

На правах рукописи

Приходько Николай Геннадьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ИНВАЗИИ
ЦИТОТРОФОБЛАСТА ПРИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В
ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Благовещенск, 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор РАН Андриевская Ирина Анатольевна

Научный консультант: доктор медицинских наук, доцент Жуковец Ирина Валентиновна

Официальные оппоненты:

Семёнова Наталья Викторовна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск.

Фефелова Елена Викторовна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Чита.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск.

Защита состоится «21» декабря 2023 в 09:00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.062.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» и федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д.95.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», <https://cfpd.ru/>

Автореферат разослан «__»_____2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Приходько Анна Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Цитомегаловирус (ЦМВ) является ведущей инфекционной патологией, которая ассоциирована с угрозой самопроизвольного выкидыша с частотой встречаемости в диапазоне от 18% до 25% беременностей. Серопревалентность ЦМВ среди женщин детородного возраста в развитых странах колеблется от 50 до 85%, в развивающихся странах серопревалентность приближается к 100% (Шахгильдян В.И. и соавт., 2020; Gorun F. et al., 2020), тогда как в России серопревалентность обнаруживается у беременных женщин в диапазоне от 90 до 100% (Ивахнишина Н.М. и соавт., 2017; Петров Ю.А. и соавт., 2017; Петров Ю.А. и соавт., 2019). Маркеры острой ЦМВ инфекции в различные периоды гестации выявляются примерно у 30-45% беременных (Асранкулова Д.Б., 2020; Дмитриева Т.Г. и соавт., 2020; Петрова К.К., 2019). При этом маркеры ее реактивации часто обнаруживаются в родовых путях, что увеличивает риск инфицирования плаценты и околоплодных вод (Forman M.S. et al., 2019; Ju D. et al., 2020).

В отличие от других инфекций группы TORCH (Тохорlasma (токсоплазменная инфекция) - Rubella (краснуха) - Cytomegalovirus (цитомегаловирус) - Herpes (герпес)) ЦМВ инфекция приводит к развитию повреждений плода в любом триместре беременности (Рюмин А.М. и соавт., 2017), но наиболее значимые – при инфицировании в первой ее половине (Короткова Н.А., 2018; Demmler-Harrison G.J. et al., 2020; Pereira L., 2018).

Независимо от пути инфицирования ЦМВ проникает в кровь, что приводит к развитию кратковременной виремии с внедрением в лейкоциты и мононуклеарные фагоциты, где происходит репликация вируса и его распространение (Min C.K. et al., 2020). Инфицирование эндотелиальных клеток микроциркуляторной системы матки ЦМВ вызывает повреждение и нарушение дифференцировки трофобласта (León-Juárez M. et al., 2019). В экспериментальных исследованиях показано снижение инвазии и миграции цитотрофобласта под действием ЦМВ (Lin X. et al., 2020). Однако молекулярная сигнализация, лежащая в основе наблюдаемого ЦМВ-индуцированного повреждения плаценты, до сих пор не раскрыта, а клеточные механизмы, участвующие в инвазии трофобласта, требуют дальнейших исследований.

Считается, что процесс инвазии цитотрофобласта контролируется рядом факторов, включая систему матриксных металлопротеиназ (ММП) (Гришко Т.В. и соавт., 2017; Chen C. et al., 2020; Liu E. et al., 2020). Показано подавляющее влияние ММП на инвазивные процессы (He Y. et al., 2018).

Одним из ферментов, экспрессируемым в трофобласте, является ММП-9 (Frolova A.S. et al., 2020). Гестагены, факторы роста и провоспалительные цитокины прямо или опосредованно через тканевой ингибитор металлопротеиназ (ТИМП) выступают в роли регуляторов, лимитирующих инвазию (Дубоссарская З.М., 2012; Yang X. et al., 2021). Имеются сведения о стимулирующем влиянии прогестерона на интенсивность изменений внеклеточного матрикса под действием ММП-9 (Allen T.K. et al., 2019), хотя специфические эффекты стероида, через которые осуществляются метаболические пути регуляции действия провоспалительных цитокинов на процессы инвазии цитотрофобласта, остаются до конца не выясненными.

Не достаточно изучен механизм ингибирующего действия фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и растворимой его формы рецептора (δ TNF-R1) на экспрессию ММП-9 в трофобласте. На примере интерлейкина 1 бета (IL-1 β) и IL-10 показано их опосредованное влияние на ММП (Тихаева К.Ю. и соавт., 2020). Предполагается, что повышение уровня IL-1 β стимулирует выработку ММП

трофобластом, а IL-10 выступает в роли иммуносупрессора, что обеспечивает иммунологическую толерантность эмбриона организмом матери. Также показана способность MMP высвобождать сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF), участвующий в процессе ремоделирования маточных сосудов, васкулогенезе и инвазии трофобласта. Вместе с тем, нарушение регуляции инвазивных процессов и формирование эмбриохориальной недостаточности на любом уровне приводит к дисбалансу активности и ингибированию продукции MMP (Lin X. et al., 2020). Ранние потери беременности могут быть связаны с низким уровнем MMP-9 (Тихаева К.Ю. и соавт., 2020). Также отмечено влияние провоспалительных факторов на адаптивные свойства клеток врожденного иммунитета (Коваленко Е.И. и соавт., 2016), что приводит к изменению экспрессии поверхностных рецепторов для цитокинов и сигнализации в трофобласте на этапе формирования эмбриохориального комплекса.

Таким образом, комплексное исследование системы цитокинов, половых гормонов, факторов роста, протеолитических ферментов, участвующих в деградации внеклеточного матрикса, и их ингибиторов расширит понимание закономерностей нарушения инвазии цитотрофобласта при обострении ЦМВ инфекции.

Полученные теоретические данные могут иметь большое практическое значение и быть использованы в прогностическом мониторинге беременных по развитию самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции.

Цель исследования. Выявление механизмов нарушения цитотрофобластической инвазии для поиска биохимических предикторов самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции.

Задачи исследования

1. Оценить особенности функционирования и определить связь показателей про-/противовоспалительных цитокинов (TNF- α , sTNF-R1, IL-1 β , IL-10), ядерного транскрипционного фактора NF- κ B и трофобластических гормонов (прогестерон, эстрадиол) на системном (периферическая кровь) и локальном (ворсинчатый хорион) уровнях при обострении ЦМВ инфекции и латентном течении заболевания у женщин в первом триместре беременности.

2. Провести анализ и сопоставить изменения в процессах, характеризующих состояние маточно-плацентарного ангиогенеза (плацентарный фактор роста (PIGF), VEGF-A, *fms*-подобной тирозинкиназы (sFlt-1)) и инвазивной способности цитотрофобласта (MMP-9, TIMP-1) на системном и локальном уровнях при обострении ЦМВ инфекции и латентном течении заболевания у женщин в первом триместре беременности.

3. Дать гистологическую и иммуногистохимическую оценку состояния эмбриохориального комплекса, учитывающую процессы гравидарной трансформации децидуальной ткани и ремоделирования маточных сосудов, инвазирующей способности цитотрофобласта при обострении ЦМВ инфекции.

4. Определить факторы риска потери беременности у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре.

5. Выявить биохимические предикторы и разработать прогностическую модель механизмов развития самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции.

Научная новизна. Получены новые теоретические данные, расширяющие представление о механизмах самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции в первом триместре беременности. Доказано, что выраженность изменений цитокинового (TNF- α , sTNF-R1, IL-1 β , IL-10) и гормонального (прогестерон,

эстрадиол) дисбаланса, а также активности транскрипционного ядерного фактора NF- κ B на системном и локальном уровнях зависит от формы ЦМВ инфекции в первом триместре беременности. Выявлен значимый вклад высокого уровня TNF- α , а также низких уровней IL-10 и эстрадиола в развитие осложнений первого триместра беременности, вызванных обострением ЦМВ инфекцией. Впервые показано, что у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности, в отличие от латентного течения заболевания, усиление провоспалительного действия TNF- α и IL-1 β приводит к формированию недостаточности ангиогенной регуляции эмбриохориального комплекса, характеризующейся одновременным увеличением содержания sFlt-1 и снижением факторов роста VEGF-A и PlGF в экстрактах ворсинчатого хориона. Выявлена связь обострения ЦМВ инфекции с изменчивостью показателей про-/антиангиогенных факторов в периферической крови у женщин в первом триместре беременности. Впервые выявлена связь обострения ЦМВ инфекции в первом триместре беременности с уменьшением содержания в экстрактах ворсинчатого хориона MMP-9 и повышением уровня тканевого ингибитора TIMP-1, вызывающих нарушение инвазии цитотрофобласта. Латентное течение заболевания характеризуется компенсаторным повышением уровня MMP-9 в экстрактах ворсинчатого хориона при отсутствии изменений TIMP-1, определяющих активность инвазии цитотрофобласта и формирование эмбриохориального комплекса. Морфологическими критериями самопроизвольного выкидыша, ассоциированным с обострением ЦМВ инфекцией, являются признаки локальной воспалительной реакции (инфильтрация, отек, фибриноидный некроз), определяющие задержку ремоделирования сосудов матки, инвазии цитотрофобласта, формирования и дифференцировки ворсин хориона. Выявлена связь низкой активности цитокератина 8 и нарушения инвазивной способности цитотрофобласта у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности. В результате проведенного исследования с использованием многофакторного пошагового дискриминантного анализа продемонстрирована возможность использования определения TNF- α , NF- κ B и sFlt-1 в комплексном диагностическом мониторинге беременных с обострением ЦМВ инфекции для выделения групп риска по развитию самопроизвольного выкидыша. Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентами на изобретения РФ (№ 2751965, № 2762485, № 2782111).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в том, что получены новые данные, расширяющие представления о роли обострения ЦМВ инфекции в первом триместре беременности в нарушении инвазии цитотрофобласта и формирования эмбриохориального комплекса, определяющим гибель эмбриона и развитие самопроизвольного выкидыша.

Практическую значимость имеют разработанные способ прогнозирования угрозы прерывания беременности (патент РФ №2751965), способ прогнозирования угрозы выкидыша (патент РФ №2762485) и способ оценки нарушения инвазии трофобласта (патент РФ №2782111).

