

РОЛЬ СИСТЕМЫ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ И ЦИТОКИНОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА ПЛОДА

Боташева Т.Л.¹, Линде В.А.¹, Саргсян О.Д.¹, Рымашевский А.Н.², Ермолова Н.В.¹, Михельсон А.А.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России. (344012, ГСП-704, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43), E-mail: Secretary@rniiap.ru.

²ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский 29), e-mail: okt@rostgmu.ru.

В статье представлены результаты исследования характера экспрессии некоторых ангиогенных факторов и цитокинов у женщин в динамике физиологической беременности и при плацентарной недостаточности в зависимости от пола плода. Установлено, что при физиологическом и осложненном течении беременности для каждого триместра характерно определенное соотношение абсолютных уровней СЭФР-А, ЭФР, ФРП, ЭТ-1, ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 в зависимости от пола плода. У беременных с плодами женского пола во II и III триместрах как физиологической, так и осложненной беременности регистрируется более высокий уровень ангиогенных факторов (СЭФР-А, ЭФР, ФРП, ЭТ-1) и цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-10, ИЛ-12). На основании результатов многофакторного анализа выявлены прогностически значимые триады ангиогенных факторов и цитокинов, а также численные их значения, позволяющие составить индивидуальный прогноз плацентарной недостаточности у матерей с плодами альтернативного пола.

Ключевые слова: физиологическая беременность, плацентарная недостаточность, система ангиогенных факторов, интерлейкины, пол плода.

THE ROLE OF THE SYSTEM OF ANGIOENIC FACTORS AND CYTOKINES IN THE PROGNOSIS OF PLACENTAL INSUFFICIENCY IN DEPENDENCE ON FETAL GENDER

Botasheva T.L.¹, Linde V.A.¹, Sargsyan O.D.¹, Rimashevskiy A.N.², Ermolova N.V.¹, Mihelson A.A.¹

¹Federal State Budget Establishment "Rostov-on-Don research institute of obstetrics and pediatrics" of Ministry of Health of Russian Federation. (344012, Rostov-on-Don, Mechnikova str., 43, E-mail: Secretary@rniiap.ru)

²State Budget Educational Establishment Rostov-on-Don State Medical University of Ministry of Health of Russia (344022, Rostov-on-Don, Nahichevansky str., 29, e-mail: okt@rostgmu.ru)

The article presents data on the studying of some angiogenic factors and cytokines expression in women with physiological pregnancies and in case of placental insufficiency in dependence on fetal gender. We detected that in physiological pregnancy and in case of placental insufficiency there is a definite ratio of VEGF, EGF, PGF, ET-1, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 and IL-12 in dependence on fetal gender. We registered a greater level of angiogenic factors (VEGF, EGF, PGF, ET-1) and cytokines (TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12) in women with female fetuses in 2d and 3d trimesters of both physiological and complicated pregnancies. On the basis of the results of multifactorial analysis we revealed prognostically significant triads of angiogenic factors and cytokines as well as its numerical values, allowing to make an individual prognosis of placental insufficiency development in women with alternative fetus.

Keywords: physiological pregnancy, placental insufficiency, system of angiogenic factors, interleukin, fetus sex.

Плацентарная недостаточность представляет собой результат сложной реакции плода и плаценты на различные патологические состояния материнского организма и проявляется в комплексе нарушений транспортной, трофической, эндокринной и метаболической функций плаценты, лежащих в основе патологии плода и новорожденного [5]. По мнению исследователей, частота плацентарной недостаточности колеблется в широких пределах

(22,4-30,6%) и зависит от основных причин ее возникновения [7]. В структуре неонатальной заболеваемости и смертности плацентарная недостаточность и задержка роста плода составляют от 35 до 40%, а в сочетании с другими патологическими состояниями – до 70% причин перинатальной смертности и определяет 40% детской заболеваемости и смертности [5].

