

На правах рукописи

Низяева Наталья Викторовна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРАЖЕНИЙ
ПЛАЦЕНТЫ И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ
ПРЕЭКЛАМПСИИ**

14.03.02 – патологическая анатомия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор **Щеголев Александр Иванович.**

Официальные оппоненты:

Волкова Лариса Владимировна, доктор медицинских наук, профессор кафедры фундаментальной медицины Медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»;

Кулида Людмила Викторовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Барина Ирина Владимировна, доктор медицинских наук, руководитель патологоанатомического отделения государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»;

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва.

Защита состоится «22» сентября 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1) и на сайте ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России: <https://rsmu.ru/research/dissertations>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Д 208.072.04, д.м.н.

Леонова Людмила Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Среди осложнений беременности самым грозным и загадочным остается преэклампсия (ПЭ). Преэклампсия – мультисистемное патологическое состояние, возникающее после 20 недель гестации, характеризующееся артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией, нередко с отеками и проявлениями полиорганной недостаточности (Гипертензивные расстройства..., 2016; Dong X. et al., 2017; Magee L.A. et al., 2014). ПЭ обнаруживается в 3–8% случаев всех беременностей (Rana S. et al., 2019; Thornton C. et al., 2013) и является одной из ведущих причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности (Гипертензивные расстройства..., 2016; Хлестова Г.В. и др., 2017; Travaglini A. et al., 2019).

Поскольку ПЭ развивается во время беременности, и ее симптомы исчезают после родоразрешения, вероятно, в манифестации заболевания ведущая роль принадлежит плаценте, хотя патофизиология данного состояния до конца не ясна. Существует множество патогенетических теорий ПЭ: плацентарная, иммунологическая, нейрогенная, гормональная, метаболическая, воспалительная, генетическая и др. (Перетятко Л.П. и др., 2018; Сухих Г.Т. и др., 2012; Benirschke K. et al., 2012; Dong X. et al., 2017; Magee L.A. et al., 2014; Steegers E.A. et al., 2010). При этом каждая из них в отдельности интерпретирует только часть изменений и не может объяснить весь симптомокомплекс, наблюдаемый в организме беременной (Mustafa R. et al., 2012; Singh H.J., 2009). По степени тяжести выделяют тяжелую и умеренную преэклампсию. Для тяжелой ПЭ характерны: повышение артериального давления (160/110 мм рт. ст. и выше), протеинурия (> 5 г в сутки), олигурия (объем мочи в сутки < 400 мл), которая может перейти в анурию, а также отеки, мозговые и зрительные нарушения, тромбоцитопения, диспепсические явления, нарушение функций печени, гипокоагуляция. Для умеренной – характерно повышение систолического (140 мм рт.ст. и выше) и диастолического (90 мм рт. ст. и выше) АД, уровень протеинурии (> 0.3 г в сутки). В зависимости от сроков манифестации (до 34 и после 34 недель) выделяют раннюю и позднюю ПЭ, которые характеризуются разным клиническим течением (Гипертензивные расстройства..., 2016; Magee L.A. et al., 2014) и, вероятно, имеют разные патогенетические механизмы развития.

Прогнозирование манифестации клинических симптомов этого заболевания все еще остается чрезвычайно трудным (Zeisler H. et al., 2016), что делает поиск диагностических маркеров ПЭ одной из ключевых задач персонализированной медицины. Ввиду этого представляется наиболее важным создание алгоритма прогнозирования и диагностики для выявления женщин с риском развития гипертензивных расстройств и ПЭ, что позволит улучшить результаты лечения этой группы пациенток.

Степень разработанности темы исследования

Развитие ПЭ традиционно связывают с нарушением инвазии трофобласта (Steegers E.A. et al., 2010). Однако роль мезенхимальных клеток стромы ворсин на данный момент остается не до конца изученной, хотя она связана с ростом плаценты, дифференцировкой ворсин и степенью зрелости ворсинчатого дерева.

Считается, что кровеносные сосуды плаценты не имеют иннервации, а регуляция сосудистого тонуса контролируется молекулами, поступающими с кровотоком (Benirschke K. et al., 2012). Спазм сосудов ворсинчатого дерева плаценты может представлять собой один из важнейших факторов при гипоксии плода и развитии ПЭ (Benirschke K. et al., 2012). Последние данные показывают, что клетки с пейсмекерными свойствами, называемые телоцитами (Тц), способствуют сокращению клеток гладких мышц, в том числе стенки сосудов (Cretoiu S.M. et al., 2015; Kurahashi M. et al., 2011; Rucovský V. et al., 2007). Отдельные исследования свидетельствуют об обнаружении клеток, похожих на Тц, в ворсинах плаценты (Suciú L. et al., 2007), но результаты этих исследований носят противоречивый характер. Отсутствие в плаценте нервных окончаний делает Тц ключевыми фигурами в регуляции плаценты и тонуса сосудов. Их обнаружение имеет фундаментальное значение для понимания роли плаценты как при физиологической беременности, так и при патологии.

Одной из значимых систем организма человека, контролирующей регуляцию артериального давления и сосудистого тонуса, является ренин-ангиотензиновая система (РАС). Однако данных о том, как меняется уровень вазоконстрикторов в плазме крови и плаценте при ПЭ, в настоящий момент недостаточно. При этом в литературе описана способность клеток трофобласта к синтезу отдельных веществ-вазоконстрикторов, в том числе лигандов РАС (Kurlak L.O. et al., 2016; Liu Y. et al., 2014; Lumbers E.R. et al., 2019).

Наряду с этим, нельзя исключить синтез плацентой веществ, которые могут быть обнаружены как в плазме крови, так и в моче беременных. К потенциальным кандидатам, уровень которых может повышаться в моче при преэклампсии, следует отнести ингибитор протеолиза SERPINA1 (Buhimschi I.A. et al., 2014; Huntington J.A., 2011; Kononikhin A.S. et al., 2016; Sergeeva V. et al., 2019a,b). Но данный вопрос требует дополнительных исследований.

Появились сведения о повышении концентрации внеклеточной фетальной ДНК в плазме матери при ПЭ. Этот показатель может стать специфичным прогностическим маркером заболевания. Но пока результаты исследований в этом направлении можно признать неоднозначными и противоречивыми (Dugoff L. et al., 2016; Seval M.M. et al., 2015). Этот аспект требует дополнительного изучения. Возможно, уровень фетальной ДНК связан с плацентарной ишемией и степенью повреждения структур плаценты.

Согласно ряду исследований, трофобласт плаценты обладает способностью к синтезу микроРНК с дальнейшим поступлением их в

материнский кровоток для поддержания физиологического течения беременности (Taylor E.L., Gant T.W., 2008). Однако неясно: только трофобласт обладает способностью к синтезу микроРНК или какие-то другие гистологические структуры плаценты могут также их синтезировать; имеют ли место различия в экспрессии микроРНК в зависимости от сроков манифестации и степени тяжести ПЭ.

