

На правах рукописи

ХАРЧЕНКО

Дарья Константиновна

**ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ:
ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор биологических наук, профессор

Кан Наталья Енқыновна
Асташкин Евгений Иванович

Официальные оппоненты:

Доброхотова Юлия Эдуардовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, заведующая

Цахилова Светлана Григорьевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии стоматологического факультета, профессор

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «18» февраля 2019 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<http://www.science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Harchenko%20D.K.%20-%20dissertation.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Преэклампсия (ПЭ) относится к числу наиболее серьезных гипертензивных нарушений в связи с ее влиянием на здоровье беременной и новорожденного [Steeegers E.A. et al., 2010; Серов В.Н., 2017; Сидорова И.С. и соавт., 2017; Ji L. et al., 2017]. Несмотря на большой интерес исследователей к данной проблеме, патогенез ПЭ изучен недостаточно [Сухих Г.Т. и соавт., 2017; Yildirim Z.K. et al., 2016; Tamblyn J.A. et al., 2017]. К основным теориям возникновения и развития данного осложнения относят нарушение инвазии трофобласта, развитие синдрома системной воспалительной реакции, нарушение иммунологической толерантности и др. [Ходжаева З.С. и соавт., 2016; Shaheen A. et al., 2016; Salsoso R. et al., 2017]. Немаловажное значение в патогенезе ПЭ отводится оксидативному стрессу [Доброхотова Ю.Э. и соавт., 2019; Шмаков Р.Г. и соавт., 2019; Adu-Bonsaffoh K. et al., 2017]. Вследствие нарушения баланса про- и антиоксидантной систем, сопровождающегося избыточной продукцией АФК (активные формы кислорода) и усилением свободнорадикальных процессов происходит развитие эндотелиальной дисфункции и системного воспалительного ответа [Тютюнник В.Л. и соавт., 2018; Ali L.E. et al., 2018; Yi Y. et al., 2018]. Однако, несмотря на пристальное внимание исследователей к изучению данного осложнения беременности, полиэтиологичность и системность ПЭ обуславливает многообразие патогенетических звеньев, и как следствие, недостаточную диагностическую и прогностическую ценность предложенных методов исследования. В связи с чем, продолжаются исследования, посвященные поиску потенциальных маркеров ПЭ.

Ряд ученых исследовали диагностическую ценность биохимических маркеров сыворотки крови, используемых при скрининге в I триместре беременности, но результаты показали их недостаточную прогностическую ценность [Иванец Т.Ю., 2018]. В связи с вышеизложенным обоснованными являются исследования по выявлению новых маркеров развития ПЭ. Интерес пред-

ставляет изучение модифицированных трофобластов, нейтрофилов, участвующих в формировании системного воспалительного ответа при ПЭ. Было высказано предположение о том, что феномен праймирования нейтрофилов развивается задолго до начала клинических проявлений симптомов ПЭ и может быть выявлен с помощью инструментальных методов в образцах крови пациенток [Асташкин Е.И. и соавт., 2017; Miralda I. et al. 2017]. С током крови преактивированные фагоциты распространяются по всему организму, разрушают слой эндотелиальных клеток микрососудов, формируют порочные циклы, важную роль в которых играет подавление апоптоза нейтрофилов [Кан Н.Е. и соавт., 2017; Maruyama N. et al., 2017; Yücel B., Ustun B., 2017]. Вместе с тем, следует отметить, что работы, посвященные изучению роли оксидативного стресса в патогенезе ПЭ, описывают изменения баланса про- и антиоксидантной систем, но не приводятся описания динамики изменений уровня свободно-радикального окисления при непрерывной регистрации «дыхательного взрыва». Кроме того, недостаточно работ посвящено определению взаимосвязи нарушения баланса про- и антиоксидантной систем с ангиогенными факторами, а также влиянию окислительного стресса на развитие апоптоза в условиях ПЭ.

В связи с вышеизложенным интерес представляет изучение динамики продукции АФК при ПЭ с уточнением их роли в развитии системного воспалительного ответа для выделения новых диагностических и прогностических критериев.

Степень разработанности темы исследования

Многогранность патогенеза ПЭ обуславливает то, что на сегодняшний день, не существует ни одного теста с достаточной чувствительностью и специфичностью, обеспечивающего раннюю диагностику и прогнозирование развития данного осложнения. Перспективным является определение неинвазивных маркеров, в том числе маркеров оксидативного стресса, а также медиаторов, участвующих в регуляции вышеуказанных процессов, что требует проведения дальнейших исследований.

Цель исследования

Оптимизация диагностики и прогнозирования преэклампсии на основании изучения особенностей оксидативного стресса для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Задачи исследования

1. Представить исходную клиническую характеристику беременных с преэклампсией различной степени тяжести и охарактеризовать особенности течения беременности и родов, послеродового периода, состояния плодов и новорожденных.
2. Оценить уровень оксидативного стресса при преэклампсии различной степени тяжести и физиологической беременности на основании изучения спонтанной генерации радикалов кислорода фагоцитами крови.
3. Выявить влияние стандартных стимуляторов (формил пептид и форболовый эфир) на уровень оксидативного стресса при преэклампсии.
4. Изучить влияние плазмы крови беременных с преэклампсией на продукцию активных форм кислорода и апоптоз перевиваемых нейронов.
5. Определить изменения уровней трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) при преэклампсии различных степеней тяжести и форм.
6. Разработать алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии для снижения акушерских осложнений и улучшения перинатальных исходов.

Научная новизна

Изучено состояние клеток крови и определено содержание преактивированных фагоцитов по уровню «спонтанного» образования радикалов кислорода, и доказано, что развитие преэклампсии ассоциировано с увеличением числа нейтрофилов в преактивированном состоянии.

Проведена оценка ответа преактивированных фагоцитов на стандартные стимуляторы при физиологической беременности и при преэклампсии и

показано, что данное осложнение характеризуется увеличением генерации активных форм кислорода в ответ на стимуляцию формил пептидом и форболовым эфиром.

Установлена корреляция развития ранней преэклампсии с TGF- β 3 изоформой, что позволяет предположить его регуляторную роль в патогенезе данного осложнения.