Одним из путей решения выше обозначенной проблемы является всестороннее изучение особенностей различных звеньев функциональной системы «мать-плацента-плод», а также поиск и разработка высоко эффективных прогностических критериев осложнений беременности. В последние годы стал активно проявляться исследовательский интерес к изучению механизмов формирования акушерской патологии с позиции полового диморфизма [4,9]: мужской пол плода признан независимым фактором риска развития угрозы прерывания беременности, а у плодов женского пола чаще регистрируется благоприятное течение перинатального периода [9].

Нарушения процессов клеточной регуляции, обеспечивающих рост, развитие плаценты и формирование ее сосудистой системы, являются одной из основополагающих причин, приводящих к плацентарной недостаточности. Система ангиогенных факторов, обеспечивающая продукцию биологически активных соединений, играет важную роль в репродуктивных процессах, межклеточном взаимодействии, стимулируя или ингибируя деление и дифференцировку различных клеток, а также процессы ангиогенеза. Важная роль для гестационных процессов принадлежит еще одной группе полипептидных медиаторов – цитокинам. Изучение влияния цитокинового каскада на течение и исход беременности на сегодняшний день является предметом исследования ученых-экспериментаторов и клиницистов во всем мире. Особенности системы факторов роста и цитокинов достаточно широко освещены в современной литературе, однако их характер в зависимости от пола плода ранее не изучался.

Цель исследования

Изучение экспрессии некоторых сосудисто - эндотелиальных факторов и цитокинов при физиологической и осложненной беременности в зависимости от пола плода и разработка на их основе новых подходов к прогнозированию плацентарной недостаточности.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 735 беременных, проходивших плановые обследования в отделении патологии беременности и поликлиническом отделении ФГБУ «РНИИАП» Министерства здравоохранения РФ, наблюдавшихся в рамках программы «Акушерский мониторинг» за период 01.2013 г. по 06.2014 г. На основании данных гормональных, биохимических, ультразвуковых и доплерометрических исследований были сформированы

две основные клинические группы. В I клиническую группу вошли 390 женщин с физиологическим течением беременности, из них 203 женщин с плодами мужского пола и 187 беременных – с плодами женского пола. Во II клиническую группу были включены 345 женщин с плацентарной недостаточностью (176 женщин с плодами мужского пола, 169 с плодами женского пола). Анализ полученных результатов исследования в каждой клинической группе оценивался с учетом пола плода. Все исследования осуществлялись после получения информированного согласия пациентки на проведение дополнительных методов исследования, а также заключения «Этического комитета».

Критериями включения в I клиническую группу «физиологическая беременность» были отсутствие жалоб и признаков акушерской патологии при клиническом, гормональном, ультразвуковом, доплерометрическом и биохимическом исследованиях. Формирование II клинической группы «плацентарная недостаточность» предусматривало использование следующих критериев включения [7]: нарушения маточно-плацентарно и фето-плацентарного кровотока I-II степени по данным доплерометрии; асимметричная и симметричная форма задержки роста плода; неудовлетворительные показатели биофизического профиля плода. Критериями исключения явились: I триместр беременности, многоплодная беременность, эндокринная патология, тяжелая экстрагенитальная патология, а также аномалии развития внутренних половых органов, доброкачественные опухоли женской репродуктивной системы. Рандомизация выборки проводилась с помощью метода "Монета"[3]. Соблюдались строгие условия времени проведения, последовательности и кратности исследований. Верификация результатов осуществлялась при комплексном анализе имевшихся у беременной ультразвуковых, доплерометрических исследований, анализе исходов родов и состоянии новорожденных.

