

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЭРИТРОЦИТАХ ПЛОДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ

Гиниатуллин Р.У.¹, Сяндюкова Е.Г.²

¹ГБУЗ "Многопрофильный центр лазерной медицины", Челябинск, e-mail: gru54@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск

Цель исследования: изучение экспрессии эритропоэтина на эритроцитах плода в зависимости от степени тяжести преэклампсии и перинатальных исходов. В исследовании «случай-контроль» участвовали 11 женщин без преэклампсии, 14 – с умеренной и 14 – тяжелой преэклампсией. Проанализированы исходы беременности и родов, определены адекватность продукции эритропоэтина и экспрессия ЭПО на фетальных эритроцитах. В результате исследования установлено, что снижение экспрессии эритропоэтина на фетальных эритроцитах при тяжелой преэклампсии ассоциировано с неадекватной продукцией эритропоэтина в организме матери. Зарегистрированы корреляционные связи показателя экспрессии эритропоэтина на эритроцитах плода с материнскими, фетальными и неонатальными осложнениями, что свидетельствует об однотипных/взаимосвязанных механизмах формирования указанной акушерской патологии, в частности преэклампсии, с вероятным участием эритропоэтина в патогенезе их развития.

Ключевые слова: преэклампсия, эритропоэтин сыворотки, экспрессии эритропоэтина на фетальных эритроцитах.

CHARACTERISTICS OF ERYTHROPOIETIN EXPRESSION IN FETUS ERYTHROCYTES DEPENDING ON PREECLAMPSIA SEVERITY AND PERINATAL OUTCOMES

Giniatullin R.U.¹, Syundyukova E.G.²

¹State-financed health institution "Multifaceted centre of laser medicine" Chelyabinsk, e-mail: gru54@mail.ru;

²FSBEI of Higher Education "South-Ural state medical university" of Ministry of Public Health of the Russian Federation, Chelyabinsk

Goal of research: to study erythropoietin expression in fetus erythrocytes depending on preeclampsia severity and perinatal outcomes. In "case-control" study there were 11 women without preeclampsia, 14 – with moderate one and 14 – with severe preeclampsia. We have analyzed outcomes of pregnancy and labors, determined erythropoietin production adequacy and EPO-expression in fetal erythrocytes. As the result of our investigation it was found that erythropoietin expression decreasing in fetal erythrocytes during severe preeclampsia was associated with inadequate erythropoietin production in maternal organism. We have also registered correlation relations of erythropoietin expression index in fetus erythrocytes with maternal, fetal and neonatal complications and it demonstrates analogous/interrelated mechanisms of indicated obstetrical pathology formation, especially preeclampsia, with possible erythropoietin participation in pathogenesis of their development.

Keywords: preeclampsia, serum erythropoietin, erythropoietin expression in fetal erythrocytes.

Преэклампсия (ПЭ) остается одной из основных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Предполагается, что формирование ПЭ происходит на ранних сроках беременности в связи с нарушением инвазии трофобласта, развитием недостаточности маточно-плацентарного кровотока и ишемией плаценты [4,5,9]. В настоящее время активно изучается участие ЭПО в патогенезе развития ПЭ, в том числе связи фетальных и неонатальных исходов с уровнем ЭПО в материнской и плодовой плазме крови, в амниотической жидкости, плаценте [6,7,11,13,14].

Согласно современным представлениям тканевая гипоксия, в том числе плацентарная, является мощным стимулятором синтеза ЭПО у плода [11,13,14]. Секретируемые ЭПО при фетальной гипоксии имеют огромное значение в связи с нейропротективным действием данного гормона, связанного с его антиапоптозным и ангиогенезстимулирующим эффектами [3,8,13,14]. Ряд исследователей установили корреляционные связи между содержанием ЭПО в плазме новорожденных, околоплодных водах, уровнем гипертензии матери, а также неонатальными показателями ацидоза и гипоксемии. Сделано предположение, что содержание ЭПО в амниотической жидкости можно использовать как маркер фетальной гипоксии, ассоциированной с неонатальной заболеваемостью, при беременности, осложненной гипертензией [11,13,14]. Таким образом, изучение связи ЭПО-статуса плода с акушерской патологией и неонатальными исходами является актуальной проблемой современного акушерства и расширяет представления о механизмах влияния ПЭ на состояние плода и новорожденного.

Целью исследования является изучение экспрессии ЭПО на эритроцитах плода в зависимости от степени тяжести ПЭ и перинатальных исходов.

