

РОЛЬ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ МАНИФЕСТАЦИИ ГЕСТАЦИОННОЙ ЭНДОТЕЛИОПАТИИ

КОНЬКОВ Д.Г.

г. Винница

Наиболее важным показателем перинатального здоровья является уровень и структура перинатальной смертности, которая в то же время характеризует качество оказания акушерской и неонатальной помощи. При этом важность анализа перинатальных потерь состоит в том, что факторы, вызывающие фатальный исход у плода, в том числе дефекты медицинской помощи, в конечном виде отражают негативные моменты, которые затем манифестируют у выживших новорождённых. О снижении качества родовспоможения свидетельствует рост перинатальной патологии, прежде всего перинатальных потерь и смертности доношенных детей. При этом речь идет преимущественно о предотвратимых потерях плода и новорождённого, т.е. потерях, возникновение которых можно было предупредить. Большую роль в решении этой проблемы играет разработка системы рациональной профилактики акушерских осложнений на этапе доклинической манифестации патологии и последующего мониторинга [4].

Действенный путь снижения частоты перинатальных потерь – доклиническая диагностика обуславливающей перинатальной патологии. Для ранней диагностики данной патологии необходимо установить основные звенья патогенеза, что позволяет разрабатывать методы, определяющие этиологический агент или маркеры начальных стадий патогенеза [1,2].

Гестационная эндотелиопатия (ГЭ) - возникшее, во время беременности, нарушение вазодилатирующих, ангиопротективных, антипролиферативных функций эндотелия. Вследствие чего происходят: дискоординация тонуса сосудов, активация пролиферативных процессов сосудистой стенки, изменения структуры и числа эндотелиоцитов, приобретение внутренней поверхности сосудистой стенки адгезивных свойств с последующей трансмиграцией лейкоцитов в периваскулярную ткань [6]. Лейкоцитарно-эндотелиальная адгезия определяется как взаимодействие молекул клеточной адгезии (МКА) и их лигандов на клетках эндотелия [7]. К молекулам, которые опосредуют лейкоцитарно-эндотелиальную адгезию, относятся: молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1), экспрессируется в сосудистом эпителии при ряде воспалительных процессов и является одним из средств мобилизации лейкоцитов из крови в периваскулярную ткань; тромбоцитарно-эндотелиальная молекула адгезии (PECAM-1). Исследования *in vitro* показали, что экспрессия этих молекул на поверхности эндотелиальных клеток жестко регулируется, и эта регуляция может иметь решающую роль в патогенезе ГЭ обусловленной миграцией лейкоцитов и дисрегуляцией тромбоцитов [5]. Повышение сывороточных уровней этих молекул может указывать на прогрессирующую дисфункцию эндотелия. Любопытно, что некоторые исследования показали, что уровни МКА, были увеличены в сыворотке крови беременных женщин с преэклампсией (ПЭ) – клинически-манифестированной формы ГЭ [6]. Таким образом, аномальные уровни МКА могут рассматриваться как возможные маркеры ПЭ (9). Тем не менее, согласно результатам Lyall et al., Chaiworapongsa T. et al., [2001, 2003] сообщается, что сывороточные уровни VCAM-1 и PECAM-1 существенно не отличались между физиологической беременностью и ПЭ. В настоящем исследовании мы сравнивали уровни растворимых форм VCAM-1 (sVCAM-1, CD106) и PECAM-1 (sPECAM-1, CD31) в сыворотке крови у женщин с физиологической беременностью, при доклинически-манифестированной гестационной эндотелиопатии и преэклампсии.

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленной задачей в исследование были включены 86 беременных женщин. I подгруппу составили беременные с ГЭ без клинически манифестированной акушерской патологии (преэклампсии), (n=34). В II подгруппу были включены пациентки с ПЭ средней степени тяжести (n=32). В III подгруппе находились женщины с физиологическим течением беременности (n=20), без ГЭ. Контрольную группу (IV подгруппа) состояла из 16 здоровых небеременных женщин. Исследование проводилось на клинической базе кафедры

акушерства и гинекологии №1 Винницкого национального медицинского университета в 2012-2013 гг.