В сыворотке крови определяли уровень ангиогенных факторов с помощью иммуноферментного анализа. Для фактора роста плаценты (ФРП), эпидермального фактора роста (ЭФР), сосудисто-эндотелиального фактора роста-A (СЭФР-A), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), использовали иммуноферментные наборы (Cytimmune systems, USA). Содержание эндотелина-1 (ЭТ-1) определяли иммуноферментными наборами R&D systems, USA. Содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12 определяли, используя тест-системы фирмы «Cytimmune» (USA). Чувствительность методов 9,2 пг/мл, 8,4 пг/мл, 5,6 пг/мл. Все анализы проведены на многофункциональном счетчике для иммуноферментных исследований с программным обеспечением Victor (Finland). У новорожденных проведено полное клиническое обследование, включающее стандартную оценку по шкале Апгар, весо-ростовые показатели, особенности соматического и неврологического статуса.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи программ статистической обработки информации из пакетов Statistica (Statsoft, версия 6.0), сертификат № 76456-OEM-0012344-54060. Для анализа многомерных нелинейных зависимостей использовали пакет PolyAnalyst 3.5 Pro, одна из функций которого включает в себя технологию «эволюционного программирования». Объемы выборок пациенток удовлетворяли требованию статистической мощности исследований на уровне 80-85%. Статистическое обоснование различий между группами пациенток проводилось с использованием U-критерия Манна-Уитни при максимально допустимом уровне вероятности ошибки первого рода $p < 0,05$. Для классификации изучаемых факторов на основе их вероятности попадания в отдельный класс по степени значимости в зависимости от характера течения беременности и пола плода использовали методы «Дерева решений»; лог-линейный анализ [1]. Данные приведены в формате: медиана (25 перцентиль – 75 перцентиль).

Результаты

На первом этапе исследования были изучены особенности системы ангиогенных факторов и цитокинов у женщин с физиологическим течением беременности. В I клинической группе при анализе полученных данных в зависимости от градации «пол плода» выявлено, что уровень СЭФР-А по мере прогрессирования беременности увеличивался как у матерей с плодами мужского пола, так и женского. Его абсолютный уровень во II триместре был достоверно выше у матерей девочек ($p=0,00428$) (56,5 пг/мл по сравнению с 38,7 пг/мл), что, по-видимому, связано с процессами стабилизации механизмов оксигенации в маточно-плацентарном комплексе в условиях крайне низкого содержания кислорода в этом сроке [6]. Что касается показателей СЭФР-А в III триместре беременности, то, был обнаружен особенно значимый его рост относительно II триместра (в 1,7 раза) (76,8 пг/мл) в случае женского пола плода.

Одним из индикаторов риска патологических состояний беременности, также является эндотелиальная дисфункция. Повреждение и последующая за ним дисфункция эндотелия приводят к нарушению эндотелий - зависимых механизмов регуляции сосудистого тонуса и сосудистой проницаемости, что лежит в основе развития многих акушерских осложнений. В зависимости от градации «пол плода» установлено, что в сыворотке крови у матерей девочек в группе с физиологическим течением беременности во II и III триместрах содержание ЭТ-1 увеличивалось (с 0,4 пг/мл до 0,6 пг/мл), тогда как в случае мужского пола практически не изменялось (0,5 пг/мл). Если учесть важную роль ЭТ-1 в регуляции функции тонуса кровеносных сосудов [2], то становится очевидной более выраженная метаболическая целесообразность увеличения продукции этого полипептида

при физиологическом течении беременности уже во II триместре и сохранения ее на данном уровне в III триместре преимущественно у беременных с плодами женского пола.

В процессе анализа показателей ЭФР выявлено, что при физиологической беременности его уровень во II и в III триместрах был достоверно выше у матерей с плодами женского пола (346,9 пг/мл и 245,1 пг/мл соответственно) ($p=0,00012$). Напротив, у беременных с плацентарной недостаточностью, регистрировалась более высокая концентрация ЭФР у матерей с плодами мужского пола (322,3 пг/мл и 235,0 пг/мл соответственно) ($p=0,02131$).