Поскольку преэклампсия – полиэтиологическое заболевание, ассоциированное с беременностью, необходимость раскрытия звеньев патогенеза, комплексного морфологического и молекулярно-генетического исследования плаценты, совершенствования диагностики и предикции заболевания и определили актуальность темы настоящего исследования.

Цель исследования

Провести анализ морфологических и молекулярно-генетических поражений плаценты и установить их роль в патогенезе преэклампсии.

В связи с этим были сформулированы задачи исследования.

Задачи исследования

1. Определить морфологические изменения плаценты при различных вариантах и степени тяжести преэклампсии.
2. Провести анализ ультраструктурных особенностей изменений трофобласта ворсин плаценты в зависимости от степени тяжести преэклампсии.
3. Проанализировать морфологические и иммуногистохимические особенности мезенхимальных клеток и телоцитов ворсинчатого дерева плаценты при различных вариантах преэклампсии и установить их значение в патогенезе преэклампсии.
4. Сопоставить морфологические изменения трофобласта плаценты и их взаимосвязь с уровнем свободной внеклеточной фетальной ДНК в плазме крови пациенток, страдающих преэклампсией, на разных сроках гестации.
5. Оценить распределение и уровень экспрессии рецепторов врожденного иммунитета в структурах плаценты в зависимости от срока гестации и степени тяжести преэклампсии.
6. Посредством иммуногистохимии и иммуноферментного анализа провести сравнение экспрессии ренина и метаболитов ренин-ангиотензиновой системы в образцах ткани плаценты и их уровнем в плазме крови в зависимости от срока манифестации и тяжести клинических проявлений преэклампсии.
7. Проанализировать особенности экспрессии SERPINA1 в различных структурах плаценты, а также определить наличие пептидов SERPINA1 в моче пациенток, страдающих преэклампсией различной степени тяжести.

8. Оценить уровень экспрессии микроРНК, ассоциированных с трофобластом, в образцах плаценты и плазме крови при беременности, осложненной преэклампсией, в зависимости от срока гестации.
9. На основании проведенных клинико-морфологических сопоставлений выявить новые патогенетические механизмы в развитии преэклампсии.

Научная новизна

1. В работе приведены новые данные об ультраструктурных и иммуногистохимических особенностях телоцитов стромы ворсин плаценты; ТМЕМ16а рекомендуется использовать для идентификации телоцитов плаценты.

2. Впервые показана способность плаценты, преимущественно трофобласта, к экспрессии ингибитора протеаз SERPINA1 (α 1-антитрипсин), и описаны три типа окрашивания: цитоплазматическое, мембранное, гранулярное. Также описано не отмеченное ранее накопление SERPINA1 в периворсинчатом плодном фибриноиде. Накопление в депозитах плодного фибриноида, расположенного в межворсинчатом пространстве (фибриноид Лангханса) и в области децидуальной пластинки (фибриноид Рора, Нитабух), при преэклампсии является дополнительным фактором снижения инвазии трофобласта.

3. Посредством жидкостной хромато-масс-спектрометрии образцов мочи беременных, страдающих ПЭ, выявлено наличие пептидов SERPINA1 в моче беременных при тяжелой ПЭ и их отсутствие в моче женщин, страдающих ПЭ умеренного течения и хронической артериальной гипертензией. На основании этих исследований предложен подход и разработана основа для теста, который будет полезен для определения степени тяжести ПЭ.

4. Впервые описан при преэклампсии ZBP-1 (DAI) – ДНК-распознающий рецептор, определяемый в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, децидуальных клетках, мезенхимальных клетках стромы ворсин и эндотелии сосудов.

5. В работе впервые показан гранулярный тип окрашивания TLR9 в цито- и синцитиотрофобласте и во вневорсинчатом цитотрофобласте, при этом размер и количество гранул ассоциировано со степенью тяжести преэклампсии, подобная особенность описана ранее только для клеток иммунного ряда.

6. Выявленная повышенная экспрессия пептидов ангиотензина при преэклампсии в структурах плаценты указывает на роль плаценты как альтернативного источника продукции вазоконстрикторов во время беременности, что отражает один из важных механизмов развития гипертензивных состояний.

7. Расширены теоретические представления о патогенезе преэклампсии на основании анализа потенциальной достоверной взаимосвязи микроРНК-127-3р, -376а-5р, -423-5р, -519-3р, -532-5р, -539-5р, let-7е-5р, let-7с-5р, -181а, -155 и -146а и их мишеней, участвующих в регуляции пролиферации, апоптоза, инвазии, про- и противовоспалительного ответа.

Практическая значимость

На основании проведенного исследования оптимизированы принципы диагностики плацентарной недостаточности при преэклампсии.

Предложены и обоснованы новые подходы к созданию диагностических тестов на основании оценки повышения SERPINA1 в моче беременных, а также метаболитов РАС, микроРНК в плазме крови матери. Результаты исследования позволили создать алгоритм прогнозирования ПЭ на основании анализа фетальной ДНК в материнской плазме, начиная с первого триместра беременности. Показана патогенетическая связь между разрушением плаценты и выявлением указанных маркеров в биологических жидкостях (кровь, моча).

Оценена диагностическая и прогностическая значимость указанных маркеров в зависимости от времени манифестации клинических симптомов (ранняя и поздняя ПЭ), а также при умеренном и тяжелом течении заболевания.

Автор имеет 2 изобретения: Способ диагностики преэклампсии на сроках гестации до 34 недель по оценке уровней вазоконстриктора ANG (1–8) и вазодилататора ANG (1–7). Патент № RU2663456C1 от 06.08.18 г. (заявка 2017130534 от 29.08.2017); Способ диагностики тяжести преэклампсии на основании оценки экспрессии ДНК-распознающих рецепторов DAI-1 в ткани плаценты. Патент № RU2641029C1 от 15.01.18 г. (заявка 2017111609 от 06.04.2017).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Ключевыми факторами, определяющими тяжесть клинических проявлений преэклампсии, являются степень повреждения гемоплацентарного барьера, прежде всего мембран синцитиотрофобласта терминальных и промежуточных ворсин, и площадь повреждения ворсинчатого дерева. Степень повреждения ворсинчатого дерева отражают высокие концентрации фетальной ДНК в материнской плазме, особенно при преэклампсии с манифестацией до 34 недель гестации.
2. Для преэклампсии, особенно ранней манифестации и тяжелого течения, характерны специфическая перестройка стромы ворсинчатого дерева с уменьшением количества телоцитов, которые являются своеобразными зонами роста и регенерации ворсины, закладки новых сосудов, а также с увеличением доли фибробластов и фиброцитов, и, как следствие, отложение депозитов коллагена в строме ворсины и под

базальной мембраной, что приводит к увеличению толщины гемоплацентарного барьера, к ухудшению газообмена и прогрессированию гипоксии.

