

МОРФОЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИИ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА

MORFOCITOMETRIC DIAGNOSIS OF PATHOLOGY OF A FETOPLACENTAL COMPLEX

A. Mironov

Summary. Purpose: determination of diagnostic value of a morphometry of the circulating endotheliocytes in prediction of the complicated course of pregnancy.

Research techniques. At 163 pregnant women selected by a kogortny method in the I trimester the computer morphometry of circulating endotheliocytes of peripheral blood is carried out. Depending on effective diameter of the circulating endotheliocytes 3 groups of patients are created. The research of a course of pregnancy and a perinatal outcome taking into account results of morfocitometric diagnosis of endothelial dysfunction is conducted.

Results. On somatic pathology the studied groups were comparable. The menacing spontaneous abortion is diagnosed with a frequency of 24,3% in the I group, 44,4% — in the II group, and 90,9% — in the III group. ($p < 0,001$; $t = 10,2$). Frequency of a fetoplacental failure was 10,8% in the I group, 31,1% — in the II group ($p < 0,05$; $t = 2,6$) and 70,5% — in the III group ($p < 0,001$; $t = 7,7$). A preeclampsia developed at 10,8% of women of the I group, 15,6% — the II group, and 61,4% — the III group ($p < 0,001$; $t = 6,2$). Assessment on a scale Apgar in the fifth minute less than 8 points at newborns: 2,7% in the I group, 26,7% — in the II group ($p < 0,001$; $t = 3,5$) and 13,6% — in the III group ($p < 0,05$; $t = 2,1$).

Conclusions. The computer morphometry of the circulating endotheliocytes can be a recent trend of early diagnostics of violation of a fetoplacental complex.

Keywords: pregnancy, endothelium, morphometry.

Миронов Алексей Валентинович

*К.м.н., ассистент, ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова; ГБУЗ Городская клиническая больница № 13 ДЗМ, г. Москва
Mironov75av@gmail.com*

Аннотация. Цель: определение диагностической ценности морфометрии десквамированных эндотелиоцитов в прогнозировании осложненного течения беременности.

Методы исследования. У 163 беременных, отобранных когортным методом, в I триместре проведена компьютерная морфометрия десквамированных эндотелиоцитов периферической крови. В зависимости от среднего диаметра циркулирующих эндотелиоцитов сформировано 3 группы пациенток. Проведено проспективное исследование течения беременности и перинатального исхода с учетом результатов морфоцитометрической диагностики эндотелиальной дисфункции.

Результаты. По соматической патологии исследуемые группы были статистически сопоставимы. Угрожающий самопроизвольный выкидыш диагностирован с частотой 24,3% в I группе, 44,4% — во II группе, и 90,9% — в III группе. ($p < 0,001$; $t = 10,2$). Угроза преждевременных родов диагностировалась в I группе с частотой 23%, во II группе — 27,3%, в III группе — 56,8% ($p < 0,001$; $t = 3,8$). Частота фетоплацентарной недостаточности составила 10,8% в I группе, 31,1% — во II группе ($p < 0,05$; $t = 2,6$) и 70,5% — в III группе ($p < 0,001$; $t = 7,7$). Преэклампсия развивалась у 10,8% женщин I группы, 15,6% — II группы, и 61,4% — III группы ($p < 0,001$; $t = 6,2$). Оценка по шкале Апгар на пятой минуте менее 8 баллов у новорожденных: 2,7% в I группе, 26,7% — во II группе ($p < 0,001$; $t = 3,5$) и 13,6% — в III группе ($p < 0,05$; $t = 2,1$).

Выводы. Компьютерная морфометрия десквамированных эндотелиоцитов может являться новым направлением ранней диагностики нарушения фетоплацентарного комплекса.

Ключевые слова: беременность, эндотелий, морфометрия.

Введение

Успешная гестация во многом зависит от адекватной имплантации и трансформации спиральных артерий с установлением полноценного кровотока в системе мать-плацента-плод [1, 2, 3]. Нарушения процессов инвазии трофобласта в I триместре беременности ведут к реализации поздних гестационных осложнений: задержке внутриутробного развития плода, преэклампсии, преждевременным родам, отслойке плаценты, что повышает перинатальную заболеваемость. В исследованиях последних лет все большее значение

отводится эндотелию сосудов, как фактору, способному объединить основные механизмы, обеспечивающие гомеостаз на уровне микроциркуляции в фетоплацентарном комплексе [1, 4, 5, 6].

