Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 5, с. 439-443.

©Коллектив авторов

КЛЕТОЧНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПЛАЦЕНТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РОЖЕНИЦ С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

Н.А. Друккер, О.А. Дурницына*, А.А. Никашина

Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии,
Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России,
344012, Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43; *эл. почта: doa-ozz@yandex.ru

Для выяснения роли инфекционного фактора в развитии преждевременных родов в сыворотке крови 89 рожениц с преждевременными родами (40) и своевременными родами (49) определяли содержание TLR-4 – основного компонента врожденного иммунитета, ФНО-α – провоспалительного цитокина и фосфолипазы A_2 ($ФЛА_2$), а также активность p65 NF-κB иммуноферментным методом. Фактором риска преждевременных родов является выявленная в сыворотке крови рожениц с преждевременными родами модификация метаболических компонентов, обеспечивающих реализацию иммунного ответа. Доказательством последнего служит высокий уровень TLR-4, активизирующегося при наличии инфекции, в результате чего усиливается сигнальный путь его действия, обусловливающий повышенный синтез $ФЛА_2$. Следствием данной метаболической ситуации является доступность фосфолипидов клеточных мембран матки для $ФЛА_2$, приводящей к увеличению синтеза простагландинов, что усиливает преждевременную сократительную деятельность матки.

Ключевые слова: преждевременные роды (ПР); врождённый иммунитет; TLR-4 (толл-подобный рецептор); ФНО-α (фактор некроза опухоли α)

DOI: 10.18097/PBMC20186405439

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается рост числа публикаций, посвящённых вопросам роли модификации метаболических процессов при осложнённом течении гестации. Крайним проявлением патологии в данном случае являются преждевременные роды [1].

Известно, что преждевременные роды – результат не одной, а многих причин, приводящих к несвоевременному усилению маточной активности [2]. Особый интерес возникает в случае модификации врожденного иммунитета как следствие наличия у рожениц воспалительно-инфекционного процесса.

Механизмы антиинфекционной защиты организма и влияние её модификации на осложнения беременности изучены недостаточно, несмотря на её критическую значимость для воспроизводства [3]. Врождённый иммунитет, представляющий собой наследственно закрепленную систему защиты от патогенов, обеспечивает формирование специфического иммунного ответа. Успешная защита организма от патогенных микроорганизмов осуществляется основными сигнальными рецепторами, к которым относятся толл-подобные рецепторы (TLR), среди последних TLR-4, механизм действия которого заключается во взаимодействии с мембраной патогенов, и обеспечивающего распознавание их бактериальных структур (липополисахариды, липопротеин) [4, 5]. При этом происходит выработка адаптерного белка МуД88 (одного из пяти белков, содержащих домен TLR-4), который активирует ядерный транскрипционный фактор NF-κB, инициирующий в ядре транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, в частности, ФНО-α [6, 7]. Наряду с указанным метаболическим взаимодействием ядерного фактора NF-κB и ФНО-α, обусловленного действием TLR-4, усиливается синтез ФНО-α, что может привести к апоптозу клеток трофобласта в ранние сроки гестации. Известно, что NF-κB регулирует активность более ста генов, в том числе $ФЛА_2$ [8], повышение продукции которой способствует запуску каскада арахидоновой кислоты, в конечном итоге образуются супероксиды – простагландины G_2 и H_2.

Для выяснения роли инфекционного фактора в развитии преждевременных родов представляется важным изучение у рожениц в сыворотке крови содержания TLR-4, цитокина ФНО-α, $ФЛА_2$, и активность субъединицы p65 ядерного фактора NF-κB.

Целью исследования явилось выяснение роли модификации продукции метаболически взаимосвязанных компонентов, обеспечивающих реализацию развития преждевременных родов: TLR-4, ФНО-α, $ФЛА_2$ и активности p65 NF-κB.

МЕТОДИКА

Перед началом проведения исследования было получено информированное согласие пациенток на участие в нем и использование их биопроб.

Материалом исследования служила сыворотка, полученная из крови, взятой в I периоде родов, в которой определяли содержание TLR-4, ФНО-α, $ФЛА_2$ и активность p65 NF-κB иммуноферментным методом. Определение уровня ФНО-α в сыворотке крови проводили с помощью наборов фирмы “Biosource” (США).