3. При ранней преэклампсии в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, децидуальных клетках и мезенхимальных клетках стромы отмечены изменения экспрессии рецепторов врожденного иммунитета, проявляющиеся увеличением уровня ассоциированных с провоспалительным ответом (ZBP-1, TLR8, TLR9, TLR4, NOD-1) и снижением уровня противовоспалительных (Tollip).
4. При ранней преэклампсии обнаружены выраженные нарушения в регуляции артериального давления, в том числе, ренин-ангиотензиновой системы, что проявляется повышенным синтезом ренина и пептидов ангиотензина структурами плаценты, а также увеличением вазоконстриктора ангиотензина II и снижением вазодилататора ангиотензина 1–7 в материнской плазме, отражая прогрессирование артериальной гипертензии и способствуя более тяжелому клиническому течению заболевания.
5. При умеренной преэклампсии мембранное и цитоплазматическое, а также гранулярное окрашивание SERPINA1 в цито- и синцитиотрофобласте было повышенным, потеря мембранного окрашивания при тяжелой преэклампсии связано с разрушением трофобласта. Пептиды SERPINA1 с фрагментами трофобласта поступают в материнский кровоток и могут быть обнаружены в моче. Появление пептидов SERPINA1 в моче беременных коррелирует с клинико-лабораторными показателями тяжести заболевания: повышением артериального давления, нарастанием протеинурии, повышением уровня печеночных трансаминаз, нарушениями в системе свертывания крови, что позволяет считать SERPINA1 специфическим маркером степени тяжести преэклампсии.
6. Вне зависимости от сроков клинической манифестации преэклампсии в ткани плаценты отмечено значимое снижение экспрессии в плаценте наиболее специфичных для трофобласта микроРНК-127-3р, -376а-5р, -423-5р, -519-3р, -532-5р, -539-5р, что отражает дисфункцию плаценты и неполноценность трофобласта при преэклампсии. Повышение микроРНК-423-5р в плазме крови матери специфично для ранней преэклампсии.

База проведения научного исследования

Исследование проводилось на базе 2-го патологоанатомического отделения федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения и результаты диссертации соответствуют формуле и области исследований специальности 14.03.02 – «Патологическая анатомия».

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования, реализации поставленных задач и обоснования основных положений использовался анализ современной литературы по теме диссертации. Исследование проведено на современном уровне с помощью комбинации методов гистологического, иммуногистохимического исследований, электронной микроскопии, морфометрии, жидкостной масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа, хроматогенной гибридизации *in situ* (CISH), ПЦР в реальном времени. Работа выполнена в дизайне проспективного и ретроспективного исследований с подтверждением значимости результатов современными методами статистической обработки данных.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность полученных результатов определяется достаточным (репрезентативным) объемом выборок обследованных пациенток и качеством исследований, проведенных современными морфологическими и молекулярными методами. Кроме того, значимость результатов подтверждена методами статистической обработки данных, адекватными поставленным задачам.

Основные результаты работы доложены и обсуждены

Данные диссертации доложены на общероссийских с международным участием Конгрессах: по Регенеративной медицине (2015, 2017, 2019), «Амбулаторно-поликлиническая практика: диагностика, лечение, профилактика» (2016), на XXVI Международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (2016), на конференциях «Мать и дитя» (2015–2020), Международных конгрессах по репродуктивной медицине (2015–2019), на Международных и Европейских конгрессах патологов в Сербии (Белград, 2015), Голландии (Амстердам, 2016), Германии (Кёльн, 2017), Испании (Бильбао, 2018), Франции (Ницца, 2019), на Конгрессе Toll meeting в Португалии (Порто, 2018) – представлены устные и постерные доклады.

Основные положения настоящей работы доложены на заседании Ученого Совета федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 21.10.2020, протокол № 15.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 82 печатные работы, в том числе **29 статей** в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций, 3 – в международных изданиях (Q1), результаты 19 исследований были представлены на Европейских международных конгрессах (2014–2019). Зарегистрировано 2 патента.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе направления исследования, разработке дизайна, определении целей и задач исследования, подборе и подготовке образцов биоматериала, в проведении гистологического и иммуногистохимического анализов, в исследованиях с применением метода гибридизации *in situ* и морфометрии, в оценке полученных результатов, в проведении статистического анализа, подготовке докладов и написании статей.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 336 страницах, содержит 25 таблиц и 44 рисунка. Библиография включает 571 источник – 58 на русском, 513 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В группы исследования были включены женщины, страдающие преэклампсией и с неосложненной физиологической беременностью соответствующих сроков гестации. Все пациентки прочитали и подписали информированное согласие. Исследование одобрено Этическим Комитетом федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 6 от 09 июня 2016 г.

Группы исследования

Критерии включения и исключения

Критерии включения для исследования в группу преэклампсии: артериальная гипертензия (артериальное давление $\geq 140/90$ мм рт. ст.), протеинурия (≥ 0.3 г/л в суточной моче), отеки, проявления мультисистемной недостаточности органов. Диагноз тяжелой ПЭ соответствовал следующим симптомам: артериальное давление 160/100 мм рт. ст. и выше, измеренное не менее двух раз с интервалом 6 ч в горизонтальном положении пациентки; протеинурия > 5 г/сут или 3 г и более в моче, взятой отдельными порциями; олигурия – 500 мл мочи в день или меньше; боль в эпигастральной области или боль в правом подреберье; отек легких или легочная недостаточность;

печеночная недостаточность (повышение аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) более чем в два раза), симптомы неврологических нарушений; тромбоцитопения ($< 150 \times 10^9/\text{л}$); задержка роста плода (вес плода < 10 перцентилей). Пациентки с проявлением патологии до 33 недель включительно были отнесены к ранней ПЭ.

Критерии для хронической артериальной гипертензии: повышение артериального давления ($\geq 140/90$ мм рт. ст.) без повышения или с повышением уровня белка в моче до 0.5 г в сутки.

Критерии включения для поздней группы сравнения (после 34 недель)

1. Физиологическая беременность, наступившая в естественном цикле
2. Оперативное родоразрешение по следующим показаниям:
 - наличие рубца на матке после ранее выполненной операции кесарева сечения;
 - заболевания глаз, заболеваний сетчатки, миопии тяжелой степени (что не влияло на течение беременности и формирование плаценты);
 - неправильное положения плода;
 - анатомически узкий таз;
 - общее содержание белка в моче < 100 мкг/мл.

Критерии включения для ранней группы сравнения (до 34 недель)

Преждевременные оперативные роды на сроке до 34 недель гестации, беременные без признаков гипертензивных расстройств, у которых под контролем гистологического исследования были отобраны образцы плацент без признаков воспалительной инфильтрации (хориоамнионитов, виллитов и интервиллитов).

Критерии включения для всех участниц исследования

1. Одноплодная беременность;
2. Возраст беременной от 18 до 43 лет;
3. Наличие критериев преэклампсии;
4. Родоразрешение путем операции кесарева сечения.