Одним из методов диагностики эндотелиальной дисфункции является изучение циркулирующих десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК) в периферической крови с помощью микроскопии. Циркулирующие десквамированные эндотелиоциты — это клетки, которые отделяются от стенки кровеносного сосуда в процессе его повреждения [7] и являются прямым клеточным

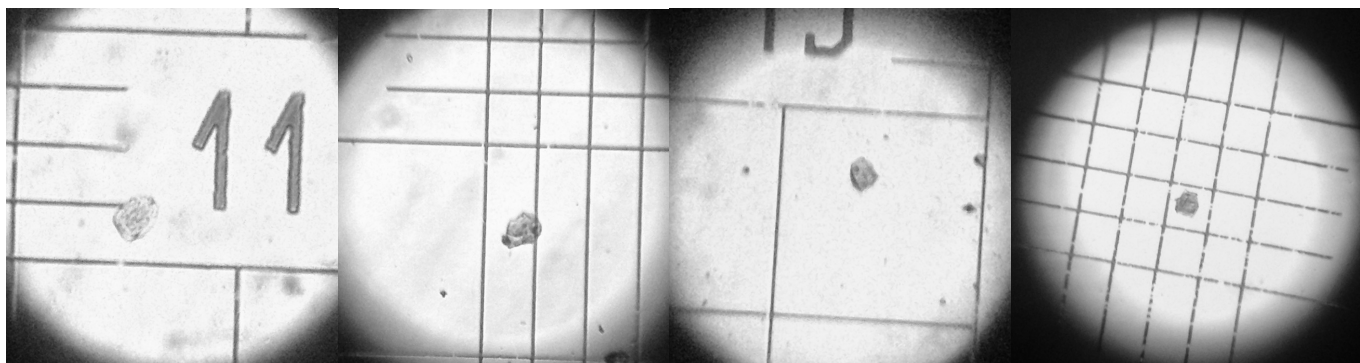


Рис. 1. Десквамированные эндотелиоциты в камере Горяева. Окраска метиленовой синий. Увеличение СМ х600.

маркером дисфункции эндотелия [8]. Результаты большого количества исследований показали, что уровень циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов в периферической крови повышается при заболеваниях, связанных с поражением сосудов [9]. Эндотелиоциты — это клетки толщиной 1–2 мкм и диаметром 10–50 мкм, имеющие плоскую форму, вытянутое, расположенное в центре ядро, и характеризующиеся выраженной морфологической неоднородностью. Эндотелиальные клетки могут отсоединяться от стенки сосуда как в неизменной форме, так и в виде клеточных фрагментов. Апоптоз является основным механизмом повреждения клеток при эндотелиальной дисфункции [8, 10, 11, 12]. Морфологическая картина апоптоза проявляется в уменьшении объема клетки, сморщивании цитоплазматической мембраны и фрагментации клетки на мембранные везикулы [13]. При выраженной степени эндотелиальной дисфункции большая часть десквамированных эндотелиоцитов фиксируется при морфометрии в стадии блеббинга и апоптозных телец, что отражается на геометрии пораженных клеток. В нашем исследовании разработан новый подход в цитодиагностике эндотелиальной дисфункции у беременной, основанный на анализе морфологии десквамированного эндотелиоцита с помощью метода компьютерной цитометрии.

Цель: определение диагностической ценности морфометрии десквамированных эндотелиоцитов в прогнозировании осложненного течения беременности.

Материалы и методы исследования

В исследование включено 163 пациентки с одноплодной беременностью, отобранных когортным методом. В I триместре у всех беременных была проведена оценка состояния эндотелиальной системы на основе морфометрического исследования циркулирующих эндотелиоцитов периферической крови. Проводилось выделение ДЭК из периферической крови по методи-

ке, предложенной в 1978 г. J. Hladovec [14]. Принцип метода основан на сепарации центрифугированием эндотелиоцитов вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов при помощи АДФ. Венозная кровь в объеме 4–5 мл отбирается в пробирки, в качестве стабилизатора используется 3,8% раствор цитрата натрия из расчета 1:9. Тромбоциты отделяются путем добавления раствора АДФ (из расчета 0,4 мл раствора АДФ на 1 мл супернатата), перемешивания смеси в течение 10 мин и центрифугирования (1000 оборотов, 10–15 мин). Бестромбоцитарная плазма осторожно отделяется от осажденных тромбоцитов и повторно центрифугируется (1000 оборотов, 20 мин). Полученная надосадочная жидкость сливается, и к осадку добавляется 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. У всех беременных проводилась фотофиксация циркулирующих эндотелиоцитов и компьютерная обработка изображения: в автоматическом режиме у каждой пациентки проведено исследование 100 цитообъектов ДЭК и определен средний диаметр изучаемых клеток. Цитологические препараты исследовали под микроскопом Leika DM 1000 с компьютерной видеоприставкой для обработки и анализа изображений Leika Application Suite LAZ EZ Version 2.1.0. (2012).