Выявлено увеличение генерации активных форм кислорода (АФК) при воздействии амниотической жидкости и плазмы крови беременных с преэклампсией на нейроны, что свидетельствует об их способности к индукции оксидативного стресса.

Показано, что плазма крови беременных с преэклампсией обладает проапоптогенным действием, которое выражается в увеличении фрагментации ДНК нейронов при ее воздействии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Уточнены клинические факторы, позволяющие выделить группы риска развития преэклампсии.

Оценка содержания преактивированных нейтрофилов в крови беременных позволяет определить риск развития тяжелой преэклампсии.

Определение уровня свободно-радикального окисления в ответ на стимуляцию формил пептидом позволяет прогнозировать развитие тяжелой формы преэклампсии.

На основании оценки уровня TGF- β 3 целесообразно выделить группы беременных по развитию ранней преэклампсии.

Разработанный алгоритм диагностики и профилактики преэклампсии позволяет снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Положения, выносимые на защиту

1. К клиничко-anamnestическим факторам риска преэклампсии следует относить отягощенный семейный анамнез по преэклампсии и заболеваниям сердечно-сосудистой системы, а также наличие миомы матки и первичного

бесплодия. Течение беременности характеризуется высокой частотой акушерских (угроза прерывания беременности с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре, ранним токсикозом и синдромом задержки роста плода) и неонатальных (экстремально низкая масса плода при рождении, респираторный дистресс-синдром, врожденная пневмония) осложнений. При этом данная тенденция наиболее выражена при ранней преэклампсии.

2. TGF- β 3 изоформа играет значимую роль в патогенезе преэклампсии и является диагностическим маркером ее различных форм. Определение отношения нейтрофилов к лимфоцитам в периферической крови беременных с преэклампсией является доступным и достоверным критерием оценки степени ее тяжести.

3. Преэклампсия сопровождается увеличением содержания преактивированных нейтрофилов, характеризующихся статистически значимо высокой «спонтанной» генерацией супероксид анионов и радикалов кислорода при воздействии низких доз праймирующих агентов. Увеличение фрагментации ДНК нейронов под влиянием плазмы крови пациенток с преэклампсией отражает ее влияние на уровень апоптоза.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении и постановке целей и задач работы, разработке дизайна, систематизации данных литературы по теме диссертации и анализе клинико-anamнестических данных. Автор осуществлял ведение части пациентов в дородовом и послеродовом периоде, проводя родоразрешение и забор биологического материала. Диссертантом проведен анализ медицинской документации, статистическая обработка данных и научное обобщение полученных результатов.

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 1, 2, и 4 паспорта «акушерство и гинекология».

Апробация работы

Основные положения работы представлены на: X^{ом} Юбилейном региональном научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Геленджик, 2017), XII^{ом} международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2018), XIX^{ом} Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2018)

Обсуждение диссертации состоялось на межклинической научной конференции сотрудников акушерских отделений (16 июня 2019 года) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (17 сентября 2019 года, протокол №10)

Внедрение результатов исследования

Алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии, а также материалы диссертации используются в учебном процессе в виде практических занятий и лекций для клинических ординаторов, аспирантов, а также для повышения квалификации врачей акушеров-гинекологов из различных регионов России.

Разработанная на основании полученных результатов тактика ведения беременности у женщин группы риска по развитию преэклампсии используется в практической деятельности акушерских отделений ФГБУ «НМИЦ АГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 164 страницах и состоит из введения, пяти глав, выводов и практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 39 рисунками. Список литературы включает 217 источников, из них 14 работ отечественных и 203 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В одномоментное поперечное исследование было включено 250 женщин, поступивших и родоразрешенных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.И. Кулакова» Минздрава России в период с сентября 2016 по май 2019 года. Пациентки, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: группу I составили 60 беременных с преэклампсией (ПЭ), группу II – 155 условно здоровых беременных с неотягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом и физиологическим течением данной беременности. Кроме того, пациентки группы I были разделены на Ia подгруппу – ранняя ПЭ (n=35) с манифестацией до 34 недели гестации и Ib – поздняя ПЭ (n=25) с дебютом после 34 недель беременности.

Клинико-лабораторное обследование беременных проводилось в полном объеме согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 ноября 2012 года № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)». Беременные были ознакомлены с целью и методами исследования, дали письменное информированное согласие. Группы обследуемых были сопоставимы по возрасту, паритету, клинической характеристике. Был проведен корреляционный анализ анамнестических данных пациенток с развитием ПЭ для выявления факторов риска. Кроме стандартных методик в работе использовали изолирование нейтрофилов в бесцветной среде Хенкса, определение спонтанного и индуцированного стандартными стимуляторами образование радикалов кислорода при помощи хемилюмениценции, определение концентрации трансформирующего фактора роста β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) в плазме периферической крови (ЭДТА) мультиплексным методом [Иванец Т.Ю. и соавт., 2015] и регистрацию клеточной гибели клеток методом флуоресцентной микроскопии с использованием Hoechst 33342.

Критерии включения беременных в группы исследования: беременные со сроком от 25 до 40 недель 6 дней, возраст беременных от 18 до 45 лет, одноплодная беременность, наступившая в естественном цикле, осложненная преэклампсией. Критерии невключения: многоплодная беременность, беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий, острые и обострение хронических воспалительных заболеваний, тяжелая экстрагенитальная патология, гестационная артериальная гипертензия, врожденные пороки плода. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в данном исследовании, которое было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава РФ. Результаты вносились в специально разработанную для данного исследования тематическую карту и в электронные таблицы с последующим анализом при помощи современных статистических методов.