Материалы и методы исследования. Проведено исследование «случай-контроль» 39 беременных женщин, которые были родоразрешены в родильном доме Клиники ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России в 2014–2015 гг. Критериями включения женщин в исследование явились срок гестации более 22 недель, информированное согласие женщины на участие в исследовании. Критерии исключения: онкозаболевания, туберкулез, тяжелая соматическая патология, психические заболевания, наркомания. Изучены особенности течения беременности и родов, проведено иммуногистохимическое исследование плаценты с целью оценки плацентарной экспрессии ЭПО на фетальных эритроцитах.

В зависимости от наличия и степени тяжести ПЭ [4] проведено исследование «случай-контроль» 11 плацент женщин, течение беременности которых не осложнилось преэклампсией (1 контрольная группа), 15 плацент (2 плаценты из бихориальной двойни) 14 пациенток с умеренной ПЭ (2 группа) и 17 плацент (2 плаценты из бихориальной двойни, 3 плаценты из трихориальной двойни) 14 женщин с тяжелой ПЭ (3 группа). Средний возраст женщин 1 группы составил $27,00 \pm 1,67$ лет, 2 – $27,63 \pm 1,05$, 3 – $30,36 \pm 1,64$.

С целью установления диагноза ПЭ и степени ее тяжести использовался клинический протокол, действительный на момент проведения исследования [62-3]. В зависимости от степени гемодинамических нарушений в системе «мать – плацента – плод» (НМПК) и синдрома задержки роста плода (СЗРП) выделены компенсированная (НМПК 1 степени и/или СЗРП 1 степени), субкомпенсированная (НМПК 2 степени и/или СЗРП 2 степени), декомпенсированная (НМПК 3 степени и/или СЗРП 3 степени) формы хронической

плацентарной недостаточности (ХПН). Оценка состояния новорожденных проводилась по шкале Апгар, физического развития – с помощью оценочных таблиц Дементьевой Г.М.

Для оценки экспрессии ЭПО в фетальных эритроцитах капилляров ворсин плаценты проведено иммуногистохимическое исследование. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к Epo (N-19): sc-1310-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, U.S.A. Количественное исследование для маркера ЭПО проводили в 10 случайно выбранных полях зрения при увеличении 400, подсчитывая количество клеток, дающих интенсивное связывание пероксидазы в 1 мм². Просмотр и фотосъемку микропрепаратов осуществляли на микроскопе «Leica» (Germany) с использованием цифровой фотокамеры «CarlZeissJena» (Germany).

Статистические расчеты (SPSSStatistica for Windows 17.0): критерии Манна – Уитни, Хи-квадрат Пирсона; отношение правдоподобия, линейно-линейная связь, при уровне значимости критерия 0,05. Дополнительно использовался непараметрический корреляционный анализ с расчетом коэффициента Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. Согласно результатам исследования (таблица 1) установлено, что НМПК и СЗРП чаще регистрировались у пациенток с ПЭ, причем случаи НМПК и/или СЗРП 2 и 3 степени были выявлены только при тяжелой ПЭ. Таким образом, частота ХПН при тяжелой ПЭ оказалось статистически значимо выше в сравнении с 1 и 2 группами. Только в группе женщин с тяжелой ПЭ выявлены случаи суб- и декомпенсированной ХПН.

Таблица 1

Результаты оценки фетоплацентарного комплекса, n (%)

	1 группа (n=11)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)
ХПН	2 (18,2)	7 (50,0%)	14 (100,0) Хи-квадрат Пирсона p=0,002 отношение правдоподобия p=0,001 линейно-линейная связь p<0,001
Субкомпенсированная ХПН	0	0	5 (35,7 %) Хи-квадрат Пирсона p=0,001 Отношение правдоподобия p=0,001 Линейно-линейная связь p=0,002
Декомпенсированная ХПН	0	0	2 (14,3 %)
НМПК	1 (9,1)	5 (35,7)	13 (92,9) Хи-квадрат Пирсона p<0,001 отношение правдоподобия p<0,001 линейно-линейная связь p<0,001
НМПК 2 степени	0	0	4 (28,6) Хи-квадрат Пирсона p=0,009 отношение правдоподобия p=0,007

			линейно-линейная связь $p=0,009$
НМПК 3 степени	0	0	1 (7,1 %)
СЗРП	(9,1)	(21,4)	9 (64,3) Хи-квадрат Пирсона $p=0,031$ отношение правдоподобия $p=0,032$ линейно-линейная связь $p=0,02$
СЗРП 2 степени	0	0	3 (21,4) Хи-квадрат Пирсона $p=0,032$ отношение правдоподобия $p=0,025$ линейно-линейная связь $p=0,026$
СЗРП 3 степени	0	0	1 (7,1)

Масса новорожденных от матерей с тяжелой ПЭ (таблица 2) оказалась достоверно меньше в сравнении с 1 и 2 группами.