Согласно полученным данным исследуемый контингент был разделен на 3 группы. I группу составили 74 женщины, у которых в первом триместре беременности средний диаметр ДЭК периферической крови составил более 40 мкм (рис. 1).

Во II группу вошли 45 женщин, у которых средний диаметр ДЭК составил 30–40 мкм. III группу составили 44 женщины, у которых средний диаметр ДЭК был менее 30 мкм. Анализу подвергнуты следующие показатели: возраст, профессиональные вредности и вредные привычки, соматическое здоровье пациенток. Проведено проспективное исследование течения беременности и своевременных родов в исследуемых группах, а также проанализировано состояние их 163 новорожденных детей.

Таблица 1. Структура экстрагенитальной заболеваемости в исследуемых группах

Показатель		Заболевание мочевыделительной системы	Болезни сердечно-сосудистой системы	Болезни желудочно-кишечного тракта	Ожирение	Заболевания щитовидной железы
		1 группа, n=74	абс.	11	21	4
	%	14,9	28,4	5,4	13,5	6,7
2 группа, n=45	абс.	8	17	5	12	8
	%	17,8	37,8	11,1	26,7	16
3 группа, n=44	абс.	11	13	1	6	4
	%	25	29,5	2,3	13,6	8

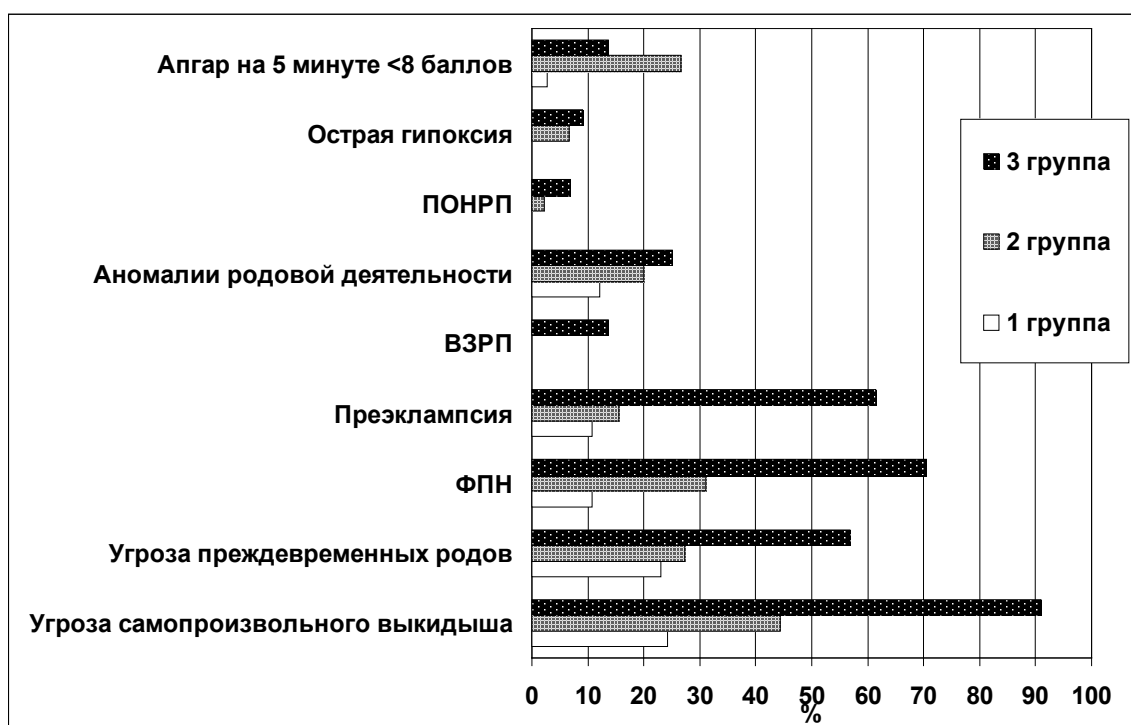


Рис. 2. Диаграмма показателей акушерской и перинатальной патологии в исследуемых группах

Статистический анализ материала осуществлялся с помощью программ Excel (Microsoft Office Excel 2003) и Statistica (for Windows release 6.0 компании StatSoft.Inc., 2002). Определялись средняя арифметическая величина (M), ошибка средней арифметической (m), отклонение варианты (v). Вычислялся критерий Стьюдента (t), и определялась достоверность двух средних величин (p). В исследовании учитывались только достоверные корреляционные связи (p<0,05).