Результаты исследования и их обсуждение

Все пациентки, включенные в исследование, были сопоставимы по исходной клинико-anamnestической характеристике. Однако в основной группе преобладали беременные старшей возрастной группы и нарушением жирового обмена. Средний возраст составил $32 \pm 5,3$ и $29,2 \pm 4,2$ лет, индекс массы тела (ИМТ) – $28,4 \pm 5,1$ и $25,4 \pm 3,31$ соответственно по группам ($p < 0,05$). Следует отметить, что анамнез пациенток основной группы достоверно чаще был отягощен заболеваниями сердечно-сосудистой системы ($n=14$, 23,3%) (OR=2,6 (1,2-5,7), ($p < 0,05$)). Кроме того, в основной группе статистически значимо чаще встречались мультигенные тромбофилии ($n=12$, 19,1%) (OR=1,8 (0,8-3,9), $p > 0,05$). Следует отметить, что полиморфизмы генов тромбофилии высокого риска (гомозиготная мутация фактора V Лейдена) достоверно чаще встречались в подгруппе женщин с тяжелой преэклампсией по сравнению с группой сравнения ($n=7$, 11,6%) (OR=4,4 (1,7-15,3), $p < 0,05$) и подгруппой с умеренной преэклампсией ($n=2$, OR=8,8) (3,2-23,9), $p < 0,05$).

Среди гинекологических заболеваний у пациенток с преэклампсией чаще отмечались миома матки ($n=10$, 15,9%) (OR=4,9 (1,8-14,3), $p < 0,005$) и

бесплодие ($n=11$, 6,6%) ($OR=4,7$ (1,7-12,9), $p<0,05$). Достоверных различий в частоте воспалительных заболеваний органов малого таза не выявлено.

При изучении паритета и исхода предыдущих беременностей было установлено, что в основной группе статистически чаще отмечались искусственные аборты ($n=13$, 21,6%) ($OR=2,6$ (1,1-5,8), $p<0,05$), антенатальная гибель плода ($n=3$, 5%) ($OR=5,8$ (1,6-52,5), $p<0,05$) и преждевременные роды ($n=5$, 8,3%), ($OR=6,8$ (1,9-14,5), $p<0,05$)

Анализ течения настоящей беременности установил, что в основной группе I триместр гестации достоверно чаще осложнялся угрозой прерывания с образованием ретрохориальной гематомы ($n=20$, 33,3%) ($OR=7,3$ (3,1-16,7), $p<0,001$). Следует отметить, что угроза прерывания беременности в I триместре была значимо чаще только у женщин с тяжелой преэклампсией в отличие от группы сравнения ($n=13$, 13,7%) ($OR=3,1$ (0,8-11,8), $p<0,05$) и умеренной ПЭ ($n=5$, 15,3%) ($OR=7,7$ (0,8-89,9), $p<0,05$). Анализ течения беременности во II триместре показал, что угроза прерывания достоверно чаще встречалась у женщин основной группы– ($n=26$, 43,5%) ($OR=3,1$ (1,6-5,8), $p<0,001$). В данной группе в 6 раз чаще отмечалось нарушение фето- и маточно-плацентарного кровотоков по данным доплерометрии ($n=17$, 28,3%) ($OR=3,8$ (2,6-14,5), $p<0,001$) и в 9 раз чаще синдром задержки роста плода ($n=17$, 29,5%) ($OR=5,8$ (0,6-52,5) $p<0,005$). При анализе течения III триместра беременности было выявлено, что достоверно чаще в основной группе встречалась угроза преждевременных родов ($n=10$, 16,6%) ($OR=2,6$ (1,0-6,5), $p<0,05$) и маловодие по данным ультразвукового исследования ($n=2$, 3,3%) ($OR=3,9$ (1,9-5,5), $p<0,001$).

Следует отметить, что структура родоразрешения существенно различалась между группами. Самопроизвольные роды были значимо чаще в группе сравнения ($n=132$, 85,2%) ($OR=0,1$ (0,05-0,2), $p<0,005$). В группе женщин с ПЭ в 8 раз чаще была произведена операция кесарева сечения в экстренном порядке ($n=19$, 31,8%) ($OR=11,5$ (4,3-30,7), $p<0,005$) и в 6 раз чаще в плановом

порядке (n=22, 36,5%) (OR=8,4 (3,6-19,2), p<0,005). Важно отметить, что операция кесарева сечения в экстренном порядке выполнялась достоверно чаще в подгруппе с тяжелой ПЭ (n=6, 23,6%) (OR=0,24 (0,1-0,7), p<0,05).

У детей, рожденных от матерей с преэклампсией достоверно чаще диагностировали врожденную пневмонию (n=41, 25,7%) (OR=9,5 (2,1-42,8), p<0,05) и респираторный дистресс-синдром (n=13, 22,9%) (OR=8,2 (1,8-37,2), p<0,05). Асфиксия новорожденных наблюдалась в 2,7 раз чаще в основной группе (n=25, 14,8%) (OR=3,1 (0,8-11,8), p<0,05). Экстремально низкая масса тела новорожденных при рождении также отмечались чаще у детей от матерей с тяжелой ПЭ по сравнению с умеренной ПЭ (n=7, 25,9%) (OR=9,0 (1,1-79,1) p>0,05).

Ввиду того, что до настоящего времени нет работ с предложенными эффективными методами диагностики и прогнозирования, ведется поиск новых маркеров. Общеизвестно, что при преэклампсии связь между множественными компонентами системной воспалительной реакции осуществляется с помощью различных медиаторов.

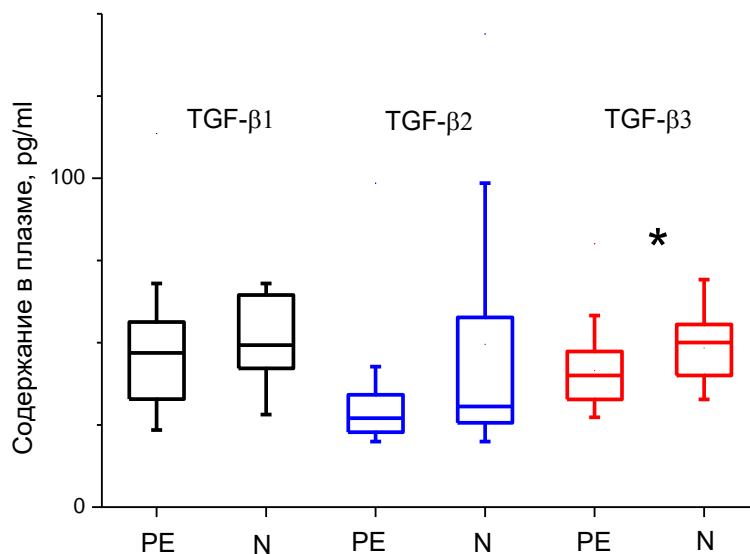


Рис. 1. Концентрация изоформ TGF-β 1, TGF-β2 и TGF-β3 в плазме крови при физиологической беременности и у пациенток с преэклампсией

Одним из них является трансформирующий фактор роста (TGF)- β , участвующий в регуляции пролиферации, инвазии и дифференцировки клеток трофобласта [Асташкин Е.И. и соавт., 2018; Xu Y.T. et al., 2017; Prunier C. et al., 2019]. Ряд исследователей считает, что именно TGF- β 3 изоформа ингибирует инвазивную способность трофобласта [Cantelli G. et al., 2017].