Таблица 2

Морфофункциональные показатели новорожденных, $M \pm m$ (95 % ДИ)

	1 группа (n=11)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)
Масса новорожденных, грамм	3438,57±94,98 (3233,37...3643,77)	3295,00±142,23 (3091,84...3698,16)	2402,35±142,91 (2099,39...2705,31) $p_{1-3}<0,001$; $p_{2-3}=0,001$
Масса новорожденных, перцентиль	66,36±5,00; (55,21...77,51)	66,60±7,86; (49,73...83,46)	27,47±5,46 (15,87...39,06) $p_{1-3}<0,001$; $p_{2-3}=0,001$
Оценка по шкале Апгар на 1 мин, баллы	7,79±0,11 (7,53...8,03)	7,06±0,14 (6,76...7,37) $p_{1-2}=0,001$	5,50±0,47 (4,47...6,53) $p_{1-3}<0,001$; $p_{2-3}=0,001$
Оценка по шкале Апгар на 5 мин, баллы	8,14±0,14 (7,83...8,45)	7,81±0,18 (7,41...8,21)	6,42±0,52 (5,30...7,55) $p_{1-3}<0,001$; $p_{2-3}=0,003$

Примечание. Использован критерий Манна – Уитни, значимость различий при $p \leq 0,05$.

Установлены достоверные отличия по частоте асфиксии новорожденных, матери которых имели ПЭ, тяжесть асфиксии увеличивалась при тяжелой ПЭ (Хи-квадрат Пирсона $p<0,001$; отношение правдоподобия $p<0,001$; линейно-линейная связь $p<0,001$). В 3 группе зарегистрирован 1 случай антенатальной гибели плода. Новорожденные 3 группы достоверно чаще в сравнении с другими детьми имели такие серьезные осложнения течения неонатального периода, как респираторный дистресс-синдром, ателектазы легких, ВУИ новорожденного, что потребовало реанимационных мероприятий с использованием ИВЛ. Полученные результаты, несомненно, связаны не только с тяжестью ПЭ матери, но и с недоношенностью новорожденного. Действительно, срок родоразрешения при тяжелой ПЭ ($36,35 \pm 0,55$ недель) оказался достоверно меньше в сравнении с аналогичным показателем в 1 ($39,18 \pm 0,23$) и 2 группах ($38,60 \pm 0,23$).

Дополнительно изучен уровень материнского сывороточного ЭПО, КАэпо беременных, которые участвовали в исследовании (таблица 3). Показатель КАэпо при тяжелой ПЭ оказался достоверно меньше, чем в контрольной группе. Только при ПЭ нами были зарегистрированы случаи неадекватной продукции ЭПО (КАэпо менее 0,8), причем частота выявления оказалась наибольшей при тяжелой преэклампсии (50,0 % случаев).

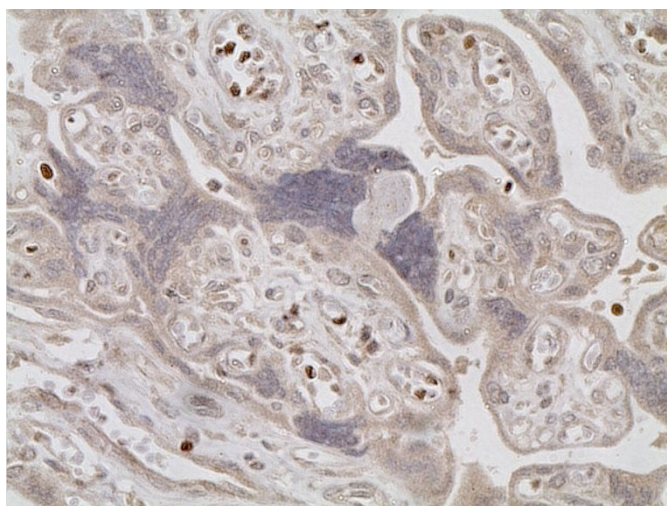
Таблица 3

Показатели ЭПО-статуса беременных женщин, $M \pm m$, 95 % ДИ, n (%)