Методология и методы работы. В период с 2018 по 2020 годы проведено исследование «Случай-контроль» 193 женщин в первом триместре беременности. Диссертационное исследование включало оформление и анализ тематических карт, современные биохимические, гистологические, гистохимические и иммуногистохимические методы исследования цитокинов, гормональных, ростовых и транскрипционных факторов и их сигнальных путей, протеолитических и инвазивных

процессов. В настоящей работе использованы методы статистического анализа значимости различий исследуемых показателей, их множественных корреляций, многофакторный дискриминантный анализ, ROC-анализ, расчет относительных рисков.

Положения, выносимые на защиту

1. Дисбаланс продукции про-/противовоспалительных цитокинов и половых гормонов, индукция провоспалительного сигналинга у женщин с ЦМВ инфекцией в первом триместре беременности, вызывают развитие воспаления и эмбриохориальной недостаточности.

2. Развитие локального воспалительного ответа у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности приводит к нарушению ангиогенной регуляции и инвазивной способности цитотрофобласта.

3. Разработаны биохимические предикторы нарушения формирования эмбриохориального комплекса и их пороговые значения, вошедшие в прогностическую модель развития самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов. Объективность и достоверность полученных результатов исследования обеспечена достаточным количеством исследуемого материала, однородностью выборки и адекватностью выбора современных биохимических, гистологических, гистохимических и иммуногистохимических и статистических методов анализа.

Основные материалы и положения работы были представлены на Международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (Благовещенск, 2018; 2020; 2021); научной конференции «Молодые ученые – науке» (Благовещенск, 2019, 2020); VIII Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (Благовещенск, 2019); IX Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (Благовещенск, 2021); VIII межрегиональной научной конференции «Дискуссионные вопросы акушерства и гинекологии», (Благовещенск, 2021 г.), X Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (Благовещенск, 2023).

Внедрение. Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-практическую деятельность профильных структурных отделений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (г. Благовещенск), в учебный процесс Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Благовещенск): лекционный курс и практические занятия на кафедрах физиологии и патофизиологии, а также акушерства и гинекологии.

На основании результатов исследования были разработаны и внедрены в клиническую практику способ прогнозирования угрозы прерывания беременности (патент РФ №2751965), способ прогнозирования угрозы выкидыша (патент РФ №2762485) и способ оценки нарушения инвазии трофобласта (патент РФ №2782111).

Личное участие автора. Личный вклад соискателя заключается в выполнении основного объема теоретических данных (подбор и анализ научной литературы), участии в сборе, обработке и интерпретации полученных данных, оформлении результатов исследования в виде публикаций, презентации данных на конференциях, оформлении текста диссертации.

Автор выражает глубокую признательность Довжиковой Инне Викторовне, доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Кутеповой Ольге Леонидовне, кандидату медицинских наук, младшему научному сотруднику лаборатории молекулярных и трансляционных исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» за помощь в проведении гистологических и иммуногистохимических исследований.

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работ, в числе которых 3 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 5 публикаций в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Соавтор 1 монографии, 3 патентов РФ на изобретение, методического пособия.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, главы обсуждение, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающего 339 источников, из них 151 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследование проведено в ДНЦ ФПД (2018-2020гг). Сбор образцов материала осуществлялся в гинекологическом отделении ГАУЗ Амурской области «Благовещенская городская клиническая больница» (г. Благовещенск). Исследование соответствует стандартам надлежащей клинической практики в РФ (Приказ Министерства Здравоохранения РФ № 200н от 01.04.2016) и положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013г.). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике при ДНЦ ФПД (протокол № 130-Д от 15.11.2018). Все обследуемые женщины проинформированы о целях исследования. Подписано информированное согласие на проведение исследований.

Проведено кагортное исследование по типу «случай-контроль» со 193 беременными женщинами на сроке беременности 7-10 недель. Дизайн исследования представлен на рисунке 1

Основная группа представлена 150 женщинами с подтвержденным серологическими и молекулярно-генетическими методами диагнозом хроническая ЦМВ инфекция, из них 57 с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре (подгруппа 1) и 93 – с латентным течением ЦМВ инфекции (подгруппа 2). Контрольную группу составили 43 серонегативные по ЦМВ беременные женщины. Критерии включения в основную группу: возраст от 20 до 28 лет; наличие подписанной формы информированного согласия; первый триместр беременности; латентное течение или обострение ЦМВ инфекции; стойкая клиническая ремиссия воспалительных заболеваний экстрагенитальной локализации и инфекций, передающихся половым путем; случаи самопроизвольного прерывания беременности. Критерии включения в контрольную группу: возраст женщины от 20 до 28 лет; наличие подписанной формы информированного согласия; отсутствие прямых маркеров ЦМВ инфекции; стойкая клиническая ремиссия воспалительных

заболеваний экстрагенитальной локализации и инфекций, передающихся половым путем. Критериями исключения из обеих групп были: возраст женщины старше 28 лет; первичная герпесвирусная, вызванная вирусом простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, или ЦМВ инфекции; наличие острых воспалительных заболеваний экстрагенитальной локализации и тяжелой соматической патологии; аномалии развития внутренних половых органов; привычное невынашивание беременности.

Диагноз первичная ЦМВ инфекция ставили при обнаружении антител IgM и низкоавидных антител IgG к ЦМВ с авидностью <50% в сыворотке крови и выявлении ДНК ЦМВ в образцах крови и мочи. Хроническую ЦМВ инфекцию, в период обострения, диагностировали, основываясь на выявлении в сыворотке крови антител IgM и высокоавидных антител IgG к ЦМВ с авидностью 65% и более, наличия ДНК ЦМВ в образцах мочи, крови, отделяемом влагалища и цервикального канала, буккальном эпителии. Латентное течение инфекции диагностировали на основании выявления в сыворотке крови высокоавидных антител IgG к ЦМВ с авидностью 65% и более, ДНК ЦМВ – в отделяемом влагалища и цервикального канала, буккальном эпителии.

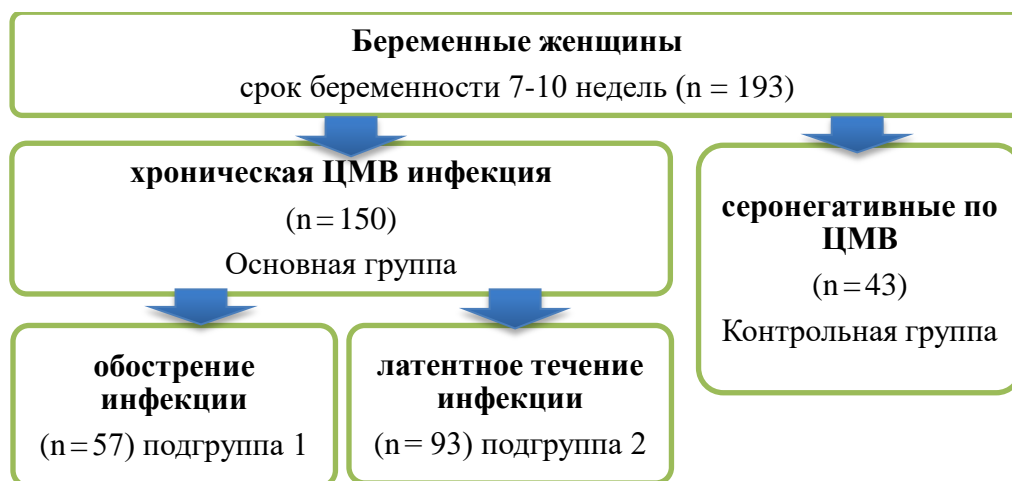


Рисунок 1. Дизайн исследования.

Забор образцов крови осуществлялся методом венепункции в пробирки с антикоагулянтом и него. Сыворотку крови получали методом центрифугирования: время составляло 20 минут, а скорость 1000g. Пробы мочи получали методом центрифугирования, с последующим ресуспендированием осадка в стерильной среде (0,218M сахараза (Реахим, Россия), 0,0038M KH_2PO_4 (Реахим, Россия), 0,0072M K_2HPO_4 (Реахим, Россия), 1% бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, Япония)).

Забор буккального эпителия проводился стерильными одноразовыми зондами (Zhenjiang Gongdong Medical Technology Co. Ltd., КНР), которые помещали в транспортную среду (стерильный раствор хлорида натрия 0,9%) и хранили в холодильнике (температура хранения +2°–+5°C, срок хранения – не более 7 суток). Получение материала отделяемого влагалища и цервикального канала проводился с помощью стерильных одноразовых урогенитальных зондов (Unicorn Med., КНР), с последующим внесением в пробирку с транспортной средой (стерильный раствор хлорида натрия 0,9%). Хранили в холодильнике (температура хранения +2°–+5°C, срок хранения – не более 7 суток).

Ворсинчатый хорион забирался после инструментальной ревизии полости матки при случаях самопроизвольного выкидыша, а также после проведения медицинского

аборта. Экстракт ткани получали методом центрифугирования гомогената (время 15 мин / скорость 3000g, температура +4° С), полученного вышеописанным способом.

Иммуноферментным методом анализа (ИФА) определяли: антитела класса IgM (качественно) и IgG (количественно) к ВПГ-1,2 и ЦМВ, авидность IgG к ВПГ-1,2 и ЦМВ (количественно); прогестерон, эстрадиол, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), растворимый рецептор к TNF- α (sTNF-R1), интерлейкин 1 бета (IL-1 β), сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF), растворимый рецептор к VEGF (sVEGF-R1 / sfms-подобная тирозинкиназа), плацентарный фактор роста (PLGF), ядерный транскрипционный фактор каппа В (NF- κ B (p65)) (NF- κ B (p65), матриксная металлопротеиназа 9 (ММП-9), тканевой ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1). Исследования проводились в сыворотке крови, согласно протоколам, для постановки ИФА от фирмы-производителя.

Для обнаружения ЦМВ в образцах биологического материала использовали методы молекулярно-биологического исследования – детекцию ДНК ЦМВ в полученных образцах. Определяли ДНК ЦМВ в образцах мочи, в цельной периферической крови, в содержимом цервикального канала, в буккальном эпителии, методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на анализаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология», Россия).

Биопробы ворсинчатого хориона после фиксации в нейтральном 10% забуференном растворе формалина подвергали гистологической проводке, затем заливали в гомогенизированную парафиновую среду по общепринятой методике. Для микроскопии использовали срезы толщиной 3-5 мкм с применением обзорной окраски препаратов гематоксилином и эозином по Бёмеру.

