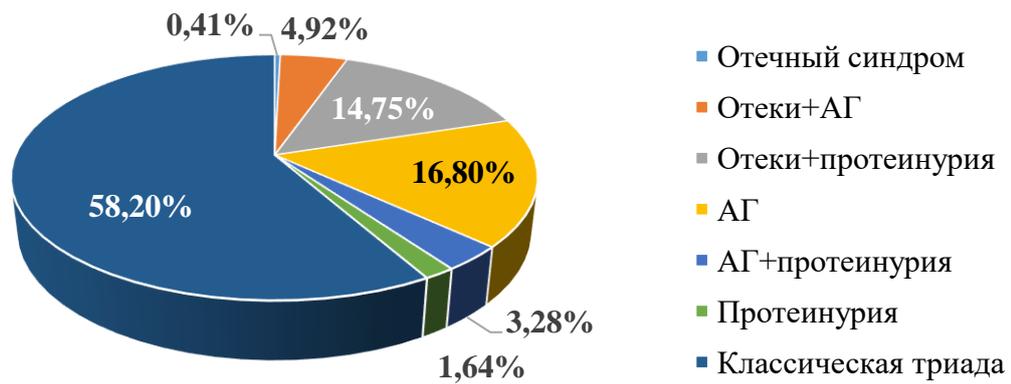
человек; 23,77%) имела неотягощенный соматический анамнез, таким образом, в этом случае мы говорили о развитии «чистой» ПЭ, что подтверждает литературные данные о соотношении «чистых» и сочетанных форм [Макаров И.О. и др., 2010].

В структуре экстрагенитальных заболеваний у беременных с тяжелой ПЭ основную долю составили заболевания сердечно-сосудистой системы (51,08%), среди которых преобладала гипертоническая болезнь. При хронической АГ изначально имеет место эндотелиальная дисфункция, которая прогрессирует в случае нарушения имплантации и иммунопатологического воспаления и некроза эндотелицитов, имеющих место при ПЭ [Айламазян Э.К., Мозговая Е.В., 2008]. Обращает на себя внимание большое количество пациенток с ожирением (87 человек; 46,77%), вплоть до его морбидных форм. Из литературы известно, что жировая ткань обладает метаболической активностью и продуцирует провоспалительные цитокины, что ассоциировано с повышением активности факторов воспаления и, как следствие, сосудистой дисфункцией и влиянием на свертывающую систему крови [O'Brien T.E. et al., 2003; Montilla M. et al., 2014].

За указанный период времени из обследованных беременных большую часть составляют нерожавшие (59,02%; 144 человека), тем самым подтверждая утверждение о том, что ПЭ в основном страдают женщины с предстоящими I родами.

В нашем исследовании мы наблюдали несколько клинических вариантов ПЭ (Рисунок 2): классическая триада Цангемейстера наблюдалась в 58,2% (142 женщины) случаев, отечно-протеинурическая форма имела место в 14,75% (36 женщин) наблюдений, на основании изолированной высокой АГ диагноз тяжелой ПЭ был поставлен в 16,8% (41 женщина), при этом к клинике присоединялись и другие критерии тяжелой ПЭ.