Исследование соответствовало принципам, изложенным в Хельсинской декларации (1989), Сеул (2008). Женщины, которые были задействованы в исследовании, давали письменное согласие на участие.

Беременные с хронической артериальной гипертензией, сахарным диабетом, заболеваниями почек и аутоиммунными нарушениями не были включены в исследование. ПЭ определялась как артериальная гипертензия (систолическое АД ≥ 140 мм.рт.ст. и диастолическое АД ≥ 90 мм.рт.ст., после 20 недели гестации) и протеинурия (≥ 300 мг за 24 часа) в соответствии с клиническим протоколом МОЗ Украины [3].

Диагностика гестационной эндотелиопатии. В качестве маркеров ГЭ использовали – определение микроальбуминурии (МАУ) и измерение эндотелийзависимой вазодилатации сосудов (ЭЗВД). МАУ определяли с помощью диагностических тестовых полосок «МикроальбуФан». ГЭ диагностировалась по результату отношения альбумина к креатинину $3,4$ мг/ммоль [1]. ЭЗВД определялась с помощью ультразвукового аппарата фирмы Toshiba Xario XG и линейного датчика 12 МГц (определяли в продольном срезе плечевую и заднюю большеберцовую артерии). Диаметр артерий измеряли исходно и после пятиминутной окклюзии. Рассчитывали процент прироста указанных показателей после окклюзии. Дилатация артерий менее 10 % от исходного диаметра расценивали, как патологическую реакцию, подтверждающую наличие ГЭ [2].

Образцы сыворотки и анализы растворимых молекул адгезии. Образцы периферической венозной крови собирали в стерильные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Медикаментозные препараты не принимались этими пациентами в течение 24 часов до забора крови. Образцы крови, собранной в ЭДТА хранились при температуре 4. Образцы центрифугировали на 800 оборотах в течение 15 минут и сохраняли супернатант в соответствии с инструкциями производителя. Сывороточные уровни sVCAM-1, sPECAM-1 были измерены иммуноферментным методом с использованием набора «BIOMEDICA» (Германия). Иммуноферментный анализ выполнялся на полосочном иммуноферментном анализаторе «Humareader single» (Германия) при длине волны 450 нм и дифференциальным фильтром 630 нм. Расчеты проводились на основе данных полученных измерением калибровочных растворов, согласно построенной калибровочной кривой.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью пакета компьютерных программ Statistica for Windows 6,0. Для оценки различий показателей в группах применялся U-критерий Манна-Уитни. Значение $p < 0,05$ было принято как статистически значимое.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализируя клинические характеристики исследуемой группы обращает на себя внимание отсутствие различий в возрасте беременных. Средний возраст обследуемых составлял $25,6 \pm 2,4$ года с индивидуальными колебаниями от 20 до 31 года и тромбоцитов между тремя группами. Срок гестационного возраста обследуемых женщин составлял от 24 до 31 недели существенно не отличался в подгруппах физиологической беременности, беременности с ГЭ и ПЭ. Как и ожидалось, показатели артериального давления были значительно выше в группе преэклампсии, чем при нормальной беременности. Сывороточные концентрации растворимых МКА, показаны в таблице 1. Уровень sVCAM-1 была достоверно выше у беременных с ПЭ ($2230,3 \pm 375,1$ нг/мл), при ГЭ отмечалась подобная тенденция к повышению sVCAM-1 ($1108,1 \pm 217,6$ нг/мл) по сравнению с нормальной беременностью ($874,0 \pm 73,7$ нг/мл), в тоже время концентрация данной МКА у здоровых небеременных женщин составляла $690,7 \pm 66,7$ нг/мл (таб.1).

Сывороточные уровни sPECAM-1 имели сходные статистические отличия между преэклампсией ($63,8 \pm 6,4$ нг/мл) и нормальной беременностью ($93,3 \pm 4,9$ нг/мл), однако снижение концентрации данной МКА в группе беременных с ГЭ ($78,6 \pm 4,9$ нг/мл) было статистически достоверно по сравнению с нормальной беременностью (таб. 1).