Нами установлено, что в крови женщин с преэклампсией концентрация TGF- β 3 ниже по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$), а уровни TGF- β 1 и TGF- β 2 не отличались от группы сравнения (рис.1).

Использование ROC-анализа показало высокую диагностическую ценность (чувствительность 94%, специфичность 60%, AUC=0,8) определения уровня TGF- β 3 для раннего прогноза развития преэклампсии (рис. 2).

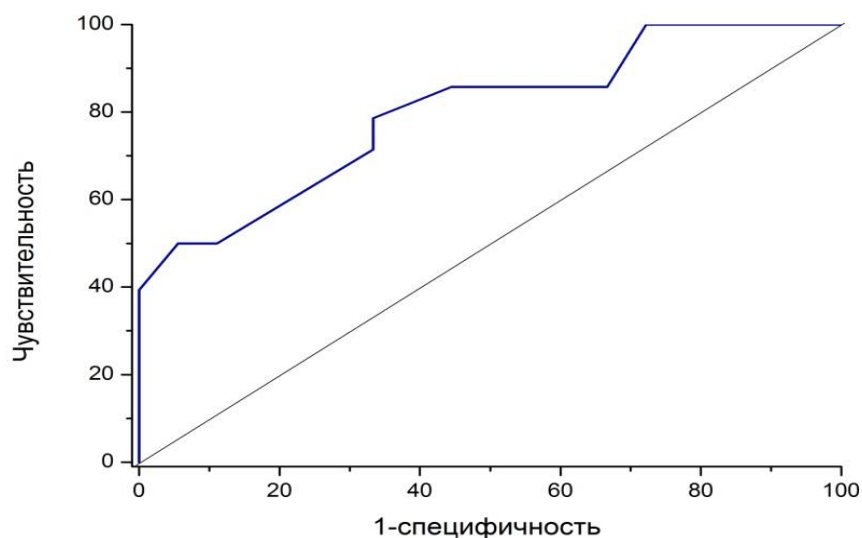


Рис.2. ROC-кривая содержания изоформы TGF- β 3 в плазме крови у женщин с преэклампсией и в группе сравнения

Полученные результаты позволяют предполагать, что TGF- β 3 может являться предиктором развития заболевания. Следует отметить, что до настоящего времени не проводилось аналогичных исследований, включающих оценку в периферической крови всех трех изоформ TGF- β .

В последние годы в ряде работ все большее значение отводится новым подходам к интерпретации рутинных лабораторных анализов, в том числе клинического анализа крови [Иванец Т.Ю. и соавт., 2018; Kim M.A. et al., 2017].

Было показано, что отношение нейтрофилов к лимфоцитам, тромбоцитов к лимфоцитам и средний объем (MPV) были значимо выше у женщин с ПЭ что может рассматриваться клиническим маркером в прогнозировании ее тяжести [Singh A. et al., 2017]. В тоже время в работах приводятся противоречивые данные указывающие, на отсутствие статистически значимых различий в вышеуказанных показателях при тяжелой ПЭ, [Yücel B. et al. 2017].

В связи с чем было определено содержание нейтрофилов, лимфоцитов, тромбоцитов, отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), отношение тромбоцитов к лимфоцитам (PLR), средний объем тромбоцита (MPV), анизоцитоз тромбоцитов (PDW). Результаты показали, что в крови женщин с ПЭ количество тромбоцитов было статистически значимо ниже ($p < 0,05$), а средний объем тромбоцита (MPV) и ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). Кроме того, для подгруппы женщин с поздней ПЭ были выявлены достоверные различия в отношении нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) ($p < 0,05$), среднего объема тромбоцитов (MPV) ($p < 0,005$) и анизоцитоза тромбоцитов (PDW) ($p < 0,05$).

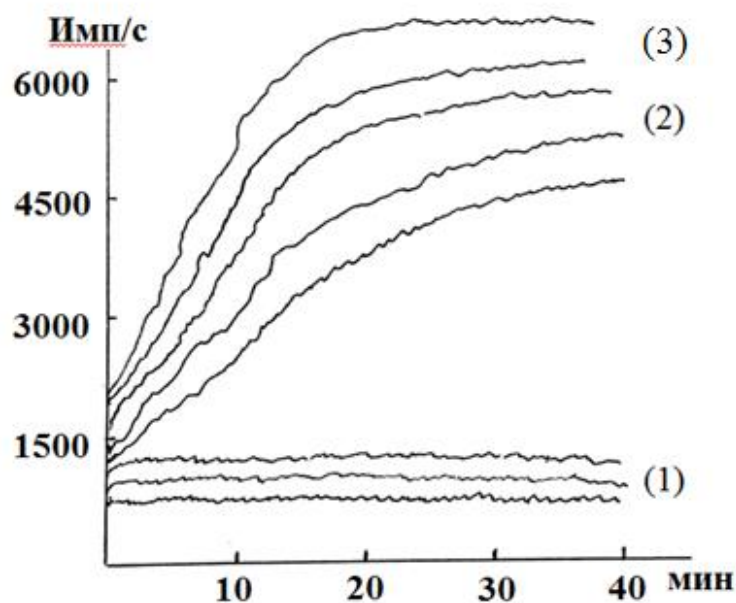


Рис.3. «Спонтанное» образование $O_2^{\cdot-}$ нейтрофилами небеременных женщин (1), при физиологическом течении беременности (2) и при преэклампсии (3)

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению роли оксидативного стресса, наибольший интерес представляет оценка непрерывной динамики изменений образования радикалов кислорода в течение ПЭ. В связи с чем, проведено определение уровня супероксид анионов в суспензиях нейтрофилов периферической крови. У небеременных выявлено увеличение его уровня со временем в пределах 1000-1500 имп/с, при физиологической беременности 3000-3500 имп/с. При преэклампсии нейтрофилы генерировали радикалы кислорода «спонтанно» и через 20-25 минут их уровень достигал максимальных значений (рис. 3).