* - адресат для переписки

Определение содержания фосфолипазы A_2 ($ФЛА_2$) осуществляли наборами ELISA Kit for Phospolipase A_2, Lipoprotein associated ($LpPlA_2$) фирмы "Cloud-Clone Corp." (США). В основу метода положен количественный твердофазный иммуноферментный анализ типа "сэндвич". Содержание $ФЛА_2$ в образцах рассчитывали исходя из калибровочной кривой, построенной на основе анализа входящих в набор стандартов. Концентрации стандартов соответствовали: 200 МЕ/мл; 100 МЕ/мл; 50 МЕ/мл; 25 МЕ/мл; 12,5 МЕ/мл; 6,25 МЕ/мл; 3,12 МЕ/мл, согласно которым рассчитывали содержание $ФЛА_2$.

Толл-подобный рецептор 4 (TLR-4) в сыворотке крови рожениц определяли также твердофазным иммуноферментным анализом типа "сэндвич", наборами фирмы "USCN Life Science Inc." (Китай). Пробоподготовку, построение калибровочной кривой, исходя из стандартов к набору (20 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл) проводили согласно инструкции к набору. Количественную оценку осуществляли на многофункциональном программируемом счётчике для иммунологических исследований с компьютером и программным обеспечением Multilabel Counter Victor-2 1420 (Финляндия), иммуноферментном анализаторе TECAN Sunrise (Австрия), автоматическом анализаторе Immulite 2000xp (Германия).

Определение активности субъединицы p65 NF-κB в сыворотке крови рожениц проводили аналогично, используя при этом твердофазный иммуноферментный анализ типа "сэндвич", наборами фирмы "Biosource". Сыворотку получали описанным выше методом. Стандартный раствор, имеющийся в наборе, содержал 20 нг/мл; из него готовили разведения: 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл. Данные концентрации положены в основу построения калибровочной кривой. Определение оптической плотности стандартных и опытных проб проводили на фотометре Multilabel Counter 1420 (Финляндия) при 450 нм с последующим расчётом результатов.

Общеклиническое обследование осуществлялось в соответствии с действующим Приказом МЗ РФ от 12 ноября 2012 г. № 572н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю акушерства и гинекологии за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий". Всем роженицам выполнялась ультразвуковая плацентография. Исследование проводили при помощи ультразвуковых аппаратов с цветным допплеровским картированием, используя конвексный электронный датчик с диапазоном частот 3,5-6,5 МГц. Диагноз преждевременных родов уточнялся с помощью трансвагинального УЗИ с измерением длины шейки матки и дилатацией внутреннего зева трансвагинальным датчиком (5 МГц) (Aloka 1400, "Toshiba" (Eccocee)) SSA-340A (Япония).

Статистическую обработку данных осуществляли при помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 5.1 фирмы "StatSoft Inc." (CIF) и Excel-2002). Для оценки статистической значимости использовали критерий Стьюдента (t-критерий) и непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий). Отклонения между данными в норме и патологии считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включены 89 женщин в возрасте 20-39 лет в сроке беременности 34-40 недель, разделенные на 2 группы. Первую группу составили 42 пациентки с преждевременными родами в 34-36,6 недель; 47,1% первой группы были от 25 до 29 лет, от 30 до 34 лет – 30,9%, 35-39 лет – 22%. Контрольная группа представлена 49 женщинами с физиологическим течением беременности и родов (25-29 лет – 31%, 30-34 года – 31,9%). Из изложенного следует, что в I и II группу вошли женщины в одинаковом возрастном интервале. При этом первородящие женщины составили основную часть обследованных беременных (I группа – 60,8%; II группа – 39,2%).

При анализе анамнестических данных выявлено, что у пациенток I группы неразвивающаяся беременность встречалась в 2 раза чаще, чем в контрольной группе. Хронические воспалительные гинекологические заболевания органов малого таза в анамнезе более часто выявлялись у женщин с преждевременными родами в 34-36,6 недель, которые произошли на фоне вагинита и дисбиоза.

Экстрагенитальные заболевания у 37 женщин I группы представлены в основном заболеваниями эндокринной системы – 87,4%, ВДКН (врождённая дисфункция коры надпочечников) – 4,7%, гипокортицизм – 2,3%, СПКЯ (синдром поликистозных яичников) – 23,8%, сахарный диабет – 14,2%, заболевания щитовидной железы – 14,2%. Причём чаще всего имели место СПКЯ и заболевания щитовидной железы. Известно, что экстрагенитальная патология часто осложняет течение беременности. Что касается инфекционной патологии, то были выявлены следующие заболевания: у 10 – хронический пиелонефрит, у 8 – хронический цистит; эндоцервицит обнаружен у 12, кольпит – у 6, дисбиоз – у 6. В процессе гестации у всех пациенток имела место угроза прерывания, у 19 – умеренная преэклампсия, у 11 – анемия беременной. У женщин контрольной группы в течение всего срока каких-либо патологических изменений в их состоянии не наблюдалось.