Гистохимический метод анализа был использован для обнаружения прогестерондегидрогеназы (ПрДГ) и эстрадиолдегидрогеназы (ЭДГ) в образцах ворсинчатого хориона по методу З. Лойда (1982) в модификации М.Т. Луценко (2015). С помощью программы компьютерной цитофотометрии подсчитывали количество образующихся продуктов реакции методом измерения на стандартную единицу площади 0,01 (зонд) в 100 различных точках объекта (пиксель/мкм²).

При идентификации интерстициального цитотрофобласта на парафиновых срезах использовали иммуногистохимическую реакцию на цитокератин (СК8) по стандартному стрептавидин-биотин-пероксидазному методу с моноклональными антителами (Cytokeratin 8 Monoclonal Antibody (35bH11), Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA). Срезы докрашивали гематоксилином-эозином.

Для статистической обработки данных использовали программу IBM SPSS Statistics 23 (США) с соблюдением общих рекомендаций для медико-биологических исследований. Проверка принадлежности показателей закону нормального распределения проводилась при помощи критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. При нормальном типе распределений применяли параметрический принцип статистической обработки – критерий Стьюдента. Для описания количественных данных использовались показатели среднего арифметического и стандартного отклонения в формате М (SD). Категориальные данные представлены в виде долей, частот и процентов. Сравнение групп по качественному бинарному признаку проводилось с помощью критерия χ^2 Пирсона или точного теста Фишера число степеней свободы (df) для критерия χ^2 и уровень статистической значимости различий (p). Влияние установленного фактора оценивали при $\geq 95\%$ доверительного интервала (ДИ) и согласно величинам относительного риска (ОР). Подсчет 95% ДИ для частот и долей производился онлайн-калькулятором (Sauro J., Lewis J.R., 2005)

(<http://www.measuringu.com/wald#point>). ДИ не включал 1, при условии, если и нижняя и верхняя границы находились по одну сторону от 1, то делался вывод о статистической значимости установленной связи между фактором и исходом с вероятностью ошибки $p < 0,05$. Многофакторный математический анализ с выявлением наиболее весомых показателей, ранга их информативности по F-критерию Фишера и веса каждого показателя (дискриминантный анализ) проводился с использованием описательной статистики и методов математического моделирования для получения прогностических дискриминантных уравнений. Для оценки качества построенной прогностической модели был использован ROC-анализ, (receiver operating characteristic) в ходе которого определяли площадь под кривой ROC AUC (area under curve), а также проводили расчет чувствительности и специфичности. При AUC, составляющем от 0,9 до 1 отмечали отличное качество модели, от 0,8 до 0,9 – очень хорошее, от 0,7 до 0,8 – хорошее, от 0,6 до 0,7 – среднее, от 0,5 до 0,6 – неудовлетворительное.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Показатели продукции цитокинов в крови и в экстрактах ворсинчатого хориона при различных типах течения ЦМВ инфекции в первом триместре беременности

На первом этапе была проведена оценка содержания про-/противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-10) и регуляторов их активности (растворимого рецептора sTNF-R1, ядерного транскрипционного фактора NF- κ B) в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона исследуемых групп женщин. Выбор данных цитокинов не случаен и определяется их вкладом в регуляцию процессов инвазии цитотрофобласта. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

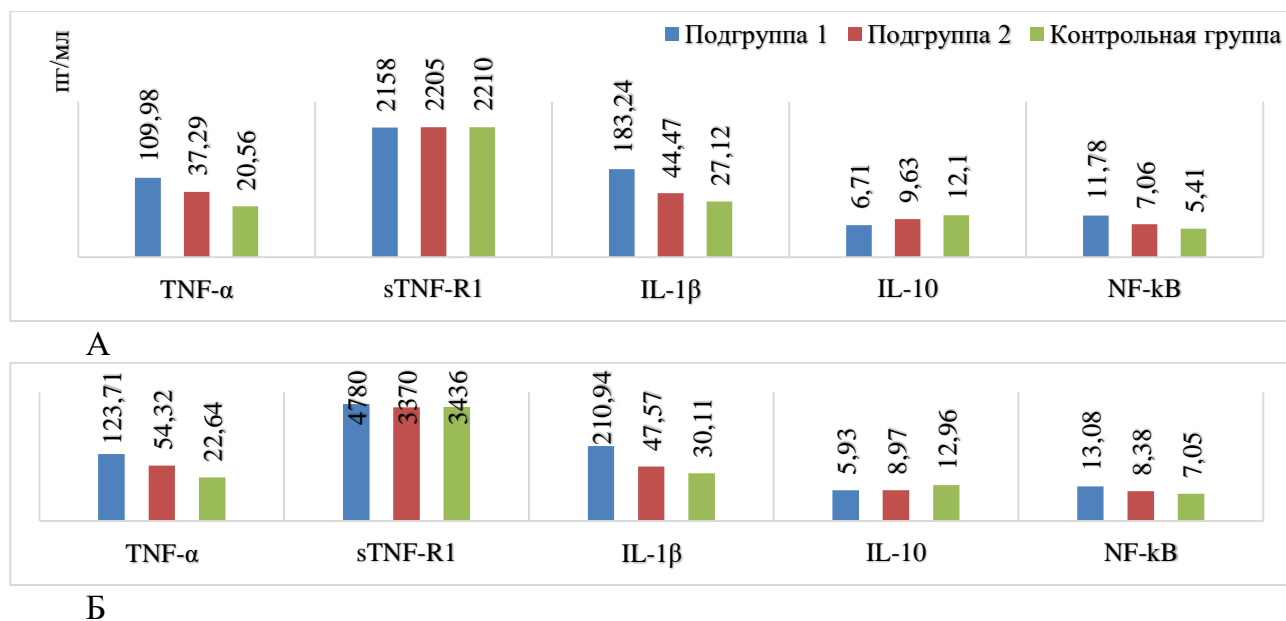


Рисунок 2. Показатели цитокинемии в исследуемых группах. А – в сыворотке крови. Б – в экстракте ворсинчатого хориона. Здесь и далее: в столбцах цифрами обозначены средние значения показателей (M).

По данным сравнительного анализа выявлено, что в подгруппе 1 уровень провоспалительного цитокина TNF- α в подгруппе 1 был выше в сыворотке крови в 5,34 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 5,2 раза ($p < 0,001$), чем в контрольной группе, и выше в 2,32 раза ($p < 0,001$) и 2,17 раза ($p < 0,001$), чем в подгруппе 2. В подгруппе 2 показатели TNF- α были выше в сыворотке крови в 2,3 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 2,4 раза ($p < 0,001$), чем в контрольной группе.

Уровень растворимого рецептора sTNF-R1 в сыворотке крови в подгруппе 1 не изменялся ($p > 0,05$), тогда как в экстрактах ворсинчатого хориона отмечалось повышение показателей в 1,23 раза и в 1,21 раза ($p < 0,001$ соответственно) по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2. В подгруппе 2 показатели sTNF-R1 в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона не различались по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$ соответственно).

Расчет TNF- α /sTNF-R1 в подгруппе 1 показал, что коэффициент соотношения был выше в сыворотке крови в 5,1 раза и в 2,43 раза ($p < 0,001$ соответственно), чем в контрольной группе и в подгруппе 2. В экстрактах ворсинчатого хориона расчетные показатели были выше в 3,71 раза и в 1,24 раза ($p < 0,001$ соответственно), чем в контрольной группе и в подгруппе 2. В подгруппе 2 коэффициент соотношения был выше в сыворотке крови в 2,1 раза и в экстрактах ворсинчатого хориона в 3 раза ($p < 0,001$ соответственно), чем в контрольной группе.

Уровень другого провоспалительного цитокина IL-1 β в подгруппе 1 был выше в сыворотке крови в 6,76 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 7 раз ($p < 0,001$), чем в контрольной группе, и в 4,12 раза ($p < 0,001$) и в 4,43 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2. В подгруппе 2 показатели IL-1 β были выше в сыворотке крови в 1,63 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 1,57 раза ($p < 0,001$), чем в контрольной группе.

Сравнение показателей противовоспалительного IL-10 в подгруппе 1 выявило снижение уровня в сыворотке крови в 1,8 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 2,18 ($p < 0,001$) раза по сравнению с контрольной группой, в 1,43 раза ($p < 0,001$) и в 1,51 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2. В подгруппе 2 показатели IL-10 в сыворотке крови были выше в 1,26 раза ($p < 0,001$) и в экстрактах ворсинчатого хориона в 1,44 раза ($p < 0,001$), чем в контрольной группе.

Показатели ядерного транскрипционного фактора NF- κ B в подгруппе 1 были выше в 2,18 раза ($p < 0,001$) в сыворотке крови и в 1,85 раза ($p < 0,001$) в экстрактах ворсинчатого хориона, чем в контрольной группе, и в 1,67 раза ($p < 0,001$) и 1,56 раза ($p < 0,001$) выше, чем в подгруппе 2. В подгруппе 2 показатели NF- κ B в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона значимо не различались по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ системных и локальных показателей про-/противовоспалительных цитокинов в исследуемых группах выявил следующие закономерности. В подгруппе 1 показатели sTNF-R1 в экстрактах ворсинчатого хориона были в 2,21 раза ($p < 0,001$) выше, а коэффициент соотношения TNF- α /sTNF-R1, наоборот, был в 1,96 раза ($p < 0,001$) ниже, чем в сыворотке крови, что могло указывать на развитие локального воспалительного ответа, вызванного TNF- α . При этом показатели TNF- α , IL-1 β , IL-10 и NF- κ B в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона значимо не различались ($p > 0,05$ соответственно). В подгруппе 2 также отсутствовали значимые различия в показателях TNF- α , sTNF-R1, TNF-

α/s TNF-R1, IL-1 β в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона ($p > 0,05$, соответственно).

Дальнейшие исследования, проведенные с использованием пошагового корреляционно-регрессионный анализа, выявили следующие ассоциации цитокинов с развитием осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции: TNF- α ($r = -0,80, p < 0,05$), IL-10 ($r = 0,67, p < 0,05$), IL-1 β ($r = -0,64, p < 0,05$), и NF-kB ($r = -0,55, p < 0,05$). При этом наибольший вклад в развитие осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции вносили высокие показатели TNF- α ($\beta = -3,12, p < 0,05$) и низкие IL-10 ($\beta = -0,69, p < 0,05$).