Показатель	1 группа (n=11)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)
ЭПО	43,02±8,24 25,21...60,83	59,25±13,54 30,34...88,11	39,88±10,60 18,78...64,97
КАэпо	1,03±0,03 0,95...1,11	1,01±0,06 0,89...1,14	0,87±0,04 0,75...0,98 $p_{1-3}=0,021$
Случаи неадекватной продукции ЭПО, n (%)	0	4 (28,57%)	7 (50,0%) Хи-квадрат Пирсона $p=0,018$ Отношение правдоподобия $p=0,005$ Линейно-линейная связь $p=0,005$

Примечание. Для сравнительного анализа показателей между группами использован критерий Манна – Уитни p_{1-2} ; p_{1-3} ; $p_{2-3} \leq 0,05$.

Экспрессия ЭПО в фетальных эритроцитах сосудов ворсин плаценты женщин с умеренной ПЭ ($20,00 \pm 0,66$, 95% ДИ 18,58...21,42) не отличалась от таковой в контрольной группе ($19,46 \pm 0,41$, 95% ДИ 18,54...20,37). Однако при тяжелой ПЭ (рисунок) в сравнении с другими группами зарегистрировано снижение экспрессии ЭПО в фетальных эритроцитах капилляров ворсин плаценты ($16,53 \pm 0,29$, 95% ДИ 15,92...17,14, $p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$).



Экспрессия ЭПО в плаценте при тяжелой ПЭ. Иммунопероксидазный метод. $\times 400$

Согласно данным современной литературы максимальное число рецепторов к ЭПО обнаруживается на эритроидных клетках-предшественницах, снижаясь в процессе

эритропоза. Ряд авторов ЭПО-рецепторы на эритроцитах не описывают [1,15]. Однако существуют исследования [2,10,12], свидетельствующие о наличии на зрелых эритроцитах рецепторов к ЭПО, однако их плотность на мембране красных клеток очень низкая. Vascul.et. al. (1985) установили, что связывание ЭПО с мембраной эритроидных клеток постепенно снижается по мере созревания красных клеток (эритроциты – 0,15 ед/мл, ретикулоциты – 0,285 ед/мл, эритробласты – 0,375 ед/мл) и снижении рН среды [10]. По данным Глушкова В.С., Сторожка С.А. (2009), связывание ЭПО с рецепторами на мембране эритроцитов позволяет поддерживать кальциевые каналы в закрытом состоянии. Деграция рецепторов к ЭПО на мембранах эритроцитов по мере их старения приводит к активации кальциевых каналов и запуску эриптоза. Аналогичная ситуация зарегистрирована при дефиците ЭПО, окислительном стрессе и осмотическом шоке [2]. LangF. et. al. (2013) выявили, что чрезмерную запрограммированную гибель эритроцитов (эриптоз) стимулирует окислительный стресс: простагландин E2 активирует кальциевые, а затем калиевые каналы мембраны эритроцитов, в последующем – фосфолипазу A2. Эриптоз может включать стимуляцию каспаз с последующей деграцией цитоскелета красных клеток. Указанные процессы ингибируются ЭПО, антиоксидантами [12]. При морфометрическом исследовании плаценты женщин с тяжелой ПЭ нами зарегистрировано снижение экспрессии ЭПО в эритроцитах капилляров ворсин, что, как мы предполагаем, свидетельствует о запуске программ эриптоза в этих клетках на фоне тех патологических изменений, которые характерны для тяжелой ПЭ (гипоксия, дислипидемия, активация ПОЛ, эндотелиальная дисфункция, системное воспаление) [4,5,9].

Изучены корреляции (анализ Спирмена) показателя экспрессии ЭПО на фетальных эритроцитах капилляров ворсин плаценты с уровнем материнского сывороточного ЭПО и КАэпо. Выявлены отрицательные корреляционные связи с частотой случаев неадекватной продукции ЭПО ($r=-0,355$, $p=0,021$) и положительные – с КАэпо ($r=0,332$, $p=0,032$), что указывает на влияние не истинного уровня материнского ЭПО, а его неадекватной продукции на параметры ЭПО статуса плода.

С целью изучения значения экспрессии ЭПО на фетальных эритроцитах при таких акушерских осложнениях, как тяжелая и ранняя ПЭ, суб- и декомпенсированная ХПН, гипотрофия и асфиксия новорожденного, использован корреляционный анализ Спирмена (таблица 4).