Обобщая клинические данные, следует отметить, что у женщин с преждевременными родами фон наступления беременности характеризуется не только наличием большого количества экстрагенитальных, но и особенно инфекционных заболеваний.

В структуре осложнений гестации лидирующее положение занимает угроза прерывания беременности (57,1%), ФПН отмечена у 42,8% женщин, анемия – в 19% случаев, следующая позиция характерна для многоводия – 16,6%, преэклампсия – у 6 (14,2%).

При сравнительном анализе осложнений, возникших в родах, выявлено, что основная доля всех осложнений приходится на преждевременное

излитие околоплодных вод. У пациенток I группы оно достигало 59,5%. Родоразрешение кесаревым сечением у этих рожениц было проведено в двух случаях (4,25%), в контрольной группе – также в двух (4,76%). Преморбидный фон наступления беременности оказал, несомненно, влияние на особенности гестации у пациенток с преждевременными родами.

В группе сравнения 97,8% детей родились зрелыми с оценкой по шкале Апгар 8-10 баллов. Масса тела 2970-3590 г. У 5 (11,9%) детей I группы отмечалась морфофункциональная незрелость, масса тела новорожденных была в пределах 2050÷2510 г.

Полученные данные изученных биохимических показателей представлены в таблице.

Так, содержание ФНО-α в сыворотке крови беременных при преждевременных родах (I группа) оказалось повышенным почти в полтора раза относительно величин у рожениц со своевременными родами ($p<0,004$). При этом в сыворотке крови женщин со своевременными родами TLR-4 не был обнаружен, в то время как у рожениц с преждевременными родами величина его достигала 7,5 мкг/мл. Что касается содержания $ФЛА_2$ в сыворотке крови, то её величина превышала контрольный показатель в 1,89 раза ($p<0,0009$).

Увеличение продукции TLR-4 обусловлено, несомненно, наличием инфекционно-воспалительного процесса у пациенток данной группы, поскольку инфекция является одним из факторов, усиливающих экспрессию Toll-рецепторов [9, 10].

Следует отметить, что в сыворотке крови женщин со своевременными родами TLR-4 не выявлен. Данный факт подтверждает отсутствие у них каких-либо инфекционно-воспалительных заболеваний. В период воспалительного процесса TLR-4 передаёт сигнал на воспалительные цитокины, в результате чего активируется сигнальный путь, ведущий к NF-κB. В изучаемых условиях (роженицы с преждевременными родами) обнаружена низкая активность субъединицы p65 NF-κB в сыворотке крови женщин. Можно полагать, что существующая более низкая активность p65 NF-κB – результат ингибирующего действия протеина IκB. Последний, связываясь с NF-κB, снижает его активность, вследствие чего падает взаимодействие данного ядерного фактора с цитокинами (ФНО-α) [11]. В данном случае, очевидно, имеют место компенсаторные реакции, чем достигается также падение уровня внутриклеточных активных форм кислорода [12], поскольку стимулы ФНО-α, инициирующие активность NF-κB, увеличивают их образование [13, 14]. Такой характер метаболического взаимоотношения NF-κB и IκB является ключевой стадией контроля активности NF-κB, поэтому при поступлении сигнала, ведущего к активации высокомолекулярного комплекса IκB – NF-κB, содержащего серин специфическую киназу (IκK), происходит освобождение NF-κB [15]. Инактивация IκB является центральным событием воспалительного процесса, ведущего к экспрессии генов цитокинов [16]. При этом обнаружено высокое содержание $ФЛА_2$ в этих условиях – результат активации ядерным фактором NF-κB гена $ФЛА_2$, а следовательно и повышение синтеза $ФЛА_2$, запускающей метаболизм арахидоновой кислоты, при этом, в конечном итоге, образуются простагландины F2α. В результате действия последних происходит окисление сульфгидрильных групп мембранных белков клеток матки, что приводит к появлению дефектов во внутреннем липидном слое, результатом чего является нарушение функции клетки. Это обусловливает вход в клетку ионов Na, а в митохондрии – ионов Ca^{2+}, вызывая сокращение матки [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Резюмируя полученные результаты, следует отметить выявленные изменения в профиле клеточных регуляторов формирования плаценты в сыворотке крови рожениц с преждевременными родами: высокое содержание TLR-4, ФНО-α и $ФЛА_2$ при одновременном снижении активности субъединицы p65 NF-κB.