На следующем этапе исследования к суспензиям клеток женщин трех групп добавляли формил пептид (fMLP, 2 мкМ), добавление которого увеличивает уровень супероксидов в суспензии нейтрофилов небеременных женщин в незначительной степени – в 1,3 раза. Максимальный ответ на формил пептид при беременности был больше, но никогда не достигал значений, наблюдаемых при преэклампсии. Кроме того, при преэклампсии после спонтанного образования супероксидов формил пептид (fMLP, 2 мкМ) индуцировал выраженный «дыхательный взрыв» в суспензиях нейтрофилов. Так после достижения максимальных значений, уровень свободных радикалов снижался и выходил на некоторый постоянный уровень (рис. 4).

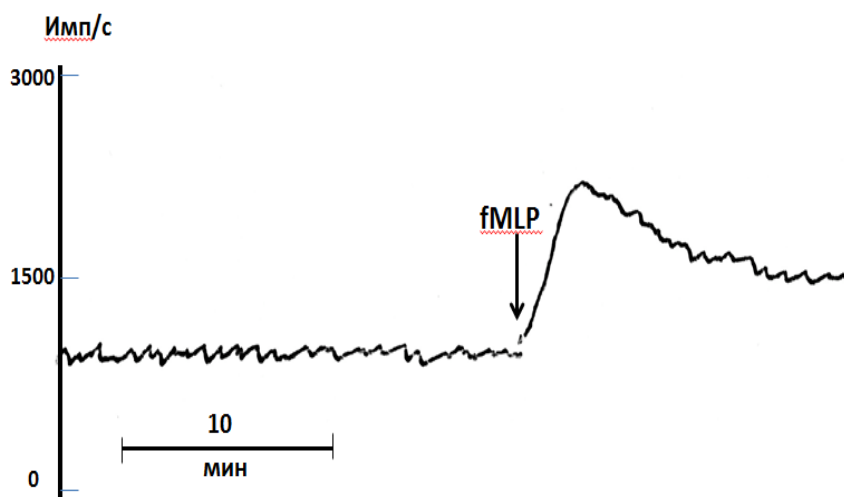


Рис 4. Типичное «спонтанное» образование $O_2^{\cdot -}$ и ответ на fMLP нейтрофилов при преэклампсии

Также были проведены исследования по влиянию форболового эфира (РМА). Формил пептид (0,1 мкМ) выраженным образом стимулировал увеличение супероксидов, а РМА (0,1 мкМ) слабо влиял на этот процесс. В то же время, при увеличении концентрации, РМА начинал доза-зависимым образом стимулировать генерацию радикалов кислорода.

Принимая во внимание полученные результаты, свидетельствующие о развитии неадекватного оксидативного стресса при ПЭ, интерес представляет изучение влияния амниотической жидкости и плазмы беременных с ПЭ на апоптоз. Сравнительное исследование воздействия плазмы и амниотической жидкости на жизнеспособность нейронов (SK-N-SH) показало, что плазма и амниотическая жидкость при физиологической беременности не оказывают значительного влияния (по сравнению с контрольными клетками) на жизнеспособность клеток при их культивировании (PI – положительных клеток не более ~ 10%). Исследование влияния плазмы беременных с преэклампсией на образование активных форм кислорода в клетках показало значительную активацию продукции АФК по сравнению с контролем и группой сравнения. При этом, амниотическая жидкость беременных с ПЭ активировала продукцию АФК клетками в большей степени, чем плазма

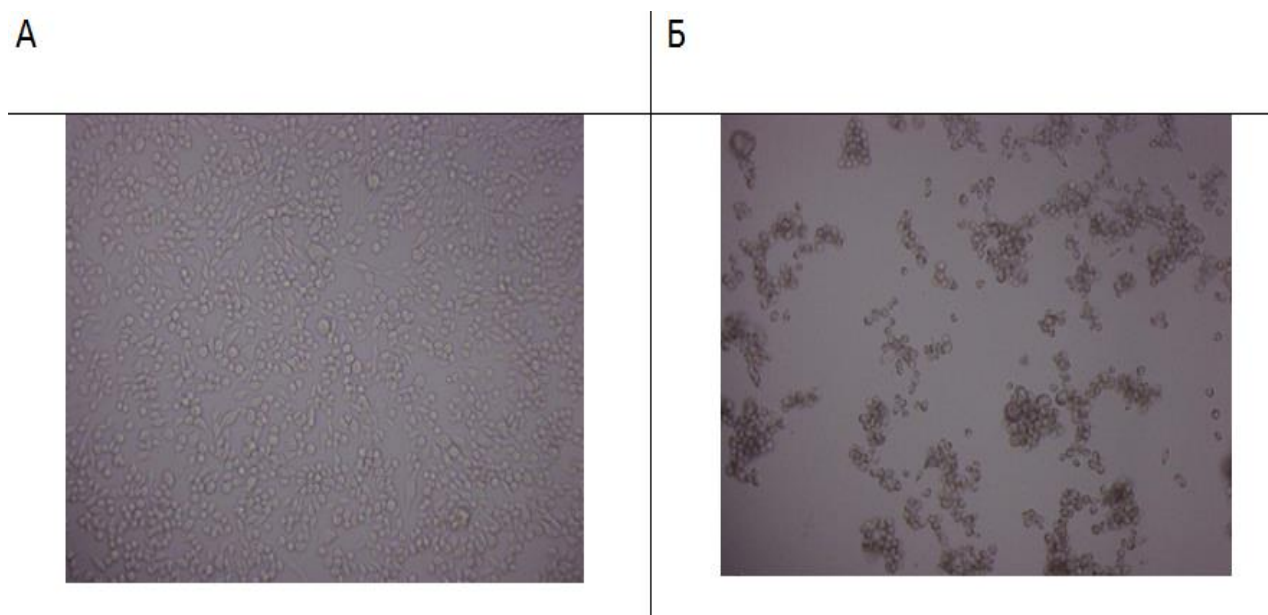


Рис 5. Влияние плазмы беременных женщин с преэклампсией на клетки SK-N-SH: А – контроль, Б – воздействие плазмы беременных с преэклампсией