Таблица 4

Корреляционные связи иммуногистохимических показателей экспрессии ЭПО в фетальных эритроцитах с акушерской патологией

	Фетальные эритроциты
Преэклампсия	$r=-0,715 p<0,001$
Преэклампсия тяжелая	$r=-0,723 p<0,001$
Преэклампсия ранняя	$r=-0,619 p<0,001$
Срок манифестации преэклампсии	$r=0,534 p=0,002$
ХПН	$r=-0,472 p=0,001$
ХПН суб-, декомпенсированная	$r=-0,336 p=0,028$
Масса новорожденного, грамм	$r=0,470 p=0,001$
ИВЛ новорожденного	$r=-0,348 p=0,024$
РДС новорожденного	$r=-0,506 p=0,001$

Установлено, что показатель экспрессии ЭПО на фетальных эритроцитах имеет корреляционные связи с материнскими, фетальными и неонатальными осложнениями.

Заключение. Снижение экспрессии ЭПО на фетальных эритроцитах при тяжелой ПЭ ассоциировано с неадекватной продукцией ЭПО в организме матери. Зарегистрированы корреляционные связи показателя экспрессии ЭПО на эритроцитах плода с материнскими, фетальными и неонатальными осложнениями, что свидетельствует об односторонних/взаимосвязанных механизмах формирования указанной акушерской патологии, в частности ПЭ, с вероятным участием ЭПО в патогенезе их развития.

Список литературы

1. Алексеев Н.А. Анемии / Н.А. Алексеев. – СПб.: Гиппократ, 2004. – 512 с.
2. Глушков В.С. Запрограммированная гибель эритроцитов (эриптоз) / В.С. Глушков, С.А. Сторожок // Вестник уральской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 99.
3. Захаров Ю.М. Внепочечная продукция эритропоэтина и ее регуляция / Ю.М. Захаров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 11. – С. 1217-1234.
4. Клинические рекомендации (протокол лечения) «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия». – Москва, 2013. – 57 с.
5. Клинические рекомендации (протокол лечения) «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия». – Москва, 2016. – 72 с.
6. Медведев Б.И. Значение эритропоэтина в патогенезе развития преэклампсии / Б.И. Медведев, Е.Г. Сундюкова, С.Л. Сашенков, Ю.М. Захаров // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 35-41.
7. Медведев Б.И. Эритропоэтин сыворотки крови и его плацентарная экспрессия при

беременности, осложнившейся преэклампсией / Б.И. Медведев, Е.Г. Сяндюкова, С.Л. Сашенков // *Акушерство и гинекология*. – 2015. – № 10. – С. 47-53.

8. Осиков М.В. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, В.Ю.Ахматов, Л.Ф. Телешева, А.А. Федосов, Ю.И. Агеев, Л.Г. Суровяткина // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 7. – С. 218-224.

9. Преэклампсия: руководство [под ред. Г.Т. Сухих, Л.Е. Мурашко]. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 576 с.

10. Baciu I. Erythropoietin binding to the red cell membranes / I. Baciu, L. Ivanof, T. Pavel, C. Marina, M. Zirbo, C. Zdrenghea // *Physiologie*. – 1985. – Vol. 22, № 4. – P. 227-231.

11. Gupta G., Gupta I., Suri V., Dhawan V., Ganguly N.K. Estimation of cord blood erythropoietin in pre-eclampsia and eclampsia / G. Gupta, I. Gupta, V. Suri, V. Dhawan, N.K. Ganguly // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 2000. – Vol. 71, № 1. – P. 1-5.

12. Lang F., Abed M., Lang E., Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death / F.Lang, M. Abed, E. Lang, M. Föller // *Antioxid Redox Signal. Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 138-53.

13. Teramo K.A. Amniotic fluid and cord plasma erythropoietin levels in pregnancies complicated by preeclampsia, pregnancy-induced hypertension and chronic hypertension / K.A. Teramo, V.K. Hiilesmaa, R. Schwartz, G.K. Clemons, J.A. Widness // *J. Perinat. Med.* – 2004. – Vol. 32, № 3. – P. 240-247.

14. Teramo K.A. Increased fetal plasma and amniotic fluid erythropoietin concentrations: markers of intrauterine hypoxia / K.A. Teramo, J.A. Widness // *Neonatology*. – 2009. – Vol. 95, № 2. – P. 105-116.

15. Wickrema A. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells / A. Wickrema, S.B. Krantz, J.C. Winkelmann, M.C. Bondurant // *Blood*. – 1992. – Vol. 80, № 8. – P. 1940-1949.