Можно утверждать, что преждевременные роды в сроки 34-36,6 недель обусловлены в данном случае воспалительным процессом, о котором свидетельствует наличие у обследованных женщин значительного количества хронических инфекционных заболеваний. Сформировавшееся системное воспаление оказывает негативное влияние на трофобласт вследствие тканевой альтерации и комплекса сосудистых изменений, в частности повышения их проницаемости [18, 19].

Таблица. Содержание ФНО-α, TLR-4 и активность p65 NF-κB и $ФЛА_2$ в сыворотке крови женщин с преждевременными и своевременными родами

№ п/п	Показатели	Роды		p
		преждевременные	своевременные	
1	ФНО-α, пкг/мл	78,5±1,7000	52,7±1,4000	< 0,0040
2	$ФЛА_2$, мкмоль/л	2192,0±111,0000	1158,0±194,0000	< 0,0009
3	p65 NF-κB, ое/мг белка	6,3±1,6000	11,7±0,9000	< 0,0300
4	TLR-4, мкг/мл	7,5±0,4640	0,0±0,0000	0,0000

Локальная альтерация за счёт нарушения клеточных структур способствует выходу в кровь внутриклеточных и мембранных структурных элементов. Это ведёт к дальнейшему цепному повреждению тканей с развитием системного патологического процесса, чем и объясняется единство местного и общего воспаления [20].

Толл-подобные рецепторы, распознающие структуры клеточной стенки бактерии, и, прежде всего, TLR-4, экскретируются на поверхности клетки [9, 21]. При этом $ФЛА_2$ внутриклеточная или внешней мембраны также участвует в процессах воспалительной реакции [22].

Биохимический механизм реализации действия TLR-4 при взаимодействии с патогенными микроорганизмами заключается в выработке адаптерного белка МуД88, который активирует ядерный фактор NF-κB. Данный фактор в покоящейся клетке находится в неактивном состоянии – ингибированный протеином IκB. Деградация IκB приводит к освобождению NF-κB, который перемещается в ядро и связывается с соответствующими генами для активации их транскрипции, в частности гена ФНО-α и $ФЛА_2$.

Обнаруженный высокий уровень ФНО-α в сыворотке крови рожениц с преждевременными родами в 34-36,6 недель относительно результатов у женщин со своевременными родами позволяет считать, что данный цитокин способен вызвать апоптоз клеток трофобласта, а следовательно тем самым нарушается формирование полноценной плаценты.