Критерии исключения для всех участниц исследования

1. Многоплодная беременность;
2. Тяжелая соматическая патология у беременной;
3. Наступление беременности в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий;
4. Возраст до 18 и свыше 44 лет;
5. Переношенная беременность (> 40 недель);
6. Тяжелые экстрагенитальные заболевания матери;
7. Состояние после трансплантации внутренних органов и онкологических заболеваний в анамнезе;
8. Аутоиммунные заболевания;
9. Декомпенсированная болезнь почек;
10. Хромосомные аномалии у плода;
11. Врожденные аномалии развития плода;
12. Антенатальная гибель плода.

Количество пациенток в группах исследования

В исследование было включено 776 беременных



Дизайн исследования

К задачам 1–8 – ретроспективное исследование по типу «случай–контроль».

К задаче 4 – проспективное когортное исследование, включающее 580 женщин, из которых преэклампсия выявлена у 20 пациенток (3.44%) и преждевременные роды – у 19 (3.27%). Образцы плазмы крови для оценки внеклеточной ДНК брали на 11–14, 24–26, 30–32 неделях беременности.

Морфологическое исследование плаценты

Выполнено макроскопическое и микроскопическое исследование плаценты (Милованов А.П., 1999; Benirschke K. et al., 2012). При гистологическом исследовании состояние ворсинчатого дерева плаценты и степень его соответствия сроку гестации оцениваются на основании шкалы (Benirschke K. et al., 2006, p. 498). Для исследования с помощью трансмиссионного электронного микроскопа «Philips CM100» (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Holland) образцы подготавливали согласно стандартной методике (Сухачева Т.В. и др., 2005).

Иммуногистохимическое исследование

На парафиновых срезах толщиной 4 мкм проведено ИГХ-исследование автоматическим иммуностейнером с закрытым протоколом для детекции Ventana (Roche, UK) с применением первичных антител к SERPINA1 (1:500, Invitrogen); TLR8 (1:250, GenTex, USA), TLR9 (1:300, GenTex, USA), ZBP-1 (DLM/DAI) (1:1000, Thermo Fisher Scientific, USA), NOD-1 (1:100, Invitrogen, UK), RIG-1 (1:500, GenTex, USA), CD68 (готов к использованию, Spring Bioscience), TLR4 (1:200, Abcam, USA), Tollip (1:300, Abbiotec); CD117

(1:300, Cell Mark, USA), CD34 (готов к использованию, Spring bioscience, USA), vimentin (готов к использованию, Spring bioscience, USA), SMA (готов к использованию, Dako, Denmark), TMEM16a (DOG-1) (1:100, Abcam, UK); пептиды ангиотензина (1:300, Abcam, USA), ренин (1:100, Cloude-Clon Corp., USA).

Поскольку производителем указано перекрестное реагирование антитела и молекул ангиотензина I, ангиотензина II и ангиотензиногена, ввиду их общего строения, то продукт этой ИГХ-реакции оценен в целом как пептиды ангиотензина. Продукт положительной ИГХ-реакции определялся в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы клеток. Для проведения отрицательного контроля образцы исследуемых срезов подвергались стандартной ИГХ-процедуре без инкубации с первичными антителами. Положительный контроль для каждого антитела выбран в соответствии со спецификациями фирмы-производителя.

Оценка иммуногистохимического окрашивания и морфометрия

Интенсивность ИГХ-окрашивания мембраны и цитоплазмы СЦТ, а также размер и количество окрашенных гранул (при их наличии) оценивали с использованием системы анализа изображения в единицах оптической плотности на основе микроскопа Nikon Eclipse с программным обеспечением Nis-Elements (Чешская Республика), при увеличении $\times 400$, исследуя ≥ 20 полей зрения, при анализе каждой гистологической структуры была проведена оценка ≥ 20 точек измерений. Для удобства представления данных все показатели экспрессии были умножены на 100. Также произведена оценка количества гранул в СЦТ для TLR9 по 5-балльной шкале, созданной автором (Низяева Н.В. и др., 2021). Поле зрения, в пределах которого произведен подсчет, 175×130 мкм. Оценка числа гранул в клетках вневорсинчатого цитотрофобласта осуществлялась в расчете на одну клетку (< 20 гранул; $20\text{--}50$ гранул; > 50 гранул) (Низяева Н.В. и др., 2021).

Молекулярно-генетические методы исследования

Пептиды выделяли гель-фильтрацией и анализировали с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии в полном соответствии с протоколами, разработанными авторами ранее (Kononikhin A.S. et al., 2016). Полученные данные анализа обработаны с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (Zhang J. et al., 2012). Пептиды мочи выделялись методом гель-фильтрации и анализировались в полном соответствии с протоколами (Buhimschi I.A. et al., 2014). Для пептидомного анализа брали вторую утреннюю фракцию мочи. Определение лигандов РАС в плазме крови пациенток, страдающих гипертензивными расстройствами, проводили с помощью количественного иммуноферментного анализа с использованием наборов ELISA для Renin (active) ELISA (IBL International GmbH, Германия), для Angiotensin 1–7 (Ang 1–7) (Cloud-Clone Corp., USA), для Human ANGII EIA (RayBiotech, Inc., USA) согласно инструкциям производителей.

Определение внеклеточной ДНК плода (пДНК) в плазме крови проведено на основании количественного ПЦР-анализа путем выделения гена *RASSF1A* (Карапетян А.О. и др., 2018). Оценка уровня пДНК основана на данных о том, что в клетках плаценты промотор гена *RASSF1A* гиперметилирован, соответственно, концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц пДНК. Было обследовано 580 беременных.

CISH (хромогенная гибридизация *in situ*) – альтернативный нефлуоресцентный метод выявления микроРНК в структурных элементах плаценты, при котором выявление гибридизованных ДНК-зондов происходит с помощью иммунопероксидазной реакции. Выявление микроРНК в тканях посредством CISH с дигоксигенином проведено согласно инструкции (Exicon, USA; www.exicon.info). Оценка микроРНК посредством ПЦР-анализа произведена в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Тимофеева А.В. и др., 2016).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных проведена в пакете программ «Statistica for Windows v. 8». Среднее значение, стандартное отклонение, минимальное и максимальное значения, медианный и межквартильный интервал, частоты (%) использованы для описания количественных параметров. При сравнении средних величин используется *t*-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ, с проверкой равенства дисперсий тестом Бартлетта. Для сравнения средних величин при оценке полуколичественных показателей использовался непараметрический тест Манна–Уитни. Проверка нормальности распределения исходных данных осуществлялась с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Достоверность полученных различий определяли при помощи расчета вероятности ошибки – *p*. Согласно общепринятым в аналитической статистике принципам, при $p \leq 0.05$ выводы считались значимыми, при $p \leq 0.001$ – максимально значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРАЖЕНИЙ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Проведено гистологическое исследование микропрепаратов плаценты, окрашенных гематоксилином и эозином. Анализ микропрепаратов проводился в соответствии с балльной шкалой зрелости плаценты (Benirschke K. et al., 2006). Кроме того, в оценке состояния ворсинчатого дерева применены методы морфометрии. Исследование выполнено на 776 пациентках (табл. 1).