Известно, что в период имплантации и плацентации имеет место высокий уровень пролиферации и дифференциации клеток. Различные факторы роста включены в этот процесс и контролируют его на разных этапах развития плаценты. В связи с этим, формирование плаценты можно представить как серию скоординированных реакций, регулируемых локальными медиаторами. Среди последних существенная роль отводится ФРП, которому принадлежит приоритет в становлении и развитии плацентарного кровообращения, а также функционировании фетоплацентарного комплекса. Как в случае мужского, так и женского пола по мере прогрессирования физиологической беременности отмечался прирост уровня ФРП, который был выше у матерей девочек: во II триместре – на 26,6 %, (92,4 пг/мл), а в III триместре – на 40,3 % (731,4 пг/мл). Значительное повышение содержания ФРП в процессе прогрессирования беременности, несомненно, обусловлено интенсивным ростом структур плаценты, которое должно быть скоординировано с развитием сосудистой системы, определяющим формирование капилляров ворсин на фоне инвазии трофобласта [10]. Регуляция данных процессов осуществляется при непосредственном взаимодействии ФРП с Flt-1 рецептором, либо путем активации экспрессии СЭФР [2]. Это позволяет поддерживать СЭФР в высоко диффузном состоянии, увеличивая, таким образом, его ангиогенный эффект. Известно, что значительный рост продукции ФРП до 28 недель физиологически протекающей беременности отражает соответствующее увеличение объема плацентарного кровообращения. Судя по нашим данным эти процессы были более выражены у матерей девочек.

На следующем этапе проводилось исследование уровня изучаемых полипептидов при плацентарной недостаточности. Было обнаружено, что уровень СЭФР-А по мере приближения срока родов увеличивался как у матерей с плодами мужского пола, так и женского. Однако, по сравнению с физиологическим течением беременности, содержание этого фактора роста было достоверно выше у матерей девочек во II и III триместрах гестации (206,2 пг/мл и 303,6 пг/л соответственно) ($p=0,00423$). Следует отметить, что уровень СЭФР-А у матерей с плодами женского пола при плацентарной недостаточности во

II триместре – в 5 раз, а в III триместре – в 2 раза был выше, чем у беременных с плодами мужского пола. Оценивая представленные данные, не остается сомнений, что нарушенная экспрессия СЭФР-А при осложненном течении беременности, свидетельствует о выраженной гипоксемии в месте имплантации плодного яйца [8], преимущественно у матерей девочек. У беременных с плацентарной недостаточностью в случае мужского и женского пола плода выявлено увеличение уровня ФРП по мере прогрессирования беременности на 91% (с 38,7 пг/мл до 528,0 пг/мл) и 93% (с 47,3 пг/мл до 543, 8 пг/мл), однако уровень ФРП в зависимости от срока был выше во II триместре у матерей девочек (на 21%).

При анализе показателей ЭТ-1 выявлено, что его уровень был значимо выше во II триместре у матерей девочек (0,5 пг/мл по сравнению с 0,2 пг/мл) ($p=0,01312$) и практически не менялся в III триместре. Максимальный прирост уровня ЭТ-1 у матерей мальчиков отмечался в III триместре беременности (в 3,5 раза) (с 0,2 пг/мл до 0,7 пг/мл) ($p=0,06294$).

При сравнительном анализе содержания интерлейкинов в сыворотке крови выявлено достоверное снижение в 2,5 раза по мере увеличения срока физиологической гестации у беременных с плодами женского пола: ИЛ-1 β - от 149,2 пг/мл до 62,8 пг/мл ($p=0,00261$); ИЛ-6 - от 8,6 пг/мл до 3,5 пг/мл ($p=0,00263$); ИЛ-10 - от 2,3 пг/мл до 1,2 пг/мл ($p=0,00264$); ИЛ-12 - с 7,6 пг/мл до 3,4 пг/мл ($p=0,00262$), тогда как у матерей мальчиков статистически значимо (в 1,5 раза) увеличились показатели ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-12. Абсолютный уровень ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 статистически значимо был выше у матерей с плодами женского пола ($p=0,02432$, $p=0,00264$, $p=0,00214$) только во II триместре беременности, что свидетельствует о существовании различий в степени выраженности иммунного ответа, связанных с полом вынашиваемого плода.