Факторами риска преждевременных родов являются выявленные изменения в содержании клеточных регуляторов формирования полноценной плаценты и снижении активности p65 NF-κB в сыворотке крови женщин как результат роли инфекционно-воспалительного процесса. Доказательством последнего служит высокий уровень TLR-4 – основного компонента врождённого иммунитета. TLR-4 активизируется при наличии патогенных микроорганизмов, в результате взаимодействия с которыми усиливается сигнальный путь его действия, приводящий к повышению синтеза $ФЛА_2$, фактора преждевременной сократительной деятельности матки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что преждевременные роды обусловлены наличием инфекционно-воспалительного процесса, доказательством которого служит появление в сыворотке крови рожениц с преждевременными родами TLR-4 (системный уровень), компонента врожденного иммунитета, приводящего к усилению сигнального пути его действия, повышающего активацию рецепторов ФНО-α и $ФЛА_2$. ФНО-α нарушает формирование полноценной плаценты, а высокое содержание $ФЛА_2$ приводит к доступности фосфолипидов клеточных мембран и увеличению синтеза простагландинов, усиливающих преждевременную сократительную деятельность матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Савельева Г.М., Шалина Р.И., Курцер М.А., Штабницкий А.М., Куртенок Н.В., Коновалова О.В.* (2010) Акушерство и гинекология, **6**, 4-9.
2. *Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А.* (2016) Российский вестник акушера-гинеколога, **16**(2), 18-22. DOI: 10.17116/rosakush201616218-22
3. *Лебедева О.П., Рудых Н.А., Полякова И.С., Пахомов С.П., Чурносов М.И.,* Самборская *Н.И.* (2010) Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация, **22**(93) (12), 25-26.
4. *Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T.* (1999) Immunol., **162**, 3749-3752.
5. *Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C.* (2001) Nature, **410**, 1099-1103.
6. *Ахматова Н.К., Киселевский М.В.* (2008) Врождённый иммунитет: противоопухолевый и противоинфекционный, Практическая медицина, М., 256.
7. *Kawagoe T., Takeuchi O., Takabatake Y., Kato H., Isaka Y., Tsujimura T., Akira S.* (2009) Nat. Immunol., **10**(9), 965-972.
8. *Головач И.Ю.* (2012) Рациональная фармакотерапия, **3**(24), 46-51.
9. *Лебедева О.П., Пахомов С.П., Калуцкий П.В., Карпов П.А., Чурносов М.И., Попов В.Н.* (2012) Иммунопатология, аллергология, инфектология, **1**, 19-26.
10. *Коровкина Е.С., Кажарова С.В.* (2016) Инфекция и иммунитет, **6**(2), 109-116. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-2-109-116.
11. *Hayakawa M., Miyashita H., Sakamoto I., Kitagawa M., Tanaka H., Yasuda H., Karin M., Kikugawa K.* (2003) EMBO J, **22**(13), 3356-3366.
12. *Doucas V., Shi Y., Miyamoto S., West A., Verma I., Evans R.M.* (2000) Int. J. Basic Clin. Endocrinol., **97**, 11893-11898.
13. *Chen F., Castranova V., Shi X.* (2001) Am. J. Pathol., **159**(2), 387-397.
14. *Ohmori Y., Hamilton T.A.* (2000), J. Biol. Chem., **275**, 38095-38103.
15. *Mercurio F., Zhu H.Y., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J.W., Young D.B., Barbosa M., Mann M.* (1997) J. Science, **278**, 860-866.
16. *Khachigian L.M., Collins T.* (1998) J. Mol. Med., **76**, 613-616.
17. *Рибони Ф., Витуло А., Плебани М., Баттаджлиарин Дж., Патерностер Д., Дель Аванцо М.* (2013) Репродуктивное здоровье. Восточная Европа: международный научно-практический журнал, **3**, 126-133.
18. *Струков А.И., Серов В.В.* (2015) Патологическая анатомия. "ГЭОТАР-Медиа", М. – 880.
19. *Питиримова Л.Н., Гумилевский Б.Ю., Загороднева Е.А.* (2014) Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, **2**(50), 31-34.
20. *Иванов В.В.* (1994) Патологическая физиология с основами клеточной и молекулярной патологии. Учебник для ВУЗов. Красноярск. 315.
21. *Гаврилова Н.А., Гаджиева Н.С., Иванова З.Г., Сапожников А.М., Каневский Л.М., Howe D.A.* (2015) Офтальмохирургия, **4**, 78-84.
22. *Головач О.А., Таганович А.Д.* (2005) Медицинский журнал, **1**(11), 37-39.

Поступила: 06. 06. 2018.
Принята к печати: 11. 10. 2018.

THE ROLE OF MODIFICATION OF INNATE IMMUNITY IN DEVELOPMENT OF PREMATURE LABORE

N.A. Drukker, O.A. Durnitsyna *, A.A. Nikashina

Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia, 43 Mechnikova str., Rostov-on-Don, 344012 Russia; *e-mail doa-ozz@yandex.ru

To clarify the role of the infectious factor in the development of premature birth (PB) in women in serum, the content of TLR-4, the p65 subunit of the nuclear factor NF-κB, the cytokine TNF-α and the activity of PLA_2 (phospholipase A_2) were determinated by the enzyme immunoassay was studied. The profile of bioregulators in women with premature births was characterized by a high content of TLR-4, TNF-α and an increase in PLA_2 activity and a decrease in the activity of the p65 subunit of NF-κB. 89 women aged 20-39 years were examined at 34-40 weeks gestation. They were divided into two groups: 42 women with preterm birth at 34-36.6 weeks, the control group is represented by 47 patients. The risk factors for PB are the presence of PB in history, endocervicitis, colpitis, dysbiosis, diseases of the urinary system (chronic pyelonephritis, chronic cystitis), aggravated obstetric and gynecological history (the threat of abortion during gestation, moderate preeclampsia, anemia of the pregnant woman). The obtained data of the studied bioregulators testify to the role of the infectious inflammatory process in the development of PB, which is evidenced by the high level of TLR-4, a component of innate immunity leading to the activation of the TLR-4 signaling pathway, which increases the activity of PLA_2-factor of premature contractile activity of the uterus.

Key words: premature birth (PB); innate immunity; TLR-4 (toll-like receptor); TNF-α (tumor necrosis factor α)