Анализ стохастических связей в подгруппе 1 выявил корреляции между системными и локальными показателями TNF- α ($r = 0,85, p < 0,05$), sTNF-R1 ($r = 0,79, p < 0,05$), IL-1 β ($r = 0,77, p < 0,05$), IL-10 ($r = 0,78, p < 0,05$) и NF-kB ($r = 0,87, p < 0,05$). В подгруппе 2 значимые корреляции были между системными и локальными показателями IL-1 β ($r = 0,81, p < 0,05$) и IL-10 ($r = 0,79, p < 0,05$).

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что напряженность цитокиновой регуляции в системе мать-хорион-эмбрион при обострении ЦМВ инфекции, в отличие от латентного течения заболевания, может служить триггером в формировании гормональных нарушений, определяющих развитие эмбриохориальной недостаточности.

Особенности продукции половых гормонов у женщин при цитомегаловирусной инфекции в первом триместре беременности

Основываясь на патогенетической роли цитокиновой и гормональной систем в формировании эмбриохориального комплекса, была проведена биохимическая и гистохимическая оценка уровня прогестерона и эстрадиола в исследуемых группах (рисунок 3).

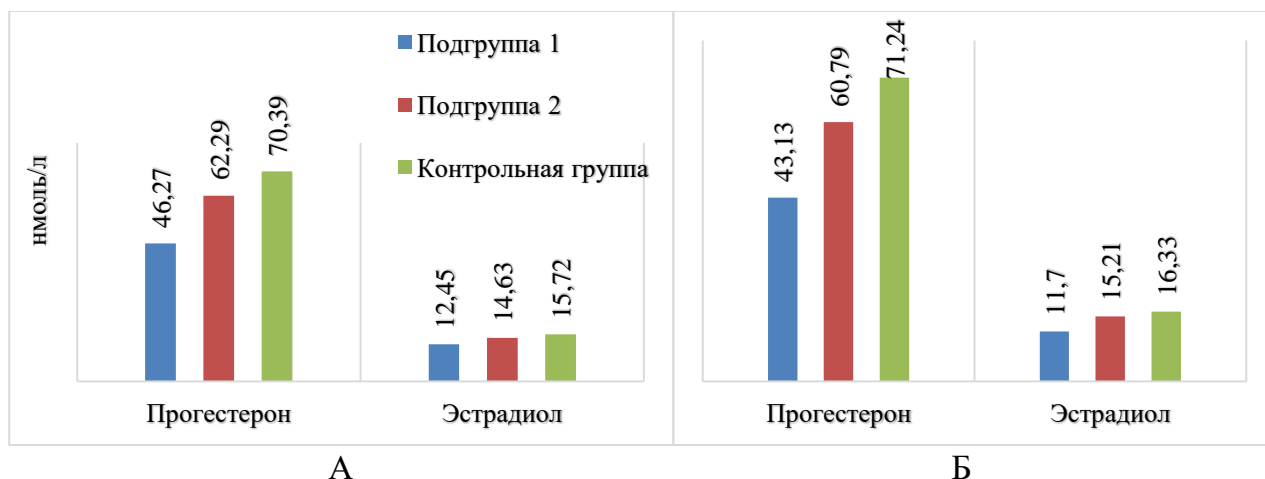


Рисунок 3. Показатели прогестерона и эстрадиола в исследуемых группах. А – в сыворотке крови. Б – в экстракте ворсинчатого хориона.

В подгруппе 1 выявлено снижение уровня прогестерона в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона в 1,52 раза ($p < 0,001$) и в 1,65 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой и в 1,39 раза ($p < 0,001$) и в 1,48 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2. В подгруппе 2 уровень гормона в сыворотке крови и в

экстрактах ворсинчатого хориона был ниже в 1,13 раза ($p<0,05$) и в 1,17 раза ($p<0,05$), чем в контрольной группе.

Сравнительный анализ содержания эстрадиола в подгруппе 1 выявил снижение его показателей в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона в 1,23 раза ($p<0,001$) и в 1,39 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой, в 1,17 раза ($p<0,05$) и в 1,23 раза ($p<0,05$) по сравнению с подгруппой 2. В подгруппе 2 в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона значимых различий по сравнению с контрольной группой выявлено не было ($p>0,05$).

При сравнительном анализе системных и локальных показателей прогестерона и эстрадиола значимых различий в исследуемых подгруппах выявлено не было ($p>0,05$).

В ходе дальнейших исследований, выполненных с использованием гистохимических маркеров оценки содержания прогестерона и эстрадиола, выявлено нарушение локальной продукции гормонов в исследуемых подгруппах (рисунок 4). В подгруппе 1 выявлено снижение показателей гистохимического маркера на прогестерон (прогестерондегидрогеназа) в 1,63 раза ($p<0,001$) и в 1,43 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2, что соотносилось с иммуноферментными показателями гормона, представленными на рисунке 3. В подгруппе 2 показатели прогестерона были снижены в 1,17 раза по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

Оценивая содержание гистохимического маркера на эстрадиол (эстрадиолдегидрогеназа) в подгруппе 1 выявлено снижение показателей в 1,39 раза ($p<0,001$) и в 1,29 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2, что соотносилось с иммуноферментными показателями гормона, представленными на рисунке 3. В подгруппе 2 показатели эстрадиола значимо не изменялись по сравнению с контрольной группой ($p>0,05$).

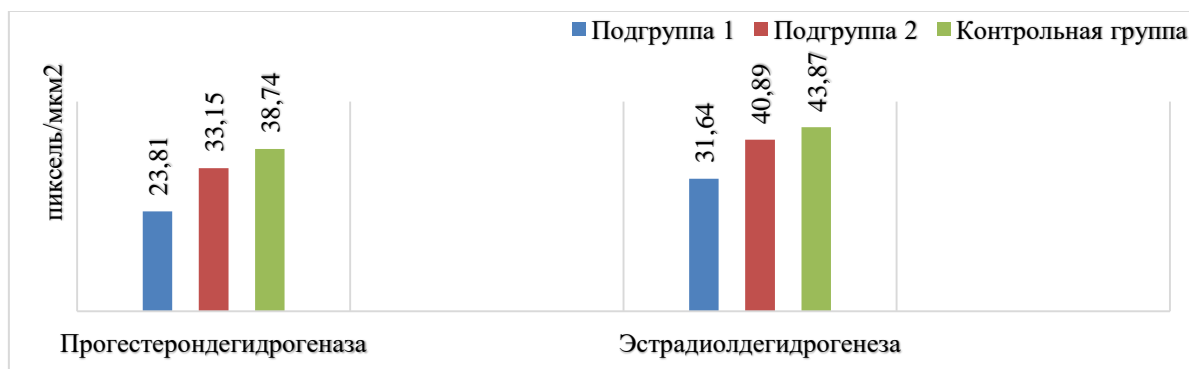


Рисунок 4. Цитофотометрические показатели прогестерондегидрогеназы и эстрадиолдегидрогеназы в ворсинчатом хорионе в исследуемых группах.

Дальнейший корреляционно-регрессионный анализ выявил ассоциацию ($r=0,55$, $p<0,05$) и вклад низких показателей эстрадиола в развитие осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции ($\beta = 0,25$, $p<0,05$). Анализ стохастических связей между системными и локальными параметрами в подгруппе 1 выявил корреляции между показателями прогестерона ($r = 0,76$, $p<0,05$) и эстрадиола ($r=0,74$, $p<0,05$). В подгруппе 2 значения (r) аналогичных корреляций соответственно составили 0,79 ($p<0,05$) и 0,73 ($p<0,05$).

Дополнительно был проведен анализ взаимосвязи и вклада исследуемых цитокинов в изменение показателей прогестерона и эстрадиола в подгруппах

(рисунок 7 А, Б). В подгруппе 1 выявлена корреляция прогестерона с TNF- α ($r = -0,78$, $p < 0,001$) и NF-kB ($r = -0,79$, $p < 0,001$). Значения стандартизованного коэффициента регрессии (β), отражающего вклад высоких показателей цитокинов и ядерного фактора транскрипции в снижение уровня прогестерона, составили: для TNF- α – $-0,38$ ($p < 0,01$) и NF-kB – $-0,45$ ($p < 0,01$). Показатели эстрадиола также коррелировали с TNF- α ($r = -0,85$, $p < 0,001$) и NF-kB ($r = -0,83$, $p < 0,001$). Значения β для TNF- α составили $-0,52$ ($p < 0,001$), для NF-kB – $-0,37$ ($p < 0,01$). В подгруппе 2 выявлена значимая корреляция прогестерона с IL-1 β ($r = -0,67$, $p < 0,01$), значения коэффициента β составили $-0,67$ ($p < 0,01$). Показатели эстрадиола также коррелировали с IL-1 β , значения коэффициентов r и β соответственно составили $-0,70$ ($p < 0,001$).

Следовательно, обострение ЦМВ инфекции в первом триместре беременности может быть связано с запуском воспалительных реакций через активацию сигнального пути NF-kB и повышение уровня TNF- α , что нарушает состояние гормонообразовательных и соответственно инвазивных процессов. В подгруппе с латентным течением ЦМВ инфекции связь IL-1 β , прогестерона и эстрадиола также может указывать на модулирующую роль изменений иммуно-гормональных отношений в регуляции процессов, контролируемых формированием эмбриохориального комплекса.

Характер изменений про-/антиангиогенных факторов роста при цитомегаловирусной инфекции в первом триместре беременности

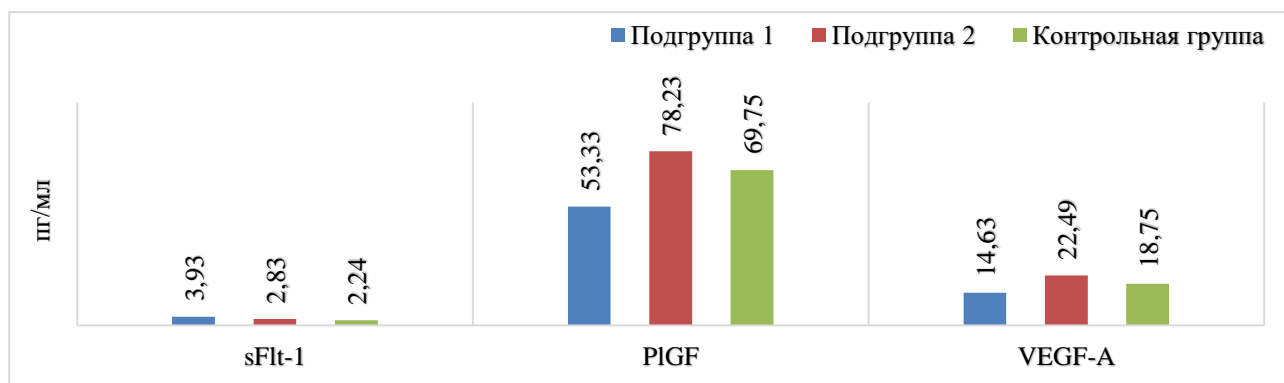
Следующим этапом исследований была оценка содержания про-/антиангиогенных факторов в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона исследуемых групп женщин.