Что касается ФНО- α при физиологически протекающей беременности (без учета пола плода), то его уровень в III триместре по сравнению со II триместром был выше в 1,2 раза. Такой характер продукции ФНО- α в процессе прогрессирования беременности, очевидно, обусловлен необходимостью обеспечения формирования соединительнотканного компонента плаценты, путем поддержания необходимой активности коллагеназы, в индукции которой участвует указанный фактор [6]. В то же время, при анализе динамики данных показателей установлено, что повышение содержания этого регуляторного цитокина в зависимости от пола плода было выше у матерей мальчиков. Для матерей девочек, напротив, отмечалось снижение уровня ФНО- α (с 6,9 пг/мл до 5,5 пг/мл) ($p=0,03162$). При сравнении абсолютных значений цитокинов у беременных с альтернативным полом плода при плацентарной недостаточности было выявлено, что во II триместре содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 было значимо выше у матерей с плодами женского пола, тогда как в III

триместре обнаружено более высокое содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-12 у матерей с плодами мужского пола. Что касается ФНО- α при плацентарной недостаточности, то во II и в III триместрах беременности выявлено незначительное повышение этого показателя как у беременных с плодами женского, так и мужского пола (с 7,8 пг/мл до 9,0 пг/мл) ($p=0,04978$) и (с 8,4 пг/мл до 8,8 пг/мл) ($p=0,05243$) соответственно.

С целью оценки значимости изучаемых факторов для возникновения шанса развития плацентарной дисфункции был проведен анализ данных по методу «Деревья решений». Выявлено, что во II триместре беременности прогностически значимой в отношении плацентарной недостаточности триадой факторов у матерей мальчиков явились ИЛ-12, ЭФР, ФРП, тогда как для матерей девочек - ЭТ-1, ИЛ-1 β , ФНО- α .

Особый интерес представляли клинические особенности течения беременности, родов и состояния новорожденных в контексте проведенных исследований. Наиболее частым осложнением беременности независимо от пола плода и срока была анемия беременных. Однако, при оценке частоты встречаемости этого осложнения гестационного периода можно выделить ряд закономерностей. Так, анемия достоверно чаще регистрировалась у матерей девочек (37,2%). При этом у матерей с плодами мужского пола беременность осложнилась маловодием – 27,8%, многоводием – 22,7%, преэклампсией -14,8 % случаев. Задержка роста плода чаще регистрировалась в течение беременности у матерей девочек (15,6%), по сравнению с альтернативным полом плода (13,6%). Срочные роды достоверно чаще встречались в группе женщин с плодами женского пола (83,4%). В связи с высокой распространенностью гестационных осложнений беременность у женщин с плодами мужского пола в два раза чаще заканчивалась преждевременными родами (33,2 %). При сравнительном анализе осложнений, возникших в родах, также обращало на себя внимание преобладание осложнений у женщин с плодами мужского пола. Аномалии родовой деятельности регистрировались у матерей мальчиков в 9,1% случаев и у матерей девочек – в 6,5%. Травматизм родовых путей чаще встречался также у матерей мальчиков, чем у матерей девочек (25% и 21,3% соответственно). У женщин с плодами мужского пола беременность почти в 2 раза чаще заканчивалась оперативным родоразрешением. Кровотечение в послеродовом или раннем послеродовом периоде в 1,7 раза чаще встречалось у женщин с плодами мужского пола.