Концентрація sVCAM-1 і sPECAM-1 в сыворотке крови у вагітних на фоні гестаційної ендотеліопатії, n=102 (M±m)

№	Клінічні підгрупи	sVCAM-1, нг/мл	sPECAM-1, нг/мл
1	Здорові вагітні жінки (n=16)	690,7±66,7	84,1±4,6
2	Здорові вагітні жінки (n=20)	874,0±73,7	91,6±5,3
3	Вагітні з ГЕ без клінічної маніфестації (n=34)	1108,1±217,6	78,6±4,9*
4	Вагітні з преєклампсією (n=32)	2230,3±375,1*	63,8±6,4*

Примечание: * - различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по отношению к вагітним жінкам з фізіологічним теченням вагітності.

Молекули клітинної адгезії грають важливу роль взаємодії між лейкоцитами і ендотелієм і діляться на три групи в залежності від їх структури: селектини, інтегрини і члени суперсемеїства генів іммуноглобуліна. VCAM-1 молекули клітинної адгезії із суперсемеїства іммуноглобулінів [7]. VCAM-1 функціонує як трансмембранний рецептор на ендотелії. Збільшення концентрації VCAM-1, можливо, відображає збільшення експресії цієї молекули на поверхні ендотеліальних клітин. Експресія VCAM-1 в клітках регулюється за рахунок багаточисельних впливів мікросередовища, таких як зміни концентрації про- і протизапальних цитокінів. VCAM-1 має важливе значення для міграції лейкоцитів в ділянку запалення, оскільки він опосередковує адгезію лімфоцитів, моноцитів і еозинофілів на ендотелій. Наші результати показали, що рівні sVCAM-1 були значно збільшені при ПЕ і ГЕ порівняно з нормальною вагітністю. Lyall et al. [1998] вперше показала, що sVCAM-1 підвищується в сыворотке крови у пацієнтів з преєклампсією. Krauss et al. [2008] також свідчить про підвищений рівень VCAM-1 в плазмі вагітних жінок, у яких внаслідок розвилася преєклампсія, за 3-15 тижнів раніше до появи клінічних симптомів. По результатам досліджень N. Anim Nyame et al. [2003], Shin-Young Kim et al. [2004], Mehdi Farzadnia et al. [2009] концентрація sVCAM-1 значно зростає у вагітних з важкою преєклампсією навіть порівняно з преєклампсією середньої ступеня тяжкості. В відмінність від цих звітів, Haller et al. [2002] повідомляє, що VCAM-1 не збільшується в сыворотке крови пацієнтів з преєклампсією. Ми розглядаємо зростання концентрації sVCAM-1 при ГЕ як доказ ендотеліальної клітинної активації/дисфункції, що може бути корисним для стратифікації ризику маніфестації преєклампсії при прогнозуванні вираженості її тяжкості [6, 7].

В останні 10 років величезний прогрес був досягнутий у розумінні біології PECAM-1 [9]. В частині, доведено, що дана МКА залучена в широкий спектр запальних реакцій, включаючи ангиогенез, репаративні властивості ендотелію, проникність судин, регулювання міграції лейкоцитів більшості підтипів між ендотеліоцитами, експресію тромбоцитів. PECAM-1 є ефективною сигнальною молекулою механочувствителі ендотеліального клітинного відповіді на зміну кровонаповнення судин (напруження сдвига) і фактором інгібування цитотоксических реакцій. Невдавні дослідження підтверджують участь PECAM-1 в запальних процесах і взаємодії лейкоцитів з ендотеліальними клітками. Процес міграції лейкоцитів в ділянку запалення може бути розділений на 3 стадії, одна з яких - проникнення лейкоцитів через міжклітинні переходи ендотеліальних кліток судин здійснюється під впливом PECAM-1. Значительний прогрес, був також досягнутий, у розумінні потенціальної ролі PECAM-1 в патогенезі акушерської патології. Zeisler H. Et al. [2003] показав, що підвищення сывороточної концентрації PECAM-1 асоційоване з розвитком важкої ПЕ. Krauss T. Et al. [1998] також вказує на достовірне збільшення PECAM-1 при гестаційній гіпертензії. Однак, по результатам досліджень останніх років, O. I. Stepanova et al. [2010] і C. Catarino et al. [2012], при ПЕ діагностується зниження концентрації sPECAM-1 як в материнській, так і в крові плода [8]. Непосередню причину подібної динаміки sPECAM-1 Fiona Lyall et al. [2000, 2001] зв'язують з неадекватною інвазією