Исследование влияния плазмы беременных на клетки нейробластомы показало достоверное увеличение процента клеток нейробластомы с фрагментированной ДНК (рис.5). При этом максимальное увеличение апоптоза клеток происходило при культивировании клеток с плазмой беременных женщин с ПЭ по сравнению с группой сравнения. Так, компоненты плазмы женщин с физиологически протекающей беременностью увеличивали апоптоз клеток нейробластомы, но в меньшей степени, чем у больных с ПЭ.

Как известно, одним из наиболее эффективных методов борьбы с неблагоприятными последствиями преэклампсии является родоразрешение (рис. 6).

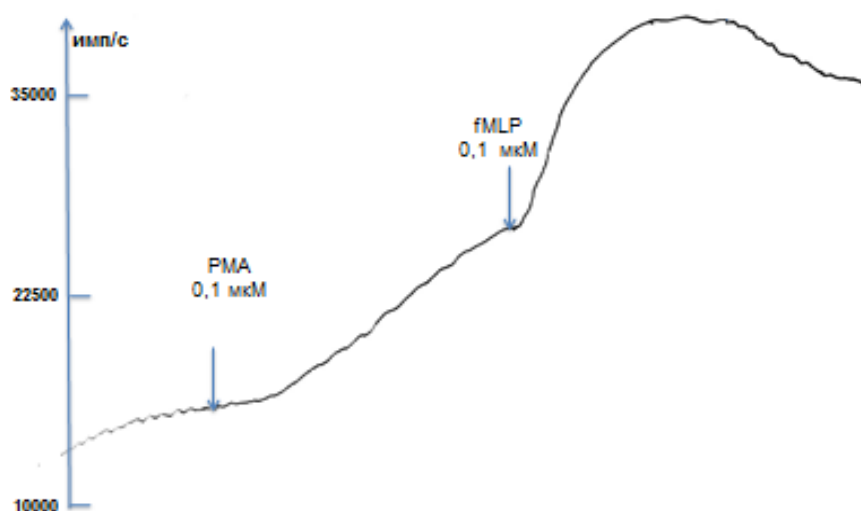


Рис. 6. Комбинированное действие PMA и fMLP на образование радикалов кислорода фагоцитами крови пациентки с преэклампсией до кесарева сечения

Исходя из вышеизложенного, интерес представляло изучение особенностей оксидативного стресса у пациенток до и после родоразрешения (на 5 сутки после операции) (рис. 7). При физиологическом течении послеоперационного периода происходило выраженное, достоверное уменьшение скорости и амплитуды ответов на стандартные стимуляторы.

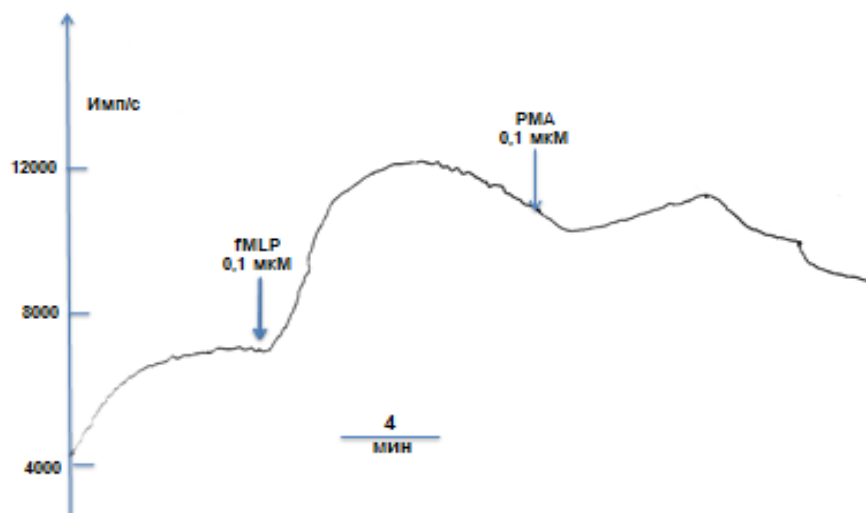


Рис.7. Действие fMLP и PMA на пятые сутки после кесарева сечения у женщины с преэклампсией

Сравнительное исследование влияния плазмы крови больной с ПЭ (полученной сразу после операции и повторно через 5 и 10 дней) на апоптоз клеток SK-N-SH показало, что и первый и второй препарат плазмы вызывали значительное увеличение процента апоптоза этих клеток по сравнению с контролем. Вместе с тем, плазма, полученная через 10 дней, вызывала несколько меньшее увеличение апоптоза по сравнению с первоначально полученной плазмой. Вероятно, что наблюдаемое снижение апоптоза связано со снижением концентрации биологически активных соединений (активирующих апоптоз) в составе исследованных препаратов плазмы.

Таким образом, полученные результаты подтверждают значимость оксидативного стресса в формировании ПЭ, что согласуется с многочисленными исследованиями. Так в ряде работ было предположено, что центральную роль в возникновении и развитии преэклампсии играет нарушение плацентации, гипоксически-ишемические изменения плаценты, гибель цитотрофобластов, клеток спиральных сосудов матки и клеток других видов, что сопровождается секрецией в кровь провоспалительных цитокинов, включая фактор активации

тромбоцитов (PAF), TNF- α , формил пептиды, образуемые не только бактериями, но и митохондриями (fMLP), эндотоксины (LPS) и др., которые первоначально праймируют нейтрофилы. Следует отметить, что обнаруженная взаимосвязь между увеличением содержания преактивированных нейтрофилов и их реакция на введение индукторов и ингибиторов с изменением содержания TGF- β 3 относящегося к семейству ангиогенных факторов, объясняет новые механизмы развития окислительного стресса в ответ на гипоксию и ишемию.