Рисунок 2 – Основные клинические проявления тяжелой преэклампсии

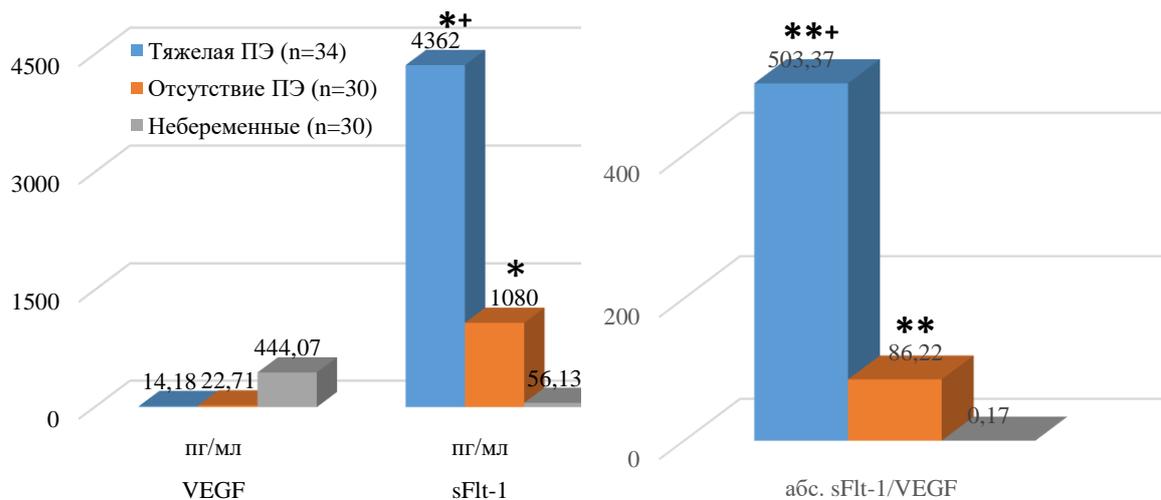


Обращает на себя внимание, что у большого количества пациенток с тяжелой ПЭ имела место плацентарная недостаточность, выражающаяся задержкой роста плода, при этом суб- (ЗРП II степени) и декомпенсация (ЗРП III степени) имели место в 13,22% (32 наблюдения) и 5,37% (13 наблюдений) соответственно. В 2 случаях осложнением тяжелой ПЭ явилась антенатальная гибель плода (в 32 и 35 недель гестации), в обоих случаях беременные были родоразрешены путем операции кесарево сечение, показанием к которой явилась прогрессирующая преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты. Критическое нарушение плодово-плацентарного кровотока имело место у 11,16% (27 пациенток) и явилось показанием к экстренному абдоминальному родоразрешению.

При анализе результатов **иммуноферментного исследования** у женщин с тяжелой ПЭ обнаружены значимые снижение концентрации VEGF и повышение сывороточного уровня sFlt-1 (Рисунок 3), что отражает изменение ангиогенного статуса беременной женщины, страдающей ПЭ, в сторону преобладания влияния антиангиогенного фактора. Обращает на себя внимание значение введенного нами суррогатного маркера sFlt-1/VEGF, отражающего отношение изучаемых факторов. При тяжелой ПЭ имеет место шестикратное повышение этого показателя, что свидетельствует о значительных изменениях в развитии и функционировании сосудистой системы плаценты и выражается значимым снижением содержания проангиогенного VEGF. Наличие отрицательной

корреляции в значениях концентраций sFlt-1 и VEGF можно объяснить способностью связывать sFlt-1 ангиогенные факторы (в первую очередь VEGF), что приводит к дисфункции эндотелиальных клеток и реализуется в виде гипертензии, протеинурии и других проявлений ПЭ.

Рисунок 3 – Содержание VEGF и sFlt-1 в сыворотке крови обследуемых женщин



Знаком (*) отмечены статистически значимые отличия групп пациенток с тяжелой ПЭ и без нее от небеременных: (*) – $p < 0,05$; (**) – $p < 0,01$. Знаком (+) отмечены статистически значимые отличия пациенток с тяжелой ПЭ от беременных женщин без ПЭ: (+) – $p < 0,05$.

При анализе взаимосвязи уровня проангиогенного VEGF-A с указанными выше параметрами самая сильная и значимая связь была найдена с протеинурией (Таблица 2).