трофобласта и нарушением ремоделирования спиральных артерий, уменьшением маточно-плацентарной перфузии, что приводит к увеличению материнской и перинатальной смертности. Похожие нарушения в спиральных артериях были зарегистрированы Khong T. Y. Et al. [1987, 1995] у женщин с плацентарной дисфункцией и спонтанных абортах при отсутствии ПЭ. Несмотря на важность проблемы полноценной инвазии трофобласта и сосудистого ремоделирования, эти процессы еще не до конца понятны. Однако считается, что они включают в себя изменения экспрессии МКА. Наши результаты позволяют предположить, что динамические изменения МКА (sVCAM-1 и sPECAM-1) могут быть специфичны для ранней доклинической диагностики перинатальной патологии и служить независимым маркером адекватности гемодинамического обеспечения беременности.

Выводы

1. Результаты нашего исследования позволяют рекомендовать использование МКА (sVCAM-1 и sPECAM-1) в клинических условиях для диагностики неманифестированной перинатальной патологии обусловленной гестационной эндотелиопатией.
2. Повышение, в сыворотке крови, концентрации sVCAM-1 выше $874,0 \pm 73,7$ нг/мл при одновременном снижении sPECAM-1 до $78,6 \pm 4,9$ нг/мл, при отсутствии клинической симптоматики у беременных женщин, помогает выявлять ранние нарушения функции эндотелия.
3. Используемые в исследовании sVCAM-1 и sPECAM-1 могут быть полезны для предикции тяжести преэклампсии.

ЛІТЕРАТУРА

1. Деклараційний патент на корисну модель № 71862 Україна, МПК G01N 33/48. / Спосіб доклінічної діагностики гестаційної ендотеліопатії / В.М.Запорожан, С.Р.Галич, Д.Г. Коньков. № U 201201377; Заявл. 09.02.2012; Опубл. 25.07.2012.
2. Деклараційний патент на корисну модель № 77984 Україна, МПК A61B10/00. / Спосіб неівазивної діагностики функціонального стану ендотелію при вагітності / В.М. Запорожан, Д.Г.Коньков, С.Р.Галич, О.Л.Луцкер № U 201207436; Заявл. 09.06.2012; Опубл. 11.03.2013.
3. Наказ МОЗ України № 676 от 31.12.2004. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги. – К., 2004. – С. 16-32.
4. Сидорова И.С. Маркеры дисфункции эндотелия в оценке степени тяжести гестоза и эффективности терапии беременных, страдающих этим осложнением / И. С. Сидорова, Н. Б. Зарубенко, О. И. Гурина // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. - №1. - С.8-12.
5. Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preeclamptic pregnancies with or without FGR / S Cardaropoli, L Paulesu, R Romagnoli // Clinical and Developmental Immunology. – 2012. - Vol.12. – P.1-9.
6. Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia / S Kim, H Ryu, J Yang et al. // Journal Korean Medical Science. – 2004. – Vol.19. – P.688-692.
7. Serum level of vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in sera of normal and preeclamptic pregnancies / M.Farzadnia, H.Ayatollahi, M.Hasan-zadeet al. // Acta Medica Iranica. – 2009. - Vol.47. - No.1. – P.65-70.
8. Soluble forms of cell surface adhesion molecules in preeclampsia / O. I. Stepanova, N. V. Amanova, T. U. Lvova et al. // 14th International Congress of Immunology in Kobe, Japan. - 2010. - P.i181.
9. Woodfin A. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology / A. Woodfin, M.B. Voisin, S. Nourshargh // Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. – 2008. - Vol.27. - No.12. – P.2514-2523.