Определение маркеров системного воспаления и уровня радикалов кислорода в процессе дыхательного взрыва в результате генерации и стимуляции праймированных клеток в крови беременных женщин, при исключении других потенциально возможных причин активации нейтрофилов позволяет с определенной вероятностью выявлять беременных, угрожаемых по развитию преэклампсии до появления клинической симптоматики. Полученные данные, свидетельствующие о проапоптогенном влиянии плазмы крови и амниотической жидкости при ПЭ, обосновывают целесообразность разработки профилактических подходов, направленных на уменьшение оксидативного стресса и предупреждение его неблагоприятных последствий. Выявленные изменения уровней TGF- β 3 и соотношение показателей периферической крови коррелирующие со степенью тяжести ПЭ позволяют предложить их использование в качестве неинвазивных и доступных маркеров данного осложнения.

Выводы

1. К факторам риска преэклампсии относятся отягощенный семейный анамнез: заболевания сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия и инфаркт миокарда) и тяжелая преэклампсия в предыдущую беременность (n=3, 5%) (OR=5,1 (1,6-15,1), p<0,005), миома матки (n=10, 15,9%) (OR=4,9 (1,8-14,3), p<0,005) и первичное бесплодие (n=4, 6,6%) (OR=4,7 (1,7-12,9), p<0,05).

2. Течение настоящей беременности при преэклампсии характеризуется высокой частотой угрозы прерывания беременности с формированием ретрохориальной гематомы в I триместре ($n=20$, 33,3%) ($OR=2,3$ (1,09-5,03), $p<0,001$), ранним токсикозом ($n=25$, 41,7%) ($OR=1,6$ (0,8-3,0), $p>0,05$) и синдромом задержки роста плода ($n=17$, 29,5%) ($OR=5,8$ (0,6-52,5) $p<0,005$).

3. В структуре неонатальной заболеваемости при преэклампсии превалируют врожденная пневмония ($n=15$, 25,7%) ($OR=9,5$ (2,1-42,8), $p<0,05$), респираторный дистресс-синдром ($n=14$, 22,9%) ($OR=8,2$ (1,8-37,2), $p<0,05$) и экстремально низкая масса тела новорожденных ($n=15$, 25,9%) ($OR=9,0$ (1,1-79,1), $p<0,05$). При этом данная тенденция наиболее выражена при ранней преэклампсии.

4. Установлена корреляция изменений отношения нейтрофилов к лимфоцитам (NLR) ($p<0,05$), среднего объема тромбоцитов (MPV) ($p<0,005$) и анизцитоза тромбоцитов (PDW) ($p<0,05$) при преэклампсии, что обосновывает целесообразность их определения в качестве диагностических маркеров.

5. Доказана диагностическая значимость определения концентрации TGF- β 3 при преэклампсии с чувствительностью 78%, специфичностью 66,7% ($AUC=0,80$). Уровень TGF- β 3 41,51 пг/мл (11,21) следует считать пороговым значением для риска развития преэклампсии.

6. Преэклампсия характеризуется статистически значимым увеличением количества преактивированных нейтрофилов в плазме крови с образованием радикалов кислорода 4540 ± 1464 имп/с. Выявление праймирования, формирующегося до появления клинических признаков системного воспаления, позволяет прогнозировать развитие данного осложнения беременности.

7. Сочетанное воздействие на фагоциты стандартных стимуляторов с разным механизмом действия - бактериального пептида (fML) и форболового эфира (PMA) сопровождается резким увеличением генерации супероксидов, уровни которых достигают максимальных значений при преэклампсии (16267 ± 1464 имп/с ($n=14$)), что характеризует развитие «дыхательного взрыва».

8. Послеоперационный период при преэклампсии характеризуется сохранением «спонтанной» генерации радикалов кислорода фагоцитами крови на FMLP в первые 5 дней после родоразрешения у женщин с ПЭ, в отличие от неосложненного течения беременности, сопровождающегося снижением ответа.

9. Плазма крови и амниотическая жидкость беременных с преэклампсией обладает прооксидантным действием, выражающимся в увеличении продукции активных форм кислорода (АФК) клетками нейробластомы, и как следствие, усилением апоптоза.

10. Родоразрешение при преэклампсии приводит к нормализации баланса про- и антиоксидантных систем, проявляющимся достоверным снижением продукции активных форм кислорода (АФК) к 5 суткам и доли апоптозных клеток к 10 суткам послеродового периода.

11. Разработанный алгоритм диагностики и прогнозирования при преэклампсии позволяет снизить акушерские осложнения и улучшить перинатальные исходы.

Практические рекомендации

1. Пациенток с отягощенным семейным и акушерским анамнезом (тяжелая преэклампсия в предыдущую беременность, антенатальная гибель плода, сердечно сосудистые заболевания), миомой матки и первичным бесплодием следует относить в группу риска по развитию преэклампсии.