Таблица 1. Количество пациенток, включенных в исследование

Количество пациенток	Группы сравнения	Тяжелая ПЭ	Умеренная ПЭ
Всего	539	120	117
до 34 недель гестации	66	104	8
после 34 недель гестации	473	16	109

В исследовании нами отмечено, что малая масса плаценты – ниже 10 перцентилей по шкале Pinar (Pinar H. et al., 1996) – наблюдалась при различных вариантах ПЭ (табл. 2, 3). Наиболее выраженные изменения выявлены при тяжелой ПЭ, а также при ПЭ ранней манифестации (табл. 3).

Таблица 2. Морфологические характеристики плаценты при ранней и поздней преэклампсии и в группах сравнения

Параметры	Ранняя ПЭ	Поздняя ПЭ	Ранняя группа сравнения (до 34 недель гестации)	Поздняя группа сравнения (после 34 недель гестации)
	Me (Q1; Q3)			
Масса плаценты* (г)	256 (178.5; 333.5)	384 (287.5; 432.5)	330 (280; 384)	456 (410; 489)
Индекс извитости пуповины [#]	0.20 (0.16; 0.31)	0.24 (0.17; 0.34)	0.25 (0.23; 0.29)	0.28 (0.18; 0.35)
Длина пуповины (см)	37.7 (29.3; 51.3)	48.05 (32.1; 59)	39.3 (33.4; 45.2)	51.15 (33.8; 68.5)
Диаметр плацентарного диска М1 (см)	13.4 (7.5; 17.3)	17.1 (14.2; 24.7)	15.3 (10.3; 16.4)	21.7 (17.2; 28.3)
М2 (см)	11.2 (8.8; 16.1)	14.7 (11.2; 18.9)	12.9 (9.4; 15.7)	16.8 (14.3; 25.2)
Толщина плацентарного диска (см)	1.7 (0.7; 2.9)	2.2 (1.1; 3.2)	1.3 (0.9; 1.7)	1.5 (1.3; 2.8)
	%			
Масса плаценты < 10 перцентилей Количество наблюдений	51.72 p = 0.044	42.7 p = 0.005	21.1	16.00
Инфаркты ворсинчатого дерева плаценты**	45.4	53.6	8.2	7.8

Таблица 3. Спектр морфологических изменений плаценты при тяжелой и умеренной преэклампсии

Параметры	Тяжелая ПЭ	Умеренная ПЭ
	Me (Q1; Q3)	
Масса плаценты* (г)	275 (230; 350)	400 (370; 433)
Индекс извитости пуповины [#]	0.20 (0.17; 0.33)	0.25 (0.14; 0.37)
Длина пуповины (в см)***	40.5 (34.3; 51.3)	48.05 (29,3; 59)
Диаметр плацентарного диска М1 (см)	13.8 (10.5; 22.5)	17.6 (13.2; 28.4)
М2 (см)	10.7 (8.5; 16.6)	14.7 (9.3; 18.1)
Толщина плацентарного диска (см)	1.9 (0.6; 2.6)	2.1 (0.8; 3.2)
	%	
Масса плаценты < 10 перцентилей	61.72	46.7

Количество наблюдений*	<i>p</i> = 0.006	<i>p</i> = 0.042
Инфаркты ворсинчатого дерева плаценты**	61.9	22.7

Примечание к таблицам 2 и 3. Ме – медиана, (Q1; Q3) – интерквартильный интервал; * – при оценке массы плаценты значения перцентилей по группам были сопоставлены с табличными данными соответствующего срока гестации (Benirschke K. et al., 2006, 2012; Pinar H. et al., 1996); ** – при оценке инфарктов ворсинчатого дерева в анализ вошли только наблюдения с площадью поражения > 3 см в диаметре; *** – абсолютно короткой считали пуповину < 35 см (Benirschke K. et al., 2006, 2012; Pinar H. et al., 1996); # – индекс извитости пуповины (ИИП) = количество витков / длина пуповины; при ИИП ≤ 0.1 пуповину считали гипоизвитой, при ИИП ≥ 0.4 – гиперизвитой.

Гистологическое исследование плаценты

В гистологическом исследовании с окраской гематоксилином и эозином выявлено, что при неосложненной беременности (поздняя группа сравнения) наблюдается соответствие морфологической картине нормально капилляризованного ворсинчатого дерева плаценты с балансом зрелых промежуточных (30–40%) и терминальных ворсин (60–70%) с оценкой 21–22 балла по шкале (Benirschke K. et al., 2006).

При ранней ПЭ на сроке 26–33 недели, имеющей клинически тяжелое течение, ворсинчатое дерево представлено незрелыми и зрелыми промежуточными ворсинами с выраженными дистрофическими изменениями; в стромах ворсин определяются единичные полноценные капилляры, сохранены стромальные каналы, образованные отростками мезенхимальных клеток. При этом терминальные ворсины единичны или отсутствуют. Капилляры ворсин мелкого диаметра располагаются неравномерно, хаотично. Кроме того, при ранней ПЭ тяжелого течения значительно подвергается изменениям строма промежуточных ворсин, в которой отмечается фиброз. Это обуславливает сниженный ангиогенез ворсин (Nizyaeva N.V. et al., 2018г), что проявляется увеличением числа бессосудистых ворсин.

При поздней ПЭ и ПЭ умеренного течения ворсинчатое дерево представлено преимущественно зрелыми промежуточными ворсинами, стромальные каналы, образованные мезенхимальными клетками, частично сохранены. Ворсинчатое дерево при поздней ПЭ характеризуется преобладанием зрелых промежуточных ворсин с сочетанием признаков фиброзирования стромы и наличием участков разветвленного ангиогенеза умеренной степени (преимущественно 23–32 балла, реже 33 балла) (Benirschke K. et al., 2006). Под действием гипоксии перестройка ангиогенеза приводит к гиперкапилляризации терминальных ворсин (Benirschke K. et al., 2012), при котором диаметр капилляра уменьшается (Shchyogolev A.I. et al., 2012). Это предопределяет замедление микроциркуляции, следовательно, агрегацию тромбоцитов, образование в капиллярах микротромбов, что детерминирует фиброзирование стромы ворсин. То есть изменения, которые первоначально были направлены на уменьшение негативного влияния гипоксии, способствуют развитию декомпенсации.

Для оценки степени повреждения СЦТ ворсину разделили на 4 квадранта, квадрант составляет 25% периметра ворсины. Подсчет произведен в 10 полях зрения, при увеличении $\times 400$. При умеренной ПЭ повреждение СЦТ не превышает 25% периметра ворсины, присутствует выраженная вакуолизация СЦТ, обусловленная гидропической дистрофией. При тяжелой ПЭ участки повреждения и слущивания СЦТ составляют более 25% периметра ворсины, а в отдельных наблюдениях повреждение достигает более 50% ($p < 0.05$), что подтверждено также данными электронной микроскопии (Nizyaeva N.V. et al., 2019и). В группах сравнения обнаружены только очаговые повреждения СЦТ, которые суммарно не превышают 10% периметра ворсины.