Таблица 2 – Корреляция сывороточного уровня VEGF-A с анализируемыми параметрами

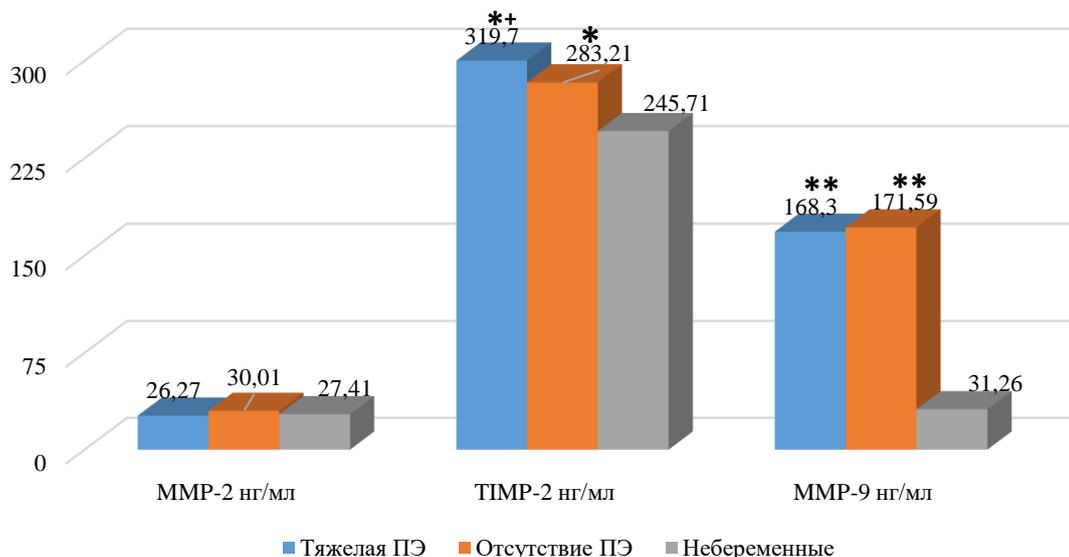
Признак	Преэклампсия n=34		Отсутствие ПЭ n=30		Небеременные n=30	
	r	p	r	p	r	p
Количество симптомов триады	-0,61	<0,0001	-	-	-	-
Протеинурия	-0,48	0,0254	-0,68	<0,0001	-	-
TIMP-2	-0,48	0,0003	-0,25	0,1027	0,26	0,0794
sVEGF-R1	-0,18	0,2143	-0,42	0,0043	-0,26	0,0849
TIMP-2/MMP-2	-0,52	<0,0001	-0,075	0,6244	-0,043	0,7798

Снижение в периферической крови VEGF-A сопряжено с увеличением теряемого с мочой белка. Полученные нами результаты подтверждают наличие патогенетического механизма, имеющего место при тяжелой ПЭ: «дефект инвазии – снижение VEGF-A – гломерулярно-капиллярный эндотелиоз – протеинурия». Также найдена значимая связь с количеством симптомов триады Цангемейстера ($r=-0,61$; $p<0,0001$). При классическом течении ПЭ (наличии отеков, протеинурии и артериальной гипертензии) уровень анализируемого ангиогенного фактора ниже, чем при ПЭ, протекающей бисимптомно или моносимптомно. В этом случае уровень VEGF отражает глубину изменений в органах и системах при тяжелой ПЭ.

При изучении концентрации металлопротеиназ 2 и 9 типа, а также тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2 типа (Рисунок 4) было определено, что при тяжелой ПЭ имеет место повышение уровня TIMP-2, концентрация же обеих металлопротеиназ изменялась незначительно. Это подтверждает мнение некоторых ученых о том, что наиболее целесообразно изучение участвующих в цитотрофобластической инвазии протеаз непосредственно на границе функциональной системы плацента-плод (т.е. в тканях плаценты, либо в пуповинной крови).

В нашем исследовании найдено значимое повышение сывороточной концентрации молекул адгезии sICAM-1 и sVCAM-1 при тяжелой ПЭ (Таблица 3).

Рисунок 4 – Содержание MMP-2, MMP-9, TIMP-2 в сыворотке крови обследуемых женщин



Знаком (*) отмечены статистически значимые отличия групп пациенток с тяжелой ПЭ и без нее от небеременных: (*) – $p < 0,05$; (**) – $p < 0,01$. Знаком (+) отмечены статистически значимые отличия пациенток с тяжелой ПЭ от беременных женщин без ПЭ: (+) – $p < 0,05$.