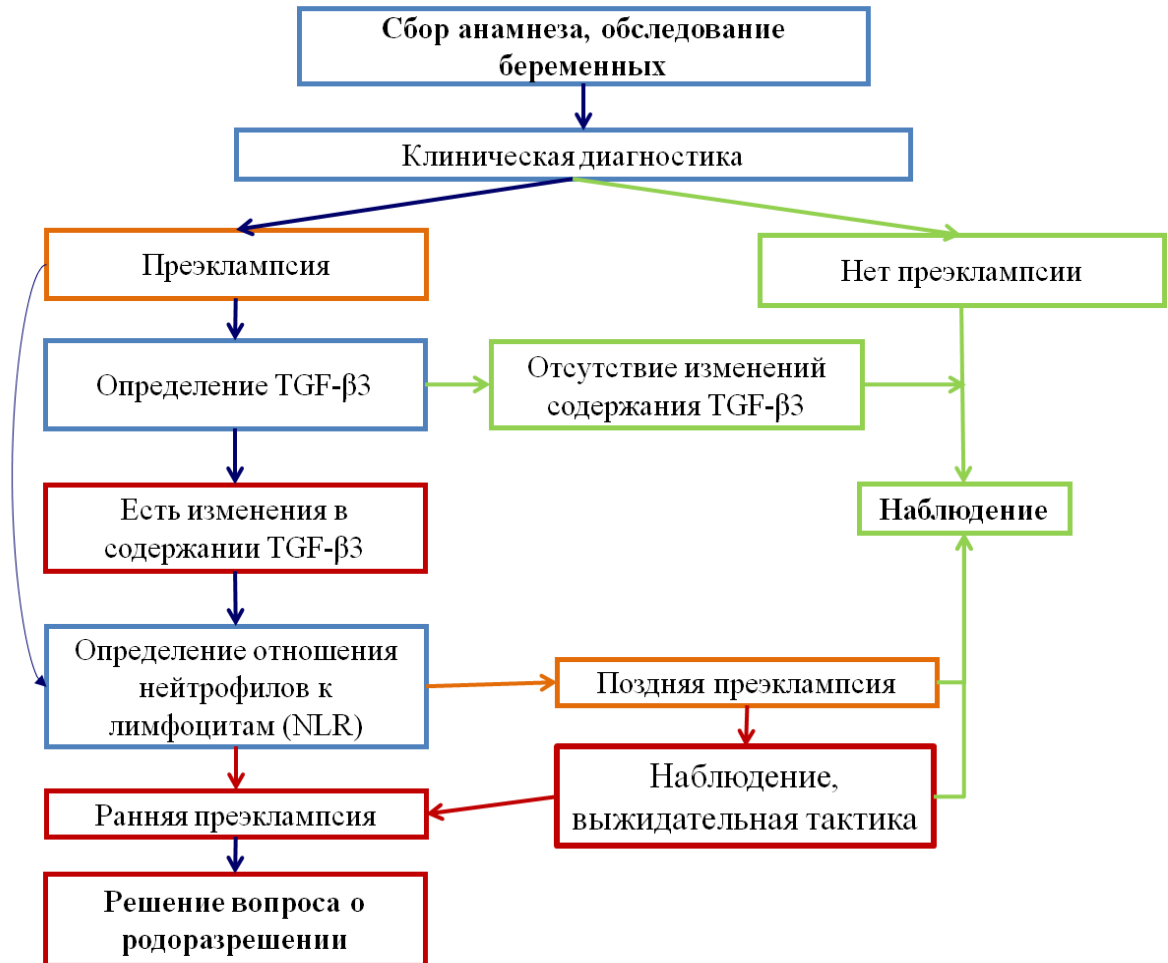
2. Оценка содержания преактивированных нейтрофилов в крови беременных позволяет выделить группы риска по развитию преэклампсии.

3. Определение количества тромбоцитов, среднего объема тромбоцита, ширины распределения тромбоцитов по объему (PDW) и отношения нейтрофилов к лимфоцитам целесообразно для определения степени тяжести преэклампсии.

4. Изучение концентрации TGF- β 3 при преэклампсии позволяет дифференцировать ее формы для уточнения тактики ведения беременных.

5. Ведение беременных группы риска необходимо согласно разработанному алгоритму диагностики и прогнозирования преэклампсии.

Алгоритм диагностики и прогнозирования преэклампсии



СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Диагностика преэклампсии на современном этапе / Е.Д. Мирошина, Н.В. Тютюнник, Н.В. Храменко, **Д.К. Харченко**, Н.Е. Кан // **Проблемы репродукции.** – 2017. – Т. 23, № 1. – С. 96-102.
2. Уровень активных форм кислорода при преэклампсии / Н.В. Тютюнник, **Д.К. Харченко**, А.М. Красный, П.А. Ховхаева, Н.Е. Кан // **Материалы X Юбилейного регионального научно-образовательного форума «Мать и дитя».** – Геленджик, 28-30 июня, 2017. – С. 118-119.

3. Спонтанное образование радикалов кислорода в пробах цельной крови при преэклампсии / **Д.К. Харченко**, Н.В. Тютюнник, Е.И. Асташкин, Н.С. Орехова, А.Н. Новикова // *Материалы X Юбилейного регионального научно-образовательного форума «Мать и дитя»*.– Геленджик, 28-30 июня, 2017. – С.119-120.
4. Функциональное состояние фагоцитов крови при преэклампсии / **Д.К. Харченко**, Н.В. Тютюнник, Д.А. Борис, О.А. Сергунина, Е.И. Асташкин, Н.С. Орехова // *Материалы XII международного конгресса по репродуктивной медицине*.– Москва, 16-19 января, 2018.– С. 130-132.
5. Комплексный подход к прогнозированию преэклампсии с учетом молекулярно-генетических и клинических факторов / Н.Е. Кан, Н.В. Тютюнник, Л.А. Беднягин, **Д.К. Харченко**, Н.В. Долгушина, А.Е. Донников, В.Л. Тютюнник // *Акушерство и гинекология*. – 2018. – № 4. – С. 35-41.
6. Диагностическая значимость преактивированных нейтрофилов при преэклампсии / **Д.К. Харченко**, Е.И. Асташкин, Н.Е. Кан, Н.В. Тютюнник, Н.С. Орехова, Д.А. Борис, В.Л. Тютюнник // *Акушерство и гинекология*. – 2018. – № 11. – С. 24-30.
7. Содержание изоформ трансформирующего фактора роста в крови беременных с преэклампсией / В.В. Вторушина, **Д.К. Харченко**, Е.И. Асташкин, Н.Е. Кан // *Акушерство и гинекология*. – 2019. – № 3. – С. 68-73
8. Прогнозирование и лабораторная диагностика гипертензивных расстройств при беременности / А.А. Балущкина, В.Л. Тютюнник, Н.Е. Кан, **Д.К. Харченко**, Д.А. Борис // *Русский медицинский журнал «Мать и дитя»* – 2019. – № 2. – С. 89-94.
9. Роль трансформирующего фактора роста TGF- β в формировании преэклампсии и задержки роста плода / З.В. Хачатрян, **Д.К. Харченко**, Н.Е. Кан // *Материалы XX Юбилейного Всероссийского Научно-Образовательного форума «Мать и Дитя»*. – Москва, 25-27 сентября, 2019.– С. 81-82.