Нами не выявлено специфических гистологических изменений, которые были бы типичны исключительно для ПЭ. Но при тяжелой ПЭ и при ранней ПЭ плацента характеризуется повреждением и слущиванием СЦТ с поверхности ворсин и гемоплацентарного барьера, снижением компенсаторных механизмов плаценты, фиброзом стромы ворсин, более высоким процентом инфарктов и псевдоинфарктов (> 3 из 10 п/з, $\times 200$), увеличением площади афункциональных зон ворсинчатого дерева, увеличением количества депозитов плодного фибриноида на фоне снижения количества синцитиальных узелков, неполноценным ангиогенезом, что отражает сниженную способность плаценты к регенерации. Для умеренной ПЭ, соответствующей поздней ПЭ, характерны изменения плаценты, которые можно отнести к проявлениям компенсации: гиперкапилляризация терминальных ворсин (ангиогенез с преобладанием ветвления сосудов) и увеличение количества синцитиальных узелков (положительный признак Tenney–Parker).

Таким образом, показатель массы плаценты не является значимой характеристикой, которую следовало бы принимать во внимание. Можно утверждать, что большее значение при оценке тяжести преэклампсии имеет оценка состояния ворсинчатого дерева и степень его повреждения.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ ВОРСИН ПЛАЦЕНТЫ И ТРОФОБЛАСТА ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

*(совместно со с.н.с., к.б.н. Сухачевой Т.В., проф., д.м.н. Серовым Р.А.,
НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева)*

Ультроструктурные изменения синцитиотрофобласта ворсин плаценты при преэклампсии

Известно, что гемоплацентарный барьер формируется клетками эндотелия сосудов ворсин, в которых протекает кровь плода, их базальной мембраной, слоем рыхлой перикапиллярной соединительной ткани (в терминальных ворсинах для улучшения кровоснабжения происходит истончение этих участков) и цито- и синцитиотрофобластом, которые омываются материнской кровью. От функционирования гемоплацентарного барьера напрямую зависит развитие плода.

Таблица 4. Количество пациенток в группах исследования

Количество пациенток	Тяжелая ПЭ	Умеренная ПЭ	Группы сравнения
Всего	14	16	20
до 34 недель гестации	11	4	10
после 34 недель гестации	3	12	10

При исследовании посредством трансмиссионной электронной микроскопии выявлено, что при неосложненной физиологической беременности на поверхности СЦТ ворсин присутствовали микроворсинки (по типу щеточной каемки). В цитоплазме СЦТ обнаружены мелкие вакуоли, образованные цистернами гЭПР. При ПЭ умеренного течения на поверхности СЦТ микроворсинки были сохранены. Одно из характерных изменений ультраструктуры СЦТ при умеренной ПЭ – это выявленные в цитоплазме множественные вакуоли разного размера, связанные с набуханием и дилатацией цистерн гЭПР. За счет этих изменений высота СЦТ увеличивалась в 1.3 раза, по сравнению с неосложненной физиологической беременностью. При тяжелой ПЭ ультраструктурные изменения СЦТ заключались в значительной конденсации хроматина ядер и в потере большинства микроворсинок на поверхности, а также в повреждении мембран и апикальных участков СЦТ. Единичные оставшиеся микроворсинки были деформированы и имели причудливую форму. В цитоплазме СЦТ присутствовало скопление вакуолей разного размера, обнаружены признаки дистрофических изменений – миелиноподобные тельца, фагосомы, апоптотические тельца, отмечалась очаговая десквамация СЦТ с поверхности ворсин.

Ультраструктурные особенности мезенхимальных клеток и телоцитов ворсин плаценты при преэклампсии

Телоциты (Тц) (от греч. τέλος – конец) (Popescu L.M., Faussonne Pellegrini M.S., 2010) – недавно открытые клетки мезенхимального происхождения, описанные в разных органах (Cretoiu S.M. et al., 2012, 2013; Popescu L.M. et al., 2015; Zhao B. et al., 2013; Zheng Y. et al., 2014). Эти клетки контактируют друг с другом посредством длинных тонких отростков и образуют разветвленную сеть, ее формирование – один из ключевых признаков, определяющих принадлежность к телоцитам (Popescu L.M. et al., 2007; Popescu L.M., Nicolescu M.I., 2013; Suciu L. et al., 2010). Тц, обладая пейсмекерными свойствами, способствуют сокращению клеток гладких мышц, в том числе стенки сосудов (Cretoiu S.M. et al., 2015; Hutchings, G. et al., 2009; Kurahashi M. et al., 2011; Pucovský V. et al., 2007), а спазм сосудов ворсинчатого дерева может иметь место в генезе ПЭ (Benirschke K. et al., 2012). По результатам исследования с помощью электронного микроскопа мы предполагаем наличие как минимум четырех типов этих клеток в плаценте

(Nizyaeva N.V. et al., 2016г, 2017б, 2018г) (табл. 5, 6). В терминальных ворсинах Тц отмечено не было.

Таблица 5. Сравнительная характеристика телоцитов и мезенхимальных клеток стромы ворсин плаценты при физиологической беременности

<i>Типы</i>			
I	II	III	IV
<i>Локализация</i>			
В строме незрелых промежуточных ворсин, формируют стромальные каналы	В строме зрелых промежуточных ворсин, под базальной мембраной СЦТ	В строме зрелых промежуточных ворсин и в стволовых ворсинах, отростки формируют сеть вокруг мелких и крупных сосудов	В строме стволовых ворсин, формируют сеть в гладкомышечной стенке кровеносных сосудов
<i>Форма клетки/ядра</i>			
Полигональные/ядро неправильной формы	Веретеновидные/ядро овальное с 1 ядрышком	Звездчатые/ядро неправильной формы с 1–2 ядрышками	Звездчатые и веретеновидные/неправильной вытянутой формы с 1–2 ядрышками
<i>Наибольший диаметр клетки, мкм, M±SD</i>			
2.85±0.6	2.65±0.9	2.96±0.8	2.98±1.1
<i>Диаметр ядра, мкм, M±SD</i>			
2.24±0.5	2.11±0.8	2.22±0.7	2.17±1.4
<i>Количество отростков</i>			
3–6	2	3–4	2–3
<i>Толщина отростков, мкм, M±SD</i>			
0.23±0.08	0.29±0.1	0.23±0.1	от 0.23 до 1.16
<i>Диаметр расширений отростков, мкм, M±SD</i>			
1.69±1.05	1.08±0.2	1.12±0.4	>1.16
<i>Органеллы</i>			
Незначительное количество цистерн гЭПР выявлено только в расширениях отростков	АЭР и гЭПР, митохондрии преимущественно в расширениях отростков	Цистерны гЭПР, единичные митохондрии, гранулы гликогена в окооядерной зоне и в расширениях отростков	Цистерны хорошо развитого гЭПР расположены рядом с ядром и в отростках, небольшое количество миофибрилл с плотными тельцами выявлены на периферии клетки (признаки как фибробластов, так и гладкомышечных клеток)