Таблица 3 – Содержание sICAM-1, sVCAM-1 и их соотношения sVCAM-1/sICAM-1 в сыворотке крови обследуемых женщин

Группы обследуемых	sICAM-1 нг/мл	sVCAM-1 нг/мл	sVCAM-1/sICAM-1 абс.
Тяжелая ПЭ (n=34)	270,15 ± 48,2*	1391 ± 308,33* ⁺	5,25 ± 0,78 ⁺
Отсутствие ПЭ (n=30)	231,21 ± 37,1*	966,2 ± 165,25	4,48 ± 0,51
Небеременные (n=30)	192,7 ± 24,4	981,25 ± 214,1	5,12 ± 0,64

Знаком (*) отмечены статистически значимые отличия групп пациенток с тяжелой ПЭ и без нее от небеременных: (*) – $p < 0,05$. Знаком (+) отмечены статистически значимые отличия пациенток с тяжелой ПЭ от беременных женщин без ПЭ: (+) – $p < 0,05$.

Повышенное содержание при рассматриваемом гипертензивном осложнении беременности молекул адгезии, которые являются медиаторами воспаления эндотелия, подтверждает наличие тяжелого генерализованного эндотелиоза. Кроме того, было выяснено, что соотношение sVCAM-1/sICAM-1 позволяет характеризовать состояние новорожденного: чем выше значение данного коэффициента, тем ниже оценивался по шкале Апгар в первые минуты после рождения (I минута: $r = -0,53$; $p < 0,0001$; V минута: $r = -0,46$; $p = 0,0007$). По нашему мнению, это

объясняет связь повышения сывороточного содержания растворимой формы VCAM-1, участвующей в адгезии и миграции лейкоцитов к месту воспаления и в конечном счете в повреждении эндотелия, с гипоксическим поражением плода и низкой оценкой новорожденного.

При иммуногистохимическом исследовании были определены отличия структуры плацент и экспрессии металлопротеиназ 2 и 9 типов и их ингибиторов различными типами клеток. Обнаружено, что при нормально протекающей беременности MMP-2 сохраняет слабую экспрессию только в промежуточном цитотрофобласте в составе клеточных островков (Таблица 4). Заслуживает внимания то, что достаточно выраженная иммуноположительная реакция TIMP-2 отмечена ПЦТ, ИЦТ, СТ и СТ-почках.

Таблица 4 – Иммуноэкспрессия MMP-2 и TIMP-2 в клетках нормальной плаценты и у женщин с тяжелой преэклампсией (условные баллы)

Отдельные клетки	Норма		Преэклампсия	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
Интерстициальный цитотрофобласт	+/-	-	+	++
Многоядерные гигантские клетки	+/-	+	+	+
Промежуточный цитотрофобласт	+	++	+/-	+
Синцитиотрофобласт	-	++	-	++
Синцитиальные почки	-	++	-	++
Децидуальные клетки	-	-	+/-	-

Достаточно демонстративной оказалась иммуноэкспрессия TIMP-2, которая выявлялась в скоплениях ИЦТ в поверхностном слое децидуальной оболочки и демонстрировала в этих клетках достаточную активность этого ингибитора, который продуцировался в самих инвазивных клетках, осуществляя аутокринное сдерживание их дальнейшего продвижения вглубь эндо- и миометрия. Этот же эффект снижения протеолитической активности ИЦТ и МГК дополнялся высокой иммуноэкспрессией TIMP-2 в

синцитиотрофобласте многочисленных ворсин, а также в его производных структурах – синцитиальных почках.

При анализе экспрессии другой пары (ММР-9 и TIMP-1) в доношенной плаценте отмечена достаточная иммуноэкспрессия ММР-9 в инвазивных клетках (Таблица 5).