Согласно нашим исследованиям, в подгруппе 1 выявлено повышение в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона показателей антиангиогенного sFlt-1 в 1,75 раза ($p < 0,001$) и в 3,28 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой и в 1,39 раза ($p < 0,001$) и в 2,87 раза ($p < 0,001$) – по сравнению с подгруппой 2 соответственно (рисунок 5). В подгруппе 2 показатели sFlt-1 значимо не изменялись по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$).

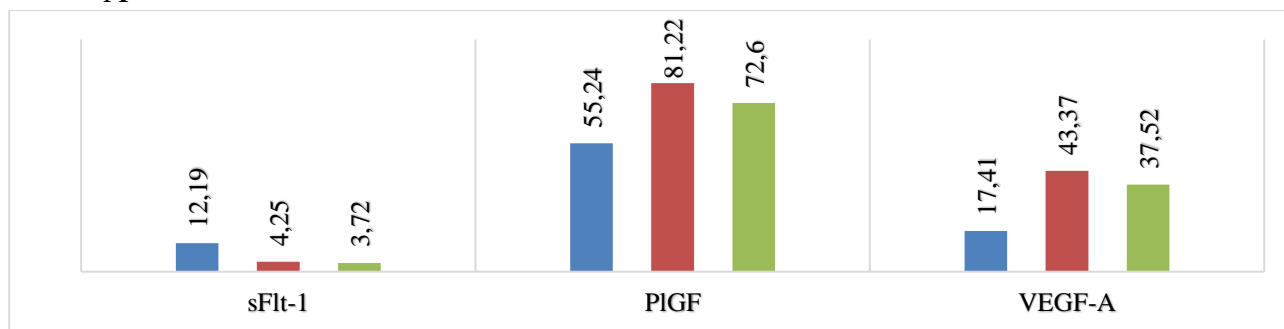
Сравнительный анализ показателей проангиогенного VEGF-A выявил снижение его уровня в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона в подгруппе 1 в 1,28 раза ($p < 0,001$) и в 2,15 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой, в 1,6 раза ($p < 0,001$) и в 2,55 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2 соответственно. В подгруппе 2 показатели VEGF-A повышались в 1,25 раза ($p < 0,001$) и в 1,18 раза ($p < 0,05$) соответственно в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона. Уровень PlGF в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона в подгруппе 1 снижался в 1,31 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой, в 1,47 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2 соответственно. В подгруппе 2 содержание PlGF в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона было выше в 1,12 раза ($p < 0,05$), чем в контрольной группе.

Сравнение системных и локальных показателей про-/антиангиогенных факторов роста в подгруппе 1, выявило, что уровень sFlt-1 и VEGF-A был выше в экстрактах ворсинчатого хориона, чем в сыворотке крови, соответственно в 3,1 раза ($p < 0,001$) и в 1,19 раза ($p < 0,05$), а PlGF – значимо не изменялся ($p > 0,05$). Считаем, что повышение антиангиогенной активности трофобласта в подгруппе 1 могло свидетельствовать о подавляющем влиянии sFlt-1 на инвазию цитотрофобласта. В подгруппе 2 уровень

sFlt-1 и VEGF-A в экстрактах ворсинчатого хориона имел аналогичную направленность изменений – был выше в 1,5 раза ($p<0,001$) и 1,93 раза ($p<0,001$), а PlGF – значимо не изменялся ($p>0,05$). Однако локальный уровень sFlt-1 был выше в подгруппе 1, чем в подгруппе 2, а VEGF-A, наоборот, выше в подгруппе 2, чем в подгруппе 1. Выявленные изменения, по-видимому, носили приспособительный характер, направленный на поддержание механизмов формирования эмбриохориального комплекса. В контрольной группе уровень sFlt-1 и VEGF-A в экстрактах ворсинчатого хориона был выше в 1,66 раза ($p<0,001$) и 2 раза ($p<0,001$), а PlGF – значимо не изменялся ($p>0,05$).



А



Б

Рисунок 5. Количественные показатели про-/антиангиогенных факторов роста в исследуемых группах. А – в сыворотке крови. Б – в экстракте ворсинчатого хориона.

Дальнейший корреляционно-регрессионный анализ, проведенный в основной группе, выявил ассоциации между VEGF-A ($r = 0,82, p < 0,05$), sFlt-1 ($r = -0,60, p < 0,05$), PlGF ($r = 0,76, p < 0,05$) и развитием осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции. Анализ стохастических связей в подгруппе 1 выявил корреляции между системными и локальными показателями VEGF-A ($r = 0,79, p < 0,05$), sFlt-1 ($r = 0,76, p < 0,05$), PlGF ($r = 0,75, p < 0,05$). В подгруппе 2 значения (r) аналогичных корреляций составили 0,81 ($p < 0,05$), 0,72 ($p < 0,05$) и 0,76 ($p < 0,05$).

Дополнительно был проведен анализ взаимосвязи и вклада иммуногормональных показателей в изменение параметров про-/антиангиогенных факторов в подгруппах (рисунок 7 А, Б). В подгруппе 1 выявлена значимая корреляция VEGF-A с TNF- α ($r = -0,82, p < 0,05$) и sTNF-R1 ($r = -0,61, p < 0,05$). Значения стандартизованного коэффициента регрессии (β), отражающего вклад высоких показателей TNF- α и sTNF-R1 в снижение уровня VEGF-A. Для TNF- α β составил -1,052 ($p < 0,05$), для sTNF-R1 – 0,28 ($p < 0,05$). Показатели sFlt-1 были связаны с TNF- α , значения коэффициентов r и β соответственно составили 0,51 ($p < 0,05$). Показатели PlGF также были связаны с TNF-

α , значения коэффициентов r и β соответственно составили $-0,72$ ($p < 0,05$). В подгруппе 2 выявлена значимая корреляция VEGF-A с прогестероном ($r = 0,57$, $p < 0,05$) и эстрадиолом ($r = 0,54$, $p < 0,05$), значения коэффициента β соответственно составили $0,37$ ($p < 0,05$) и $0,28$ ($p < 0,05$). Показатели PIGF были связаны с прогестероном, значения коэффициентов r и β соответственно составили $0,43$ ($p < 0,05$).

Следовательно, обострение ЦМВ инфекции в первом триместре беременности сопряжено с вовлечением провоспалительного фактора TNF- α в нарушение ангиогенной регуляции и формирование эмбриохориального комплекса. Латентная форма инфекции связана с влиянием изменений уровня прогестерона и эстрадиола на маточно-плацентарный ангиогенез.

Оценка инвазивной способности трофобласта при цитомегаловирусной инфекции в первом триместре беременности

Следует отметить, что ангиогенные факторы участвуют в регуляции инвазии цитотрофобласта через активацию различных MMP и связанных с ними сигнальных путей. По нашим данным, в подгруппе 1 в экстрактах ворсинчатого хориона выявлено снижение уровня MMP-9 в 1,72 раза ($p < 0,001$) и в 1,54 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2 соответственно (рисунок 6).

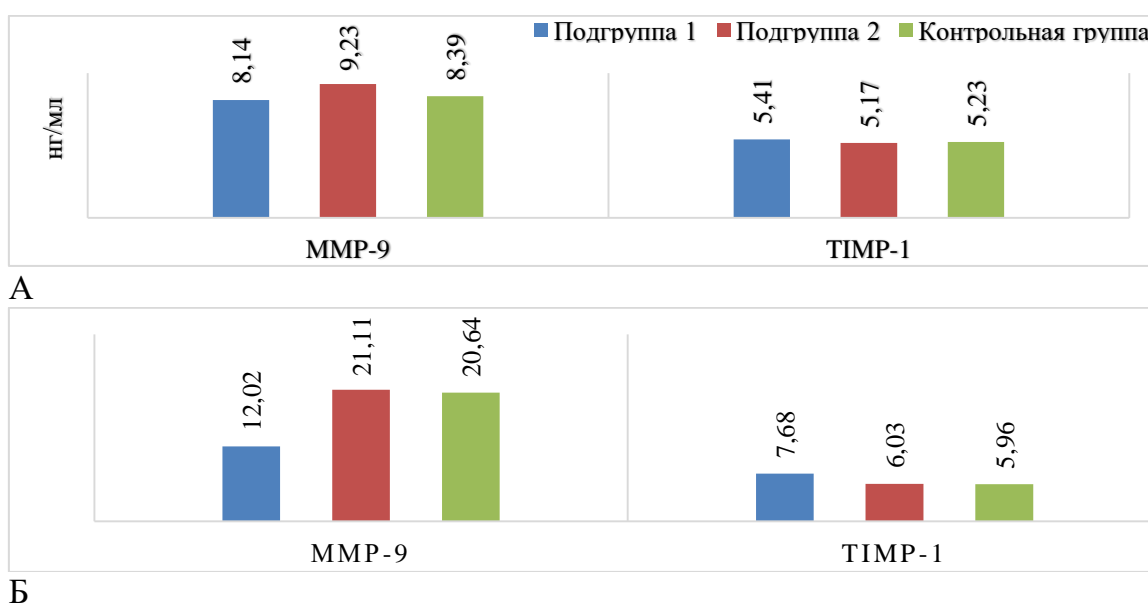


Рисунок 6. Количественные показатели MMP-9 и тканевого ингибитора TIMP-1 в исследуемых группах. А – в сыворотке крови. Б – в экстракте ворсинчатого хориона.