Примечание: М – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

Таблица 6. Сравнительная характеристика телоцитов стромы ворсин плаценты при преэклампсии

<i>Типы</i>				
Полигональные телоцито подобные клетки	Веретеновидные телоцито подобные клетки	Звездчатые телоцито подобные клетки	Миофибро бласты	Фиброциты
<i>Локализация</i>				
В строме незрелых промежуточных ворсин	В строме зрелых промежуточных ворсин, под базальной мембраной СЦТ	В строме зрелых промежуточных ворсин, образуют сеть вокруг кровеносных	В строме стволовых ворсин, образуют сеть в стенке кровеносных	В строме стволовых и промежуточных ворсин

		сосудов	сосудов	
<i>Форма клетки/ядра</i>				
Полигональные /многодольчатое ядро с включениями гетерохроматина по периферии ядра	Веретеновидные /овальные ядра с включениями гетерохроматина, расположенного преимущественно по периферии ядра	Звездчатые /полигональное ядро, с гетерохроматином, расположенным по периферии ядра, и с небольшими скоплениями гетерохроматина в его центре	Удлиненные /неправильной формы ядра с инвагинациями ядерной оболочки	Удлиненные /продолговатые ядра с множественными включениями гетерохроматина, образующего крупные конгломераты
<i>Наибольший диаметр клетки, мкм, M±SD</i>				
3.25±0.6	1.92±0.9	2.90±0.8	2.89±1.1	2.28±0.6
<i>Диаметр ядра, мкм, M±SD</i>				
2.64±0.7	1.61±0.8	2.39±0.8	2.23±1.0	1.65±0.6
<i>Количество отростков</i>				
3–6	2	3–4	2–3	2
<i>Толщина отростков, мкм, M±SD</i>				
0.28±0.1	0.22±0.2	0.21±0.1	0.38±0.3	0.40±0.3
<i>Диаметр расширений отростков, мкм, M±SD</i>				
1.53±0.6	0.95±0.4	1.1±0.3	0.85±0.5	0.69±0.2
<i>Органеллы</i>				
Длинные тонкие отростки, окружающие пространство канала, – с дистрофическими изменениями и частично разрушены; небольшое количество цистерн гЭПР, единичные митохондрии, вакуоли АЭР определяются в перинуклеарной зоне и в расширениях телоподий	Обычно два отростка, идущих в противоположных направлениях и контактирующих с соседними отростками; клетки повреждены и демонстрируют дистрофические изменения; целостность части отростков нарушена; несколько цистерн гЭПР и цистерны АЭР, отдельные гранулы гликогена и митохондрий расположены в перинуклеарных областях вдоль двух полюсов ядра и вблизи расширений отростка	3–4 тонких отростка отходят от клетки в разные стороны и контактируют с соседними отростками, образуя сеть; отростки с наличием дистрофических изменений, повреждений; целостность части отростков нарушена; некоторые отростки истончены, другие – утолщены; цистерны гЭПР, одиночные митохондрии и гранулы гликогена присутствуют в перинуклеарной зоне и в дилатациях телоподий	Гетерохроматин расположен по периферии оболочки ядра и ее инвагинаций; 2–3 отростка отходят от полюсов клетки; клетки обычно располагаются параллельными рядами; они имеют ультраструктурные характеристики фиброцитов и демонстрируют дистрофические изменения (например, феномен метахромазии – гранулы гликогена становятся розовыми после окрашивания метиленовым синим; наличие липидных капель)	2 тонких отростка отходят в противоположных направлениях от полюсов клетки; клетки расположены параллельными рядами; единичные цистерны гЭПР и гранулы гликогена расположены вблизи полюсов ядра и в участках расширений отростков; выявляются липидные капли

Примечание: М – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

Традиционно считалось, что CD117, CD34 и виментин являются маркерами Тц (Popescu L.M., Nicolescu M.I., 2013; Suciú L. et al., 2010). Наряду с этим, Тц были описаны как CD117+ и CD117– клетки в зависимости от принадлежности и локализации органа (Popescu L.M., Nicolescu M.I., 2013). Нами было предложено в качестве специфического идентификатора Тц плаценты использовать TMEM16a (DOG-1), который применяется для диагностики опухолей, состоящих из Тц (GIST) (Lopes L.F. et al., 2010; Miettinen M. et al., 2009). ИГХ-особенности окрашивания Тц представлены в таблице 7.

Таблица 7. Сравнительное окрашивание телочитов ворсин плаценты при преэклампсии и в группе сравнения

Группы	Маркеры		Виментин	CD34	CD117	SMA	TMEM16a (DOG-1)
Неосложненная беременность	Незрелые промежуточные ворсины		++	–	+++ *	–	+
	Зрелые промежуточные ворсины	под СЦТ	++	–	++	–	+
		в строме ворсин	+++	е.к.	+	–	+
	Стволовые ворсины (миофибробласты)		+++	+	+–+++	+++	++/+ **
Умеренная ПЭ	Незрелые промежуточные ворсины		++	–	+++ *	–	–
	Зрелые промежуточные ворсины	под СЦТ	++	–	+	–	–
		в строме ворсин	++	е.к.	+/-	–	–
	Стволовые ворсины (миофибробласты)		++	–	+/-	+–	–
Тяжелая ПЭ	Незрелые промежуточные ворсины		++	–	+/-	–	–
	Зрелые промежуточные ворсины	под СЦТ	++	е.к.	+	–	–
		в строме ворсин	+++	–	+/-	–	–
	Стволовые ворсины (миофибробласты)		+++	е.к.	+/-	+–+++	–

Примечание. * – выраженное окрашивание Тц как в строме ворсин, так и под СЦТ; ** – гестационный период от 26 до 31 недели; «+» – слабое окрашивание, «++» – умеренное окрашивание, «+++» – выраженное интенсивное окрашивание; «+/-» – слабое нерегулярное окрашивание; «+–+++» – слабое и умеренное окрашивание; «+–» – непостоянное окрашивание; «–» – отсутствие окрашивания; «е.к.» – единичные клетки.