Таблица 5 – Иммуноэкспрессия ММР-9 и TIMP-1 в клетках нормальной плаценты и у женщин с тяжелой преэклампсией (условные баллы)

Отдельные клетки	Норма		Преэклампсия	
	ММР-9	TIMP-1	ММР-9	TIMP-1
Интерстициальный цитотрофобласт	+	+	+	+
Многоядерные гигантские клетки	+	-	+	+
Промежуточный цитотрофобласт	-	+	+	++
Синцититрофобласт	+/-	+	-	-
Синцитиальные почки	-	+	-	-
Децидуальные клетки	+/-	+/-	+	+/-

Несмотря на завершение активности цитотрофобластической инвазии в конце беременности, сохраняется иммуноэкспрессия ММР-9 в поверхностном слое ИЦТ, под фибриноидом Рора и в инвазивных клетках, проникающих вглубь децидуальной оболочки. Этой реакции соответствует и примерно такая же степень иммуноэкспрессии TIMP-1 в ИЦТ.

Полученные нами результаты согласуются между собой: значимое повышение концентрации TIMP-2, обладающего антиангиогенной ММР-зависимой активностью, в сыворотке крови пациенток с тяжелой ПЭ совпадает с выраженной его экспрессией структурами плаценты, в первую очередь ИЦТ, чего ранее в исследованиях, посвященных обсуждаемой проблеме, выявлено не было. ММРs же, несмотря на повышение их концентрации в крови при тяжелой ПЭ, не продемонстрировали значительной локальной экспрессии. Этот факт объясняется подавлением протеаз в крови своими ингибиторами [127], в результате чего в сыворотке

MMPs обнаруживаются в большой концентрации, но являются неактивными, и их концентрация уровень экспрессии тканями достоверно не отражает.

Изучая ангиогенные факторы, мы можем говорить, что наиболее информативным иммуногистохимическим маркером тяжелой ПЭ в III триместре является сохранение высокой экспрессии TIMP-2. Влияние этого фактора на неполноценное образование MMP-2 и неадекватную трофобластическую инвазию происходит еще в I-II триместрах, однако даже и к доношенному сроку гестации он активно продуцируется синцитиотрофобластом ворсин и в синцитиальных почках.

ВЫВОДЫ

1. У большей части беременных Ставропольского края с тяжелой ПЭ (58,2%) наблюдается классическая симптоматика ПЭ с наличием триады Цангемейстера. Тяжелая ПЭ значительно влияет на срок и метод родоразрешения (абдоминально родоразрешены 70,5%, досрочное родоразрешение имело место в 61,07% наблюдений). Характерна низкая масса новорожденных от матерей с тяжелой ПЭ (2240,92 гр., SD 836,66), большая часть (65,7%) оценивается по Апгар в 5-7 баллов, выхаживание детей требует длительного пребывания в стационаре с переводом на второй этап выхаживания (67,35%) и использования современных реанимационных мероприятий (ИВЛ, препараты сурфактанта).

2. У беременных с тяжелой ПЭ в сыворотке крови концентрация антиангиогенного фактора sFlt-1 значительно выше по сравнению со беременными без гипертензивных расстройств ($4362 \pm 570,12$ и 1080 ± 435 пкг/мл соответственно; $p < 0,05$), значение соотношения sFlt-1/VEGF почти в 6 раз значительно выше у пациенток с тяжелой ПЭ (503 ± 67 и $86,22 \pm 11,81$ соответственно; $p < 0,01$).

3. При тяжелой ПЭ сывороточный уровень молекул адгезии как показателей эндотелиальной дисфункции выше, между ними определяется

высокая положительная связь ($r=0,74$; $p<0,0001$), значимая разница имеет место при рассмотрении sVCAM-1 ($1391\pm308,33$ и $966,2\pm165,22$ нг/мл соответственно; $p<0,05$).