В сыворотке крови значимых различий по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2 выявлено не было ($p > 0,05$). В подгруппе 2 также отсутствовали значимые изменения в содержании энзима в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$). Анализ содержания тканевого ингибитора TIMP-1 в подгруппе 1 выявил повышение показателей в экстрактах ворсинчатого хориона в 1,29 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой и в 1,27 раза ($p < 0,001$) по сравнению с подгруппой 2 соответственно. В сыворотке крови различий по сравнению с контрольной группой и подгруппой 2 выявлено не было ($p > 0,05$). В подгруппе 2 также отсутствовали

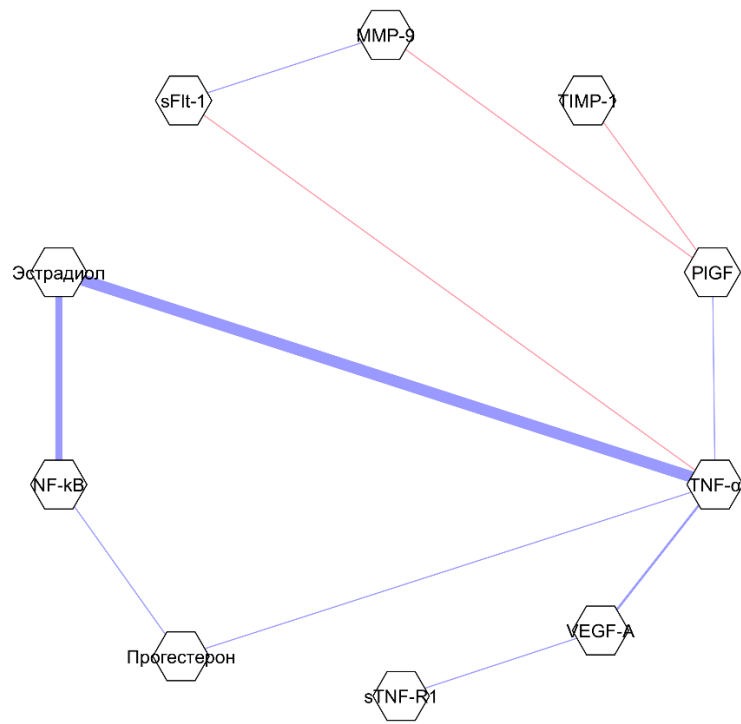
значимые изменения в содержании TIMP-1 в сыворотке крови и в экстрактах ворсинчатого хориона по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$).

Сравнение системных и локальных показателей в подгруппе 1, выявило, что уровень MMP-9 и TIMP-1 был выше в экстрактах ворсинчатого хориона, чем в сыворотке крови, соответственно в 1,48 раза ($p < 0,001$) и в 1,42 раза ($p < 0,001$), что могло указывать на напряженность механизмов регуляции цитотрофобластической инвазии. В подгруппе 2 показатели MMP-9 были в 2 раза ($p < 0,001$) выше в экстрактах ворсинчатого хориона, чем в сыворотке крови, а показатели TIMP-1 не различались между сывороткой крови и экстрактами ворсинчатого хориона ($p > 0,05$). Вероятно, эти изменения носят приспособительный характер, указывающий на возможность сохранения состояния процессов инвазии.

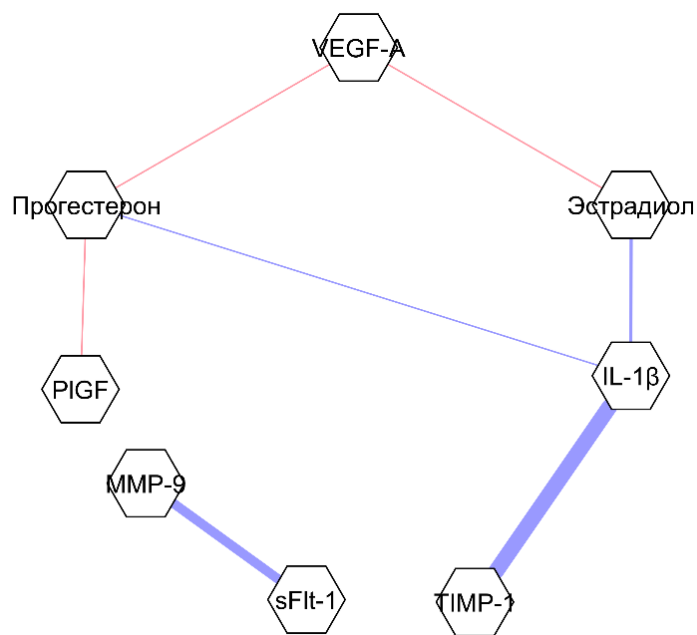
Дальнейший корреляционно-регрессионный анализ, проведенный в основной группе, выявил значимые корреляции MMP-9 ($r = 0,49$, $p < 0,05$), TIMP-1 ($r = -0,73$, $p < 0,05$) и развитием осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции. Анализ стохастических связей в подгруппе 1 выявил корреляции между системными и локальными показателями MMP-9 ($r = 0,80$, $p < 0,05$) и TIMP-1 ($r = 0,52$, $p < 0,05$). В подгруппе 2 значения аналогичных корреляций (r) соответственно составили 0,75 ($p < 0,05$) и 0,83 ($p < 0,05$).

Дополнительно был проведен анализ взаимосвязи и вклада цитокинов, гормонов и факторов роста в изменение параметров, характеризующих процессы цитотрофобластической инвазии в подгруппах (рисунок 7 А, Б). В подгруппе 1 выявлена корреляция MMP-9 с sFlt-1 ($r = -0,82$, $p < 0,05$) и PlGF ($r = 0,81$, $p < 0,05$). Значения стандартизованного коэффициента регрессии, отражающего разнонаправленный вклад про-/антиангиогенных факторов в снижение уровня MMP-9, составили: для sFlt $\beta = -0,34$ ($p < 0,05$), для PlGF $\beta = 0,71$ ($p < 0,05$). Показатели TIMP-1 имели высокую корреляцию с PlGF, значения коэффициентов r и β соответственно составили 0,78 ($p < 0,05$). В подгруппе 2 выявлена значимая корреляция MMP-9 с sFlt-1, значения коэффициентов r и β соответственно составили -0,75 ($p < 0,05$). Показатели TIMP-1 коррелировали с IL-1 β , значения коэффициентов r и β соответственно составили -0,78 ($p < 0,05$).

Таким образом, одновременно с нарушением ангиогенной регуляции при обострении ЦМВ инфекции блокируются механизмы протеолитической деградации внеклеточного маточно-хориального матрикса, что на фоне воспаления приводит к нарушению инвазии цитотрофобласта. При латентном течении заболевания фактором, определяющим состояние процессов инвазии, является оптимальный уровень тирозинкиназной активности.



А



Б

Рисунок 7. Взаимосвязи между исследуемыми показателями в подгруппах: А – обострение ЦМВ инфекции, Б – латентное течение заболевания. Схематическое изображение высокой прямой (с установленным порогом $r > 0,70$) и обратной (с установленным порогом $r < -0,70$), средней прямой (с установленным порогом $r = 0,4-0,69$) и обратной (с установленным порогом $r = (-0,40)-(-0,69)$) корреляции между показателями цитокинов, гормонов, ангиогенных факторов, металлопротеиназ в подгруппе 1. Разная толщина линий отражает силу корреляционной связи. Красным цветом указана прямая корреляционная связь, синим – обратная.

Клинико-морфологические особенности самопроизвольного выкидыша, ассоциированного с цитомегаловирусной инфекцией

Изучая гистологические срезы слизистой матки и ворсинчатого хориона, полученных от женщин с обострением ЦМВ инфекции (подгруппа 1), были выявлены децидуальные сосудистые изменения, характеризующиеся уменьшением количества маточных сосудов, явлениями их склерозирования и гиалиноза, нарушениями инвазии. В децидуальной ткани выявлялись очаги воспаления в виде диффузной инфильтрации лейкоцитами, а также фибриноидные некротические изменения. Не редко участки скопления лейкоцитов вокруг очагов кровоизлияния в слизистой оболочке сочетались с клиническими и ультразвуковыми признаками угрозы самопроизвольного выкидыша. В подгруппе женщин с обострением ЦМВ инфекции кровянистые выделения из половых путей были отмечены у всех женщин, в подгруппе женщин с латентным течением заболевания (подгруппа 2) – у 11,83%. Ретрохориальная гематома по данным ультразвукового исследования была выявлена у 42,1% женщин в подгруппе с обострением ЦМВ инфекции и у 5,38% в подгруппе с латентным течением заболевания. Риск развития ретрохориальной гематомы в подгруппе женщин с обострением ЦМВ инфекции был в 2,36 раза выше ($p < 0,001$), чем в подгруппе женщин с латентным течением заболевания.

Таблица 1 – Клинические и ультразвуковые признаки угрожающего самопроизвольного выкидыша

Характеристики	Подгруппа 1		Подгруппа 2		χ^2	<i>p</i>
	57		93			
Размер выборки	Абс	%	Абс	%		
Кровянистые выделения из половых путей	57	100	11	11,83	153,59	$p < 0,001$
Ретрохориальная гематома	24	42,1	5	5,38	36,04	

Примечание: *p* – значимость различий при сравнении подгрупп 1 и 2.

Дальнейшие исследования показали, что ворсинчатый хорион в подгруппе 1 был представлен преимущественно ворсинами эмбрионального типа без признаков дифференцировки мезенхимальных клеток в эндотелиоциты. Встречались аваскулярные некротизированные ворсины, окруженные фибриноидом. В гиповаскулярных ворсинах определялись признаки апоптоза эндотелиальных клеток и фибробластов. Капилляры в таких ворсинах были вытянуты и сдавлены из-за отека. Не редко выявлялся тромбоз сосудов. Покровный эпителий ворсин был местами гипоплазирован, встречались участки с утолщениями и хаотично расположенными деформированными, а также апоптотическими ядрами, что могло указывать на эндокринную недостаточность трофобласта. Участки цитотрофобластической инвазии часто обнаруживались в поверхностных отделах функционального слоя эндометрия.

Для определения особенностей цитотрофобластической инвазии и идентификации клеток цитотрофобласта нами была использована

иммуногистохимическая реакция на цитокератин 8. На препаратах выявлялись отдельные группы клеток цитотрофобласта, экспрессирующих цитокератин 8. При этом реакция на цитокератин 8 была снижена. Также выявлялось снижение числа многоядерных гигантских клеток, что указывало на нарушение гравидарной трансформации эндометрия. В дистальных участках якорных ворсин определялись участки снижения экспрессии цитокератина 8 в первой, и отсутствием во второй и в третьей зонах инвазивной дистанции, что могло указывать на угасание пролиферативной активности и миграционной способности цитотрофобласта. Большинство эмбриональных ворсин также не имело реакции на цитокератин 8 или реакция была значительно снижена.