Результаты и их обсуждение

Средний возраст женщин I группы составил 26,02±5,2 лет, во II группе — 28,24±5,3 лет, в III группе —

26,3±4,6 лет. Вредные привычки и производственные вредности не имели достоверных отличий в исследуемых группах. Табакокурение зафиксировано в I группе у 9,5% пациенток (7 чел.) и у 15,6% женщин II группы (7 чел.) и у 6,8% беременных III группы (3 чел.). По соматической патологии исследуемые группы также были статистически сопоставимы (табл. 1)

Все соматические заболевания, выявленные у беременных в исследуемых группах, были в состоянии компенсации. Гипертоническая болезнь и сахарный диабет были критериями исключения в исследовании, так как являются самостоятельными предикторами развития эндотелиальной дисфункции.

Перспективное исследование течения беременности показало следующие результаты (рис. 2). Частота угрожающего самопроизвольного выкидыша во II и III группах превысила показатель I группы в 1,5 и 3 раза. Угрожающий самопроизвольный выкидыш диагностирован с частотой 24,3% в I группе (18 чел.), 44,4% — во II группе (20 чел.), и 90,9% — в III группе (40 чел.) ($p < 0,001$; $t = 10,2$). Угроза преждевременных родов диагностировалась в III группе в 1,5 раза чаще, чем в первой. Угроза преждевременных родов встречалась в I группе с частотой 23% (17 чел.), во II группе — 27,3% (12 чел.), в III группе — 56,8% (25 чел.) ($p < 0,001$; $t = 3,8$). В литературе описывается отрицательное влияние эндотелиальной дисфункции на невынашивание беременности. Исследование функции эндотелия спиральных артерий показало, что у большинства женщин с ранними репродуктивными потерями на момент обследования обнаруживается снижение производных оксида азота и других маркеров эндотелиальной дисфункции [15]. Многоводие диагностировано в нашем исследовании у 5,4% беременных I группы (4 чел.), 6,7% — (3 чел.) II группы, и 4,5% — III исследуемой группы (2 чел.). Крупный плод: 17,6% в I группе (13 чел.), 4,4% — во II группе (2 чел.), 18,2% — в III исследуемой группе (8 чел.). Гипохромная анемия диагностировалась с частотой 27% в I группе пациенток (20 чел.), 42,2% — во II группе (19 чел.) и 43,2% — в III группе исследования (19 чел.). Диагноз фетоплацентарной недостаточности (ФПН) устанавливался по данным ультразвуковой фето- и плацентометрии, а также ретроспективно по результатам гистологического исследования последа. Частота ФПН во II и III группах превысила аналогичный показатель I группы в 3–6 раз: частота ФПН составила 10,8% в I группе (8 чел.), 31,1% — во II группе (14 чел.) ($p < 0,05$; $t = 2,6$) и 70,5% — в III группе (31 чел.) ($p < 0,001$; $t = 7,7$). Эндотелиальная дисфункция лежит в основе патологии фетоплацентарного комплекса. Нарушение целостности эндотелия при его поражении, появление в интиме участков дезэндотелизации приводит к тому, что нейrogормоны непосредственно взаимодействуют с гладкомышечными клетками [16, 17, 18]. Преэклампсия в нашем исследовании развивалась в III группе в 5 раз чаще, чем в I группе пациенток: у 10,8% женщин I группы (8 чел.), 15,6% — II группы (7 чел.), и 61,4% — III группы (27 чел.) ($p < 0,001$; $t = 6,2$). Эндотелиальную дисфункцию рассматривают как предиктор развития преэклампсии [19]. На ультраструктурном уровне морфологические изменения в сосудах плаценты при эклампсии сопровождаются истончением базальной мембраны эндотелия и повреждением интимы сосудов, отложением фибрина и коллагена в стенке сосудов, внутрисосудистой агрегацией тромбоцитов, гиалинизацией и апоптозом клеток трофобласта, что приводит к нарушению проницаемости сосудистой стенки, развитию гипоксии и ишемии ткани плаценты [20]. По некоторым данным, признаки эндотелиальной дисфункции выявляются у всех беременных с преэклампсией [21]. Синдром задержки внутриу-

тробного роста плода диагностирован только в третьей группе с частотой 13,6% (6 чел.) ($p < 0,05$; $t = 2,6$).