4. При тяжелой ПЭ концентрация металлопротеиназ 2 и 9 типов как одних из ключевых факторов инвазии, а также их ингибиторов отличается от таковой в норме. Наиболее показательно значимое повышение концентрации TIMP-2 при тяжелой ПЭ ($319,7\pm22,08$ и $283,21\pm17,18$ нг/мл соответственно; $p<0,05$).

5. У пациенток с тяжелой ПЭ сывороточный уровень проангиогенного VEGF-A и значение впервые введенного соотношения sFlt-1/VEGF-A значимо связаны с классическими клиническими проявлениями ПЭ: гипертензией, протеинурией и отеками ($r=-0,61$; $p<0,0001$ и $r=-0,59$; $p<0,0001$). Показатель sFlt-1/VEGF-A (как и содержание TIMP-2) значимо коррелирует с уровнем протеинурии при тяжелой ПЭ ($r=0,85$; $p<0,0001$ и $r=0,56$; $p=0,0062$ соответственно). При рассматриваемом осложнении гестации значение sFlt-1/VEGF-A значимо коррелирует с оценкой состояния новорожденного по Апгар (на I минуте: $r=-0,53$; $p<0,0001$; V минута: $r=-0,46$; $p=0,0007$). При тяжелой ПЭ концентрация VEGF-A зависит от показателей системы гемостаза ($R=-0,656$), а при анализе отношений ангиогенного статуса и показателей функции почек демонстрируют наибольший вклад sFlt-1 ($R=0,6445$) и sVCAM-1 ($R=0,7232$).

6. При тяжелой ПЭ выявляется высокая иммуноэкспрессия TIMP-2 в скоплениях ИЦТ (пример паракринной регуляции, необходимой для сдерживания цитотрофобластической инвазии в последние месяцы беременности) и средняя степень экспрессии TIMP-2 в МГК, ПЦТ и СТ (преобладание аутокринного снижения синтеза MMP-2 в собственных инвазивных клетках). Впервые доказана положительная корреляция сывороточного содержания TIMP-2 при тяжелой ПЭ с выраженной его экспрессией структурами плаценты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Наряду с основными критериями тяжелой ПЭ (гипертензия, протеинурия, отеки) нужно выделить дополнительные признаки, свидетельствующие о тяжелой ПЭ: повышение азота мочевины, креатинина, фибриногена, АсТ, АлТ и общего билирубина. Данные признаки показали значимую связь в ходе многомерного статистического анализа с основными проявлениями тяжелой ПЭ (гипертензией, протеинурией и отечным синдромом).

2. С целью улучшения перинатальных исходов и своевременного родоразрешения пациенток с тяжелой ПЭ в стационарах высокой степени риска необходимо определение отношения сывороточного содержания sFlt-1/VEGF и концентрации TIMP-2, изменения которых являются маркерами нарушения инвазии и эндотелиальной дисфункции и тесно связаны с перинатальными исходами. Шестикратное повышение указанного соотношения по сравнению с нормально протекающей беременностью и концентрацию TIMP-2 более 300 нг/мл нужно рассматривать как индикаторы тяжелой ПЭ.

3. Выявленные при морфологическом и иммуногистохимическом исследованиях плацент особенности могут являться основанием для применения в группах риска по развитию тяжелой ПЭ и после ее манифестации препаратов, улучшающих реологические свойства крови и маточно-плодово-плацентарный кровоток. К таким препаратам в первую очередь следует отнести аспирин и низкомолекулярные гепарины.

СПИСОК РАБОТ,

ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Андросова, О.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика артериальной гипертензии во время беременности / О.В. Андросова, А.А. Дубовой, В.А. Аксененко // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** – 2012. – № 4. – С. 91-92.

2. Аксененко, В.А. Уровень матриксных металлопротеиназ-2, 9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-2 при тяжелой преэклампсии // В.А. Аксененко, А.А. Дубовой // **Доктор.ру.** – 2014. – № 1 (89). – С. 64-68.
3. Милованов, А.П. Оценка иммуногистохимической экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 типа и её ингибитора 1 типа в плацентарной ткани при поздней тяжелой преэклампсии / А.П. Милованов, А.А. Дубовой, В.А. Аксененко, И.М. Расстригина, Т.В. Фокина, Т.Н. Никольская // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** – 2015. – № 2. – С. 144-147.
4. Дубовой, А.А. Роль тяжелого гестоза в структуре показаний к операции кесарево сечение / А.А. Дубовой // **Вестник Российского государственного медицинского университета.** – 2011. - № 1. – С. 33-34.
5. Дубовой, А.А. Опыт ведения беременных с тяжелым гестозом / А.А. Дубовой // **Материалы XII Всероссийского научного форума «Мать и дитя».** – М: 2011. – С. 58.
6. Дубовой, А.А. Молекулы адгезии ICAM-1 и VCAM-1 как показатели степени тяжести гестоза / А.А. Дубовой // **Материалы VI регионального научного форума «Мать и дитя».** – Ростов-на-Дону: 2012. – С. 41.
7. Дубовой, А.А. Перспективы изучения биомаркеров-предикторов развития гестоза и его осложнений / А.А. Дубовой // **Вестник молодого ученого.** – 2012. – Ставрополь. - № 1. – С. 34-39.
8. Андросова, О.В. Особенности церебрального кровообращения у беременных с гипертензионным синдромом / О.В. Андросова, А.А. Дубовой // **Материалы V Всероссийского образовательного Конгресса "Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии".** – М: 2012. – С. 3-5.
9. Дубовой, А.А. Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в развитии преэклампсии / А.А. Дубовой // **Материалы научно-практической конференции с международным участием «Инновации молодых ученых».** – Ставрополь: 2012. – С. 215-221

10. Дубовой, А.А. Некоторые аспекты эпидемиологии тяжелой преэклампсии / А.А. Дубовой, Н.В. Леньшина // Материалы VII Международного конгресса по репродуктивной медицине. – М: 2013. – С.130-132
11. Черкасов, И.А. Тяжелая преэклампсия в современном акушерстве / И.А.Черкасов, А.А. Дубовой, Н.В. Леньшина, Ю.Н. Фефелова, М.А. Минаева // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье населения – основа процветания России». – Анапа: 2013. – С.338-339
12. Dubovoy, A. Arterial hypertension in pregnancy / A. Dubovoy, V. Aksenenko, N. Lenshina // Journal of Perinatal Medicine. – 2013. – Vol. 41, s.1. – P. 561.
13. Леньшина, Н.В. Изучение факторов ангиогенеза при развитии тяжелой преэклампсии / Н.В. Леньшина, А.А. Дубовой // Материалы V Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013»
14. Aksenenko, V. Matrix metalloproteinases and its inhibitors: the role in the pathogenesis of preeclampsia / V. Aksenenko, A. Dubovoy, O. Androsova // Materials of The 18th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). – Vienna: 2013. – P. 156.
15. Aksenenko, V. Vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase: is there a correlation with clinical manifestations of severe preeclampsia? / V. Aksenenko, A. Dubovoy, I. Nezhdanov, I. Vasilyev // Materials of The 20th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). – Paris: 2014. – P. 154.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПЭ	преэклампсия
ГБУЗ СК СККПЦ	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ставропольского края Ставропольский краевой клинический перинатальный центр
VEGF-A	сосудистый эндотелиальный фактор роста-A
sFlt-1	растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1
sICAM-1	межклеточная молекула адгезии-1
sVCAM-1	сосудистая молекула адгезии-1
MMP-2	матриксная металлопротеиназа 2 типа
MMP-9	матриксная металлопротеиназа 9 типа
MMPs	металлопротеиназы
TIMP-1	тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1
TIMP-2	тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-2
ИЦТ	интерстициальный трофобласт
ДК	децидуальные клетки
МГК	многоядерные гигантские клетки
ИФА	иммуноферментный анализ
ЗРП	задержка роста плода