Можно заключить, что дифференциальными критериями самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции, являются признаки воспаления (инфильтрация, отек, фибриноидный некроз) и нарушения инвазивной и миграционной способности цитотрофобласта (снижение экспрессии цитокератина 8).

Прогностическая модель и факторы риска самопроизвольного выкидыша при обострении цитомегаловирусной инфекции

Поиск предикторов и оценка развития самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции проводилось с использованием многофакторных анализов: дискриминантного и ROC (Receiver operating characteristic). Для построения канонической дискриминантной функции был использован пошаговый анализ, включающий поиск наиболее значимых параметров оценки функционального состояния эмбриохориального комплекса (цитокины, ядерный фактор транскрипции, гормоны, факторы роста, растворимые формы рецепторов, металлопротеиназа и тканевой ингибитор) в дискриминантное уравнение, которое с высокой вероятностью описывало патогенетически значимые различия в механизмах регуляции, лежащих в основе нарушений процессов цитотрофобластической инвазии. Данный метод позволяет учитывать вариабельность используемых количественных переменных, взятых со своими коэффициентами, во влиянии используемых признаков в правильность прогноза по развитию самопроизвольного выкидыша.

Для каждой отдельно взятой женщины в подгруппе 1 и 2 была определена каноническая функция. Многофакторные средние значения распределения используемых в дискриминантном анализе параметров соответствовали модулю центроида, что позволило отнести женщин в соответствующую группу риска по развитию самопроизвольного выкидыша.

При выполнении пошагового дискриминантного анализа были отобраны три параметра, максимально характеризующие возможные дискриминации совокупностей между подгруппами 1 и 2. Такими переменными выступили провоспалительные факторы TNF- α и NF- κ B, а также растворимый рецептор *fms*-подобной тирозинкиназы sFlt-1 ($p < 0,001$ соответственно). Искомые переменные имели высокие дискриминантные свойства в анализируемых подгруппах, что подтверждалось минимальным значением лямбды (λ)-Уилкса, которое в пошаговых расчетах не превышало 0,003 при дискриминантной функции (F) (328,998) = 936,553 ($p < 0,001$).

Классификационная способность дискриминантных совокупностей модели, включающей прогностические предикторы развития угрозы прерывания беременности в подгруппах, составила 100%.

Ниже представлена искомая дискриминантная (каноническая) функция, построенная согласно вычисленным коэффициентам:

$$F = -35,948 + 0,561 \times \text{TNF-}\alpha - 0,709 \times \text{NF-kB} - 0,318 \times \text{sFlt-1},$$

где -35,948 – константа.

Дальнейший анализ показал, что переменная TNF- α вносит наибольший вклад в дискриминацию совокупностей канонической функции, о чем свидетельствует значение стандартизованного коэффициента β равное 1,496. Для переменных NF-kB и sFlt-1 значения β были меньшими и соответственно составили -0,901 и -0,237.

Дальнейшие математические расчеты, выполненные с помощью ROC-анализа, подтвердили возможность использования переменных TNF- α , NF-kB и sFlt-1 в качестве прогностических предикторов самопроизвольного выкидыша в подгруппах 1 и 2.

Максимальная площадь под кривой (AUC) для TNF- α составила 0,850, NF-kB – 0,852 и sFlt-1 – 0,794, что свидетельствовало о высоком качестве модели.

Для TNF- α порог отсечения составил 107,05 пг/мл (чувствительность – 74,2%, специфичность – 99%, J – 0,73), для NF-kB – 11,45 пг/мл (чувствительность – 74,2%, специфичность – 99%, J – 0,73) и sFlt-1 – 3,34 пг/мл (чувствительность – 75,3%, специфичность – 74%, J – 0,49).

Выявлена умеренная связь угрозы выкидыша с показателями в крови равными и превышающими пороговые значения для TNF- α , NF-kB и sFlt-1 ($\chi^2 = 51,45, p < 0,001$).

В результате проведенного исследования продемонстрирована возможность использования определения TNF- α , NF-kB и sFlt-1 в периферической крови в комплексном диагностическом мониторинге беременных с обострением ЦМВ инфекции для выделения групп риска по развитию угрозы самопроизвольного выкидыша.

Дополнительно была проведена оценка рисков исходов беременности у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности относительно женщин контрольной группы (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели риска осложненного течения беременности у женщин с обострением ЦМВ инфекции

Осложнения беременности	ОР	ДИ 95% (нижняя граница)	ДИ 95% (верхняя граница)
Угрожающий выкидыш	3,02	1,09	8,4
Самопроизвольный выкидыш	4,52	1,07	19,18
Неспецифический вагинит	1,51	0,14	16,10
Рвота беременных	1,01	0,24	4,26
Анемия беременных	8,3	1,14	61,8

Выявлено, что обострение ЦМВ инфекции в 3,02 раза увеличивает риск угрожающего выкидыша ($p < 0,05$) и в 4,52 раза развития самопроизвольного выкидыша ($p < 0,05$). Неспецифический вагинит и рвота беременных не были значимыми факторами риска в исходах беременности у женщин с обострением ЦМВ инфекции ($p > 0,05$), в то время как анемия была отягощающим фактором в исходах беременности ($p < 0,05$). Риск анемии был в 8,3 раза выше, чем в контрольной группе. С учетом того, что в подгруппе с обострением ЦМВ инфекции у 18,8% женщин с угрожающим выкидышем и у 58,3% женщин с самопроизвольным выкидышем была диагностирована анемия, были рассчитаны риски исходов беременности. Анемия у

женщин с обострением ЦМВ инфекции не увеличивала риск угрожающего выкидыша ($p > 0,05$), но при этом вероятность развития самопроизвольного выкидыша была выше в 6,56 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, обострение ЦМВ инфекции в первом триместре беременности увеличивает риск угрожающего и самопроизвольного выкидыша. Анемия у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности является фактором, способствующим развитию самопроизвольного выкидыша.

На основании полученных результатов разработана концептуальная схема механизмов развития самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции (рисунок 8).

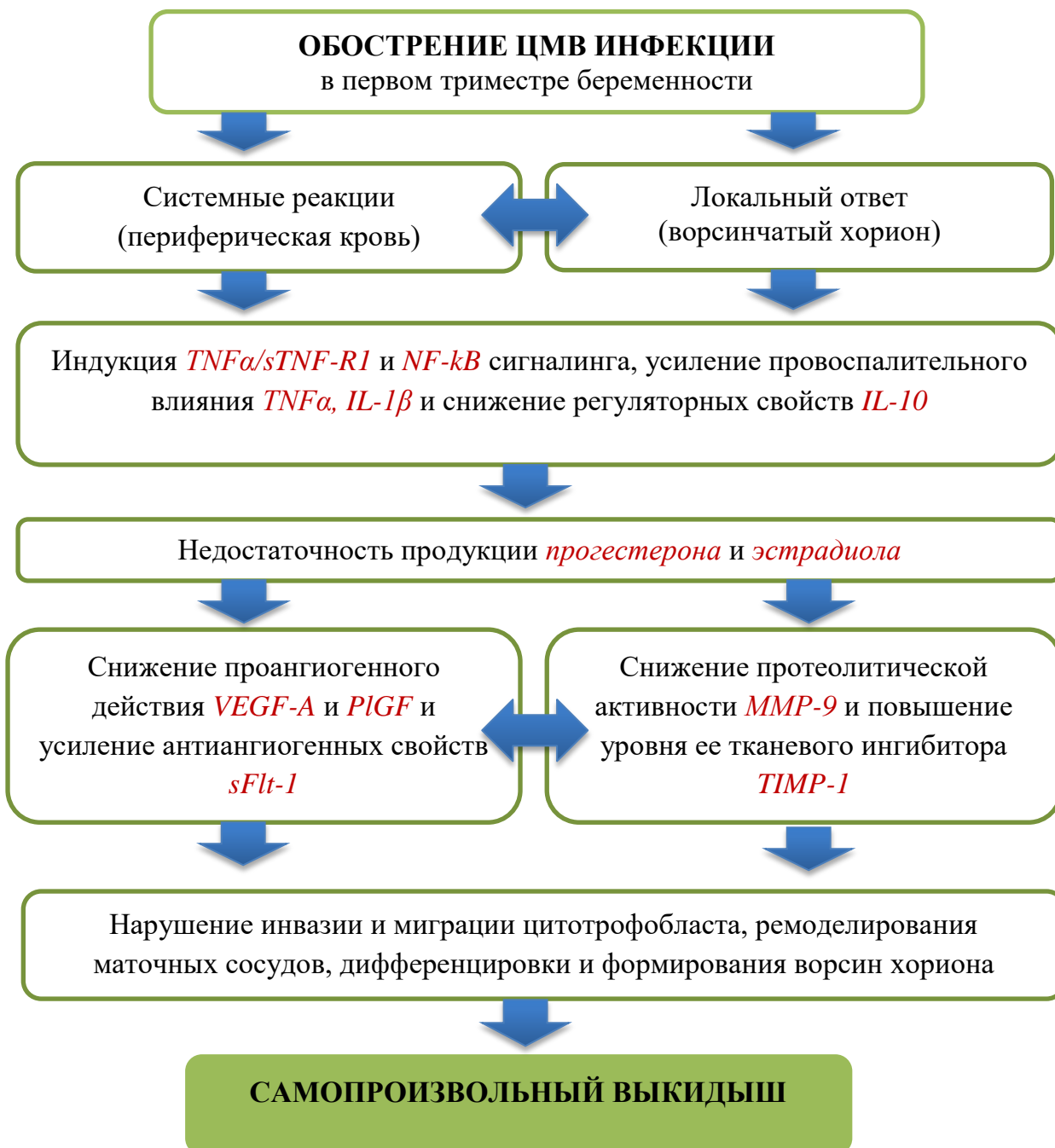


Рисунок 8. Концептуальная схема механизмов развития самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции в первом триместре беременности.