Определенный интерес представляли результаты, характеризующие состояние новорожденных в зависимости от полового диморфизма. Для этого была проведена оценка состояния новорожденных по шкале Апгар в обеих анализируемых группах. Согласно полученным результатам, наиболее благоприятные исходы родов регистрировались у женщин с плодами женского пола как при физиологической, так и при осложненной

беременности. В зависимости от пола плода наибольший процент здоровых детей (оценка по шкале Апгар более 7 баллов) был зарегистрирован у матерей с плодами женского пола, тогда как наименее благоприятные исходы обнаружены у женщин с плодами мужского пола. При оценке массы тела новорожденных в обеих клинических группах наиболее высокие показатели отмечались в группе женщин с плодами мужского пола, которые оказались достоверно выше, чем у девочек. Таким образом, наиболее тяжелое течение беременности и родов у женщин с плодами мужского пола свидетельствует о снижении адаптационных ресурсов в различных звеньях функциональной системы «мать-плацента-плод» в случае мужского пола плода, о чем свидетельствуют наибольшая частота осложнений в родах, а также наиболее низкие значения балльной оценки по шкале Апгар при рождении были зарегистрированы у женщин с плодами мужского пола и новорожденных мальчиков.

Выводы

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при физиологической и осложненной беременности в каждом триместре имеются определенные различия абсолютных уровней изученных полипептидов. У беременных с плодами женского пола на всех этапах как физиологической, так и осложненной беременности регистрируется более выраженная продукция сосудисто-эндотелиальных факторов и цитокинов, что свидетельствует об особенностях анатомо-функционального «запроса» со стороны маточно-плацентарно-плодового комплекса и различиях в формировании иммунного ответа у беременных при данном виде полового диморфизма. Важную роль в характере биоактивных полипептидов у беременных с плодами альтернативного пола, по-видимому, играет взаимный гормональный и иммунологический контроль со стороны различных звеньев системы «мать-плацента-плод», опосредующий отличия в экспрессии факторов роста и цитокинов при физиологической и осложненной беременности.

Список литературы

1. Афифи А. Статистический анализ: Подход с использованием ЭВМ. / А. Афифи, С. Эйзен. / Пер: с англ. – М.: Мир, 1982. – 486 с.
2. Гомазков О.А. Система эндотелиновых пептидов: механизмы кардиоваскулярных патологий / О.А. Гомазков // *Вопр. мед. химии.* – 1999. – Т.45, № 4. – С. 290–303.
3. Двойрин В.В. Методика контролируемых клинических испытаний / В.В. Двойрин, А.А. Клименков. – М. – 2004. – 143 с.

4. Колесникова Н.Б. Особенности перинатальной смертности в зависимости от пола плода / Н.Б. Колесникова, М.А. Кабанова, С.В. Калентьева // Академ. журн. Запад. Сибири. – 2011. – № 2. – С. 25-27.
5. Кулаков В.И. Акушерство и гинекология. Клинические рекомендации / под ред. В.И. Кулакова. – М. – 2008. – 560с.
6. Орлов А.В. Скрининговые маркеры физиологической и осложненной беременности: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук / Орлов Александр Владимирович. – Ростов н/Д, 2006. – 47 с.
7. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности / В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих. – М. – 2010. – 534с.
8. Clark D.E. Placental angiogenesis: the role of the VEGH family of proteins / D.E. Clark, S. Charnock-Jones // J. Angiogenesis. – 1999. – Vol.2, №4. – P. 309–318.
9. Di Renzo G.C. Does fetal sex affect pregnancy outcome? / G.C. Di Renzo , A. Rosati , R.D. Sarti , L. Cruciani , A.M. Cutuli // Gend Med. – 2007. – Vol.4, №1. – P. 19-30.
10. Lyall F. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia / F. Lyall, I.A.Greer, F. Boswell, R. Fleming // Br. J. Obstet. Gynaecol. – 1997. – Vol.104, №2. – P. 223-228.

Рецензенты:

Андреева В.О., д.м.н., главный научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, г.Ростов-на-Дону.

Каушанская Л.В., д.м.н., главный научный сотрудник, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения РФ, г.Ростов-на-Дону.