По течению своевременных родов получены следующие результаты. Аномалии родовой деятельности встречались во II и III группах в 1,5–2 раза чаще, чем в I группе: 12,2% (9 чел.), 20% (9 чел.) и 25% (11 чел.) — соответственно. Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты (ПОНРП) встречалась только во II и III группах: 2,2% — во II группе (1 чел.), и 6,8% пациенток — в III группе (3 чел.). Острая гипоксия плода в родах выявлялась во II группе с частотой 6,7% (3 чел.), 9,1% — в III группе (4 чел.) ($p < 0,05$; $t = 2,1$).

При изучении состояния доношенных новорожденных были получены следующие результаты. Вес и рост детей практически не различался в исследуемых группах. Средний вес детей составил 3662 ± 443 г. в I группе, 3469 ± 354 г. во II группе и 3393 ± 692 г. в III группе. Средний рост новорожденных в исследуемых группах, соответственно: $52,3 \pm 2,08$ см., $50,8 \pm 2,16$ см. и $51 \pm 3,7$ см. При исследовании оценки по шкале Апгар выявлены более низкие результаты в III исследуемой группе. Средняя оценка по шкале Апгар у доношенных новорожденных в I группе составила на первой минуте $7,76 \pm 0,71$ балла, на пятой минуте $8,41 \pm 0,55$ балла. Во II группе этот показатель составил $7,2 \pm 0,66$ и $7,89 \pm 0,65$ баллов, в III группе $7,3 \pm 0,63$ и $8,11 \pm 0,63$ баллов. При учете тех случаев, когда на пятой минуте оценка по Апгар была меньше 8 баллов, получены следующие результаты: 2,7% в I группе (2 чел.), 26,7% — во II группе (12 чел.) ($p < 0,001$; $t = 3,5$) и 13,6% (6 чел.) — в III группе ($p < 0,05$; $t = 2,1$). В литературе описывается влияние эндотелиальной дисфункции у матери на состояние новорожденных. Выявление маркеров эндотелиальной дисфункции у беременной коррелирует с хронической гипоксией плода и развитием синдрома задержки развития плода [22, 23]. Поражение эндотелия ассоциируется с развитием церебральной ишемии у новорожденных, нарушениями сердечно-сосудистой системы [24]. Таким образом, поражение эндотелиальной системы, диагностированное в I триместре, явилось маркером нарушений развития фетоплацентарного комплекса, повлиявших на дальнейшее течение беременности, роды, а также состояние новорожденных.

Выводы

Морфометрия циркулирующих эндотелиоцитов может являться перспективным направлением ранней диагностики нарушения эндотелиальной системы у человека. Введенный метод компьютерной морфоцитометрии повышает информативность оценки нарушений эндотелиальной системы, позволяет оптимизировать раннюю диагностику сосудистых нарушений, профилактировать развитие акушерских и перинатальных осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бицадзе В.О., Макацария А. Д., Хизроева Х. Д., Яшенина Е. В. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности//Практическая медицина. — 2012. — 60(5). — С. 22–29.
2. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии / под ред. В. Н. Серова, Г. Т. Сухих, В. Н. Прилепской, В. Е. Радзинского [и др.] — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 1136 с.
3. Сидорова И.С., Кирющенко А. П., Вартанова А. О. Прогнозирование и исходы беременности и родов у пациенток с острым гестационным пиелонефритом//Акушерство и гинекология. — 2010. — № 4. — С. 37–40.
4. Тирская Ю.И., Рудакова Е. Б., Новиков, А. И. Семенкин А. А. Результаты оценки функционального состояния эндотелия и иммунологического статуса у женщин с синдромом привычной потери плода вирусной этиологии//Материалы международной научно-практической конференции «Иммунологические аспекты репродукции человека». — Новосибирск, 2008 — С. 15–16.
5. Макаров О.В., Волкова Е. В., Кушхов Р.Х. Микроальбуминурия у беременных высокого риска по развитию гестоза//Перспектива —2011: материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. — Нальчик, Кабардино-Балкарский государственный университет. — 2011. — Том II. — С. 291–295.
6. Патент «Способ раннего прогнозирования плацентарной недостаточности»/Макаров О.В., Волкова Е. В., Кушхов Р.Х. Регистрационный номер 2009126253/14(036524) от 07.06.2010 г.
7. Chao Li, Yue-Min Xu, Rong Chen, Chen-Liang Deng. An effective treatment for penile strangulation//Molecular Medicine Reports. — 2013, Vol. 8 (1). — P. 201–204.
8. Новый подход к оценке дисфункции эндотелия: определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток методом проточной цитометрии/Феоктистова В.С., Вавилова Т. В., Сироткина О. В. [и др.]//Клиническая лабораторная диагностика. — 2015 — Т. 60, № 4. — С. 23–27.
9. Fadini G. P., Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology//Cardiovascular research. — 2010. — 87(1). — P. 12–21.
10. Попова А.А., Березикова Е. Н., Маянская С. Д., Яковлева Н. Ф. Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования// Сибирское медицинское образование. — 2010. — Том 4, № 64. — С. 18–22.
11. Неразвивающаяся беременность: тромбофилические и клинико-иммунологические факторы [руководство] / Доброхотова Ю. Э., Джобова Э. М., Озерова Р.И. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 133 с.
12. Герилович Л.А., Базина М. И., Егорова А. Т., Моргун А. В., Салмина А. Б. Эндотелин-1 у пациенток с различными формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Медицина и образование в Сибири. — 2013. — № 6.
13. Мнихович М. В. Оценка апоптоза при раке молочной железы по данным изучения полутонких срезов и электронной микроскопии// Морфология. — 2011. — Т. V, № 2. — С. 45–48.
14. Hladovec J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris//Klin. Wochenschr. — 1978. — Vol. 56 (20). — P. 1033–1036.
15. Айени Даниель Олуосола., Туре Пенго Эльвира Д. Ф. Особенность эндотелиальной функции сосудов матки у женщин с ранними репродуктивными потерями. // Тезисы IV международной научной конференции «Science 4 health» РУДН.-Москва. — 2012. — С. 20
16. Моисеева, И.В., Мансур-Хассан С. Х. Функциональные показатели эндотелия в динамике физиологической беременности у женщин (по данным реактивной пробы плечевой артерии)//Аспирантский вестник Поволжья.-2015. — № 3–4. — С. 78–82.
17. Газиева И.А., Г. Н. Чистякова Современный взгляд на проблему нарушения иммунологической регуляции плодово-материнских взаимодействий с ранних сроков беременности//Уральский мед. журнал — 2010. — № 3 (68). — С. 5–15.
18. Karthikeyan, V.J., Lip G. Y., Karthikeyan V. J. Endothelial damage/dysfunction and hypertension in pregnancy//Front. Biosci. (Elite Ed). — 2011 — № 3. — P. 1100–1108
19. Speer P.D., Powers R.W., Frank M. P. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants//Am J Obstet Gynecol. — 2008. — 198(1). — P. 112–117.
20. Saleem Alkasiy K., Al-Habib M. F., Abdulshaheed N. A. Electron microscopic study of the effect of preeclampsia on the placental endothelial cells ultra structures during pregnancy//Al-Kindy Col Med J. — 2010. — 6 (1). P. 39–44.
21. Применение протеомного анализа мочи в диагностике состояния новорожденных детей / Стародубцева Н. Л., Кононихин А. С., Бугрова А. Е. [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2015. — № 12. — С. 166–169
22. Михаленко И.В., Михалев Е. В. Гуморальные показатели состояния системы сосудистого эндотелия и гемостаза у недоношенных новорожденных детей с гипоксическим поражением ЦНС//Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2014. — № 2. — С. 61–65.
23. Lanir N., Aharon A., Brenner B. Haemostatic mechanisms in human placenta//Best Pract Res Clin Haematol. — 2010. — 16(2). — P. 183–195.
24. Чистякова Г.Н., Ремизова И. И., Газиева И. А., Устьянцева Л. С. Оценка состояния сердечно-сосудистой системы детей, родившихся от женщин с хронической артериальной гипертензией//Педиатрия. Журнал имени Г. Н. Сперанского. — 2015. — 94(2). С. 8–12.

© Миронов Алексей Валентинович (Mironov75av@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»