При ранней ПЭ наибольшим изменениям подвергается строма промежуточных ворсин, которые до 34 недель должны превратиться из незрелых в зрелые промежуточные ворсины с развитой капиллярной сетью (Salgado S.S., Salgado M.K.R., 2011; Sankar K.D. et al., 2013). Также формированию полноценного капиллярного русла в строме промежуточных ворсин противодействует замещение Тц клетками с фибробластической

дифференцировкой. Фибробласты и фиброциты, продуцируя коллаген, который откладывается в виде депозитов в строме и под СЦТ, способствуют дополнительному утолщению гемоплацентарного барьера и недостаточному газообмену. Наибольшие изменения Тц створовых ворсин, выполняющих каркасную функцию плаценты и формирующихся после 34 недель гестации (Benirschke K. et al., 2012), отмечены при поздней ПЭ. Описанные нами дистрофические изменения Тц стенки створовой ворсины при ПЭ (в том числе наличие гранул гликогена и липидных капель) ведут к нарушению регуляции сосудистого тонуса, что также детерминирует развитие гипоксии. Тц потенциально могут иметь и другие функции, помимо пейсмейкерной, включая иммуномодуляцию и функции, связанные с ангиогенезом, фиброзом (Cicchillitti L. et al., 2012) и с регуляцией активности створовых клеток, при этом сами могут обладать рядом свойств створовых клеток (Díaz-Flores L. et al., 2016; Manetti M. et al., 2014; Popescu L.M., Nicolescu M.I., 2013), Тц могут быть своеобразной нишей, зонами роста для регенерации и роста ворсины, для закладки новых сосудов, поэтому их повреждение и фиброзирование на более ранних сроках гестации приводит к более тяжелому течению ПЭ.

Таким образом, в нашем исследовании мы обнаружили гетерогенную популяцию Тц в плаценте. Эти клетки различались по своей локализации, ИГХ- и ультраструктурным характеристикам. При ПЭ была отмечена потеря экспрессии TMEM16a, CD117, CD34, что вместе с данными электронной микроскопии (увеличением синтетической активности клеток, изменением размеров клеток и утолщением их отростков, продукцией коллагена) свидетельствует о трансформации Тц в фибробласты и фиброциты. Тяжелая ПЭ, ассоциированная со значимым повреждением мембран СЦТ, ведет к резкому нарушению гемоплацентарного барьера, а фибробластическая дифференцировка стромы ворсин обуславливает ее фиброзирование, появление бессосудистых ворсин, что опосредует нарушение ангиогенеза и приводит к развитию плацентарной недостаточности и манифестации симптомов ПЭ.

ЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Плацента осуществляет функцию барьера для вирусов и бактерий. В выполнении этой функции существенную роль играют рецепторы врожденного иммунитета, или паттерн-распознающие рецепторы (ПРР), способные распознавать консервативные структуры бактерий и вирусов.

В последнее время в литературе активно обсуждается способность ПРР к перекрестному реагированию с DAMPs (damage-associated molecular patterns), которые образуются при повреждении тканей в ходе различных заболеваний, в том числе ПЭ (Dalpke A., Helm M., 2012). При взаимодействии лиганда с рецептором уровень провоспалительных цитокинов повышается (Dalpke A., Helm M., 2012), что может являться триггером развития системного воспалительного ответа (Goulopoulou S. et al., 2012; Stubert J. et al., 2016; Takaoka A. et al., 2007).

Таблица 8. Количество пациенток в группах исследования

Количество пациенток	Тяжелая ПЭ	Умеренная ПЭ	Группы сравнения
Всего	35	31	66
до 34 недель гестации	27	7	30
после 34 недель гестации	8	24	39

В исследовании показана экспрессия (разной степени интенсивности) рецепторов врожденного иммунитета во всех гистологических структурах плаценты: ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, эндотелии, клетках амниона, децидуальных клетках, в мезенхимальных клетках стромы ворсин. Продукт положительной реакции визуализировался в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы клеток.

Анализ экспрессии Толл-подобных рецепторов в структурах плаценты.

Экспрессия TLR4 в структурах плаценты при преэклампсии

Одно из важных звеньев врожденного иммунитета – толл-подобные рецепторы TLRs (toll-like receptors). Нами оценена экспрессия TLR4 при тяжелой ПЭ и при неосложненной беременности в СЦТ ворсин плаценты и в эндотелии. При тяжелой ПЭ экспрессия TLR4 в СЦТ ворсин была в 1.7 раза выше, чем в эндотелии (18.83 ± 2.48 и 11.17 ± 1.33 соответственно, $p = 0.018$), а при неосложненной беременности – в 1.4 раза выше (19.92 ± 4.23 и 14.21 ± 3.21 соответственно, $p = 0.023$). При тяжелой ПЭ в эндотелии сосудов ворсин плаценты уровень экспрессии TLR4 в 1.3 раза ниже, чем при неосложненной доношенной беременности (11.17 ± 1.32 и 14.2 ± 3.2 , $p = 0.05$). В цитоплазме в цито- и СЦТ и во вневорсинчатом трофобласте при ПЭ, а также в макрофагах отмечались единичные окрашенные TLR4-гранулы.

Так как экспрессия ПРР ассоциирована со сроками гестации, то для их изучения были взяты группы ранней и поздней ПЭ и ранняя и поздняя группы сравнения (до и после 34 недель гестации). При оценке экспрессии TLR4 при ПЭ в зависимости от сроков манифестации заболевания выявлено, что наиболее высокая экспрессия присутствовала в цитоплазме СЦТ при ранней ПЭ (табл. 9). Наиболее значимые отличия TLR4 показал в СЦТ и эндотелии сосудов ворсин.

Таким образом, несмотря на то, что TLR4 считается цитоплазматическим рецептором, выявлены: экспрессия в плазматической мембране СЦТ, а также гранулярное окрашивание в цито- и СЦТ и вневорсинчатом трофобласте (табл. 9).

Таблица 9. Экспрессия TLR4 при ранней и поздней ПЭ

	СЦТ Мембрана	СЦТ Цитоплазма	Эндотелий*
Группы	М $\pm$ SD		
Ранняя группа сравнения	11 ± 1.3	13 ± 1.8	6 ± 1.0
Поздняя группа сравнения	14 ± 2.1	18 ± 2.6	8 ± 1.4
Ранняя ПЭ	17 ± 1.8	21 ± 2.3	11 ± 1.3
Поздняя ПЭ	15 ± 2.0	18 ± 1.7	8 ± 0.8

Сравнение групп	<i>p</i>		
РН–ПН	0.019	0.005	0.056
РН–РПЭ	0.00001	0.00001	0.00001
РПЭ–ППЭ	0.367	0.073	0.002
ПН–ППЭ	0.307	0.756	0.444

Примечание. РН – ранняя группа сравнения (ранняя норма); ПН – поздняя группа сравнения (поздняя норма). Данные приводятся в формате $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение; p – значимость различий между группами; * – ввиду малых размеров клеток в эндотелии было оценено только цитоплазматическое окрашивание.

Экспрессия TLR8 в структурах плаценты при преэклампсии

Максимальное окрашивание TLR8 присутствовало в структурах плаценты (в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, эндотелии сосудов, децидуальных клетках, клетках стромы) при ранней ПЭ. При поздней ПЭ картина была сходна с экспрессией при доношенной беременности ($p < 0.01$) Данные экспрессии TLR8 в различных гистологических структурах плаценты представлены на диаграммах (рис. 1).