ВЫВОДЫ

1. Обострение ЦМВ инфекции в первом триместре беременности характеризуется одновременным повышением уровня в периферической крови и в ворсинчатом хорионе цитокинов провоспалительного профиля TNF- α и IL-1 β и снижением содержания противовоспалительного IL-10. Формируемый дисбаланс в системе цитокинов в ворсинчатом хорионе приводит к повышению уровня растворимого рецептора sTNF-R1 и ядерного транскрипционного фактора NF- κ B, что изменяет провоспалительный сигналинг и приводит к развитию локального воспалительного ответа. Латентное течение инфекции связано с меньшим по выраженности повышением уровня TNF- α и IL-1 β и снижением содержания IL-10. Выявлен значимый вклад высокого уровня TNF- α и низкого IL-10 в развитие осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции.

2. Обострение ЦМВ инфекции в первом триместре беременности приводит к развитию эмбриохориальной недостаточности, характеризующейся снижением уровня в периферической крови и в ворсинчатом хорионе прогестерона и эстрадиола, в отличие от латентного течения заболевания, при котором снижается содержание прогестерона. Выявлен значимый вклад изменчивости показателей эстрадиола в развитие осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции.

3. При обострении ЦМВ инфекции в первом триместре беременности выявлено нарушение ангиогенной регуляции эмбриохориального комплекса, что проявляется в одновременном повышении уровня в периферической крови и в ворсинчатом хорионе антиангиогенного фактора sFlt-1 и снижении содержания проангиогенных VEGF-A и PlGF. Латентное течение заболевания характеризуется повышением уровня в периферической крови и в ворсинчатом хорионе VEGF-A и PlGF при отсутствии изменений в содержании sFlt-1. Выявлена ассоциация изменчивости показателей VEGF-A, PlGF и sFlt-1 с развитием осложнений первого триместра беременности при обострении ЦМВ инфекции.

4. При обострении ЦМВ инфекции в первом триместре беременности нарушаются механизмы протеолитической деградации внеклеточного маточно-хориального матрикса и инвазии цитотрофобласта, что проявляется в снижении уровня MMP-9 и повышении содержания тканевого ингибитора TIMP-1. При латентном течении заболевания факторами состоятельности инвазивных процессов можно считать компенсаторное повышение уровня MMP-9 при отсутствии изменений содержания TIMP-1 в ворсинчатом хорионе.

5. Морфологическими критериями самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции являются признаки локального воспаления маточно-хориального комплекса (инфильтрация, отек, фибриноидный некроз), нарушение инвазии и миграции цитотрофобласта (снижение экспрессии цитокератина 8), ремоделирования маточных сосудов, дифференцировки и формирования ворсин.

6. У женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности в 3,02 раза увеличивается риск угрожающего и в 4,52 раза самопроизвольного выкидыша. Развитие анемии у женщин с обострением ЦМВ инфекции в первом триместре беременности увеличивает в 6,56 раза риск самопроизвольного выкидыша.

7. В ходе выполнения дискриминантного и ROC анализов продемонстрирована возможность использования пороговых значений прогностических маркеров TNF- α , NF- κ B и sFlt-1 в комплексном диагностическом мониторинге беременных для

выделения групп риска по развитию самопроизвольного выкидыша при обострении ЦМВ инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Прогностическая модель самопроизвольного выкидыша, с включением наиболее значимых показателей TNF- α , NF- κ B и sFlt-1, может быть использована в практическом здравоохранении с целью прогнозирования неблагоприятных исходов беременности.

Беременным женщинам в первом триместре рекомендовано обследование на ЦМВ инфекцию с целью выделения групп высокого риска самопроизвольного выкидыша.

Могут быть рекомендованы для внедрения в профильные медицинские учреждения способы прогнозирования угрозы прерывания беременности (патент РФ №2751965), способ прогнозирования угрозы выкидыша при реактивации латентной цитомегаловирусной инфекции путем определения в сыворотке крови эстрадиола и рецептора эстрогена альфа (патент РФ №2762485) и оценки нарушения инвазии трофобласта при ЦМВ инфекции (патент РФ №2782111).

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в системе Web of Science и Scopus

1. Prikhodko N.G. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 is a potential marker of inflammation in the trophoblast associated with cytomegalovirus infection / I.A. Andrievskaya, I.V. Dovzhikova, N.A. Ishutina, I.N. Gorikov, N.N. Dorofienko, K.K. Petrova, N.G. Prikhodko // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2019. – Vol. 199. – A6173.
2. Приходько Н.Г. Новый подход к оценке репродуктивных потерь первого триместра беременности / Н.А. Ишутина, И.А. Андриевская, Н.Г. Приходько // Acta biomedical scientifica. – 2021. – Т 6, № 3. – С. 43-52.
3. Приходько Н.Г. Особенности вазоактивной регуляции в ворсинчатом хорионе у женщин с самопроизвольным абортom и активной цитомегаловирусной инфекцией / И.А. Андриевская, Н.А. Ишутина, И.В. Довжикова, Н.Г. Приходько, О.Л. Кутепова // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т.21, №2. – С. 6-12.
4. Prikhodko N.G. Estrogen deficiency and its manifestations in pregnant women with exacerbation of chronic simple bronchitis of cytomegalovirus etiology / I.N. Gorikov, I.A. Andrievskaya, N.A. Ishutina, I.V. Dovzhikova, K.K. Petrova, N.G. Prikhodko, V.I. Pavlenko, V P. Kolosov // European Respiratory Journal. – 2021. – Vol.58. – PA1891.
5. Prikhodko N.G. Proinflammatory cytokines in the blood of pregnant women with different courses of chronic simple bronchitis of cytomegalovirus etiology / I.N. Gorikov, I.A. Andrievskaya, N.A. Ishutina, I.V. Dovzhikova, N.N. Dorofienko, N.G. Prikhodko, V.I. Pavlenko // European Respiratory Journal. – 2021. – Vol. 58. – PA1892.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Приходько Н.Г. Плацентарный фактор роста как маркер угрозы ранних самопроизвольных выкидышей при цитомегаловирусной инфекции / И.А. Андриевская, М.Т. Луценко, К.К. Петрова, Е.Ю. Кочегарова, Н.Г. Приходько // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 64. – С. 55-59.

2. Приходько, Н. Г. Роль факторов роста в инвазии трофобласта и их ассоциация с патологическим течением беременности / Н. Г. Приходько // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2019. – № 74. – С. 111-118.

3. Приходько Н.Г. Показатели сосудисто-эндотелиального фактора роста и докозагексаеновой кислоты у беременных женщин с угрожающим течением беременности ранних сроков, ассоциированным с цитомегаловирусной инфекцией / Н.А. Ишутина, И.А. Андриевская, Н.Г. Приходько // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2020. – Вып. 78. – С. 116-121.

Монография

1. Приходько Н.Г. Гормональный обмен в плаценте при цитомегаловирусной инфекции / И.В. Довжикова, И.А. Андриевская, Н.А. Ишутина, И.Н. Гориков, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько. – Благовещенск. – 2020. – 176 с. – ISBN 978-5-905864-22-3

Публикации в иных журналах

1. Приходько Н.Г. Способ прогнозирования невынашивания беременности ранних сроков при цитомегаловирусной инфекции / И.А. Андриевская, И.В. Довжикова, Т.А. Баталова, Н.Р. Григорьев, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько // Материалы XII международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2018) / под общ. ред. В.П.Колосова. – Благовещенск: ДНЦ ФПД, 2018. – С. 144-148.

2. Приходько Н.Г. Молекулярные маркеры воспаления и инвазивной активности трофобласта при цитомегаловирусной инфекции / И.А. Андриевская, И.В. Довжикова, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько / Материалы VIII Съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока (под общ. ред. академика РАН В.П. Колосова). – Благовещенск, 2019. – С.198.

3. Приходько Н.Г. Способ оценки нарушения имплантации эмбриона при беременности, осложненной цитомегаловирусной инфекцией путем определения циклооксигеназы-2 в гомогенате ворсинчатого хориона / И.А. Андриевская, Н.А. Ишутина, И.В. Довжикова, Н.Г. Приходько // Материалы XIV международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2020) / под общ. ред. В.П. Колосова. – Благовещенск: ДНЦ ФПД. – 2020. – С. 88-90.

4. Приходько Н.Г. Способ прогнозирования угрозы прерывания беременности ранних сроков при обострении цитомегаловирусной инфекции / Н.А. Ишутина, И.А. Андриевская, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько // Материалы XV международной научной конференции «Системный анализ в медицине» (САМ 2021) / под общ. ред. В.П. Колосова. Благовещенск: ДНЦ ФПД. – 2021. – С. 117-121.

Патенты на изобретения Российской Федерации

1. Пат. № 2751965 Рос. Федерация. Способ прогнозирования угрозы прерывания беременности ранних сроков при обострении цитомегаловирусной инфекции путем определения в сыворотке крови плацентарного фактора роста и арахидоновой кислоты / И.А. Андриевская, Н.А. Ишутина, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько.; опубл. 21.07.2021.

2. Пат. № 2762485 Рос. Федерация. Способ прогнозирования угрозы выкидыша при реактивации латентной цитомегаловирусной инфекции путем определения в сыворотке крови эстрадиола и рецептора эстрогена альфа / Андриевская И.А., Ишутина Н.А., Довжикова И.В., Петрова К.К., Приходько Н.Г.; опубл. 21.12.2021.

3. Пат. №2782111 Рос. Федерация. Способ оценки нарушения инвазии трофобласта путем исследования матриксной металлопротеиназы-9 в ворсинчатом

хорионе при цитомегаловирусной инфекции / Андриевская И.А, Ишутина Н.А., Довжикова И.В., Дорофиенко Н.Н., Приходько Н.Г.; опубли. 21.10.2022.

Методическое пособие

1. Приходько Н.Г. Метод прогнозирования угрозы выкидыша в первом триместре беременности при герпес-вирусной и/или цитомегаловирусной инфекции / И.А. Андриевская, И.В. Жуковец, Н.А. Ишутина, И.В. Довжикова, И.Н. Гориков, К.К. Петрова, Н.Г. Приходько. Благовещенск: ФГБНУ «ДНЦ ФПД», 2020. 12 с. Утверждено Министерством здравоохранения Амурской области 25.12.2020 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВПГ – вирус простого герпеса

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦМВ – цитомегаловирус

sFlt-1 – растворимая fms-подобная тирозинкиназа

IL – интерлейкин

MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9

NF- κ B – ядерный транскрипционный фактор каппа В

PlGF – плацентарный фактор роста

TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназы-1

TNF- α – фактор некроза опухолей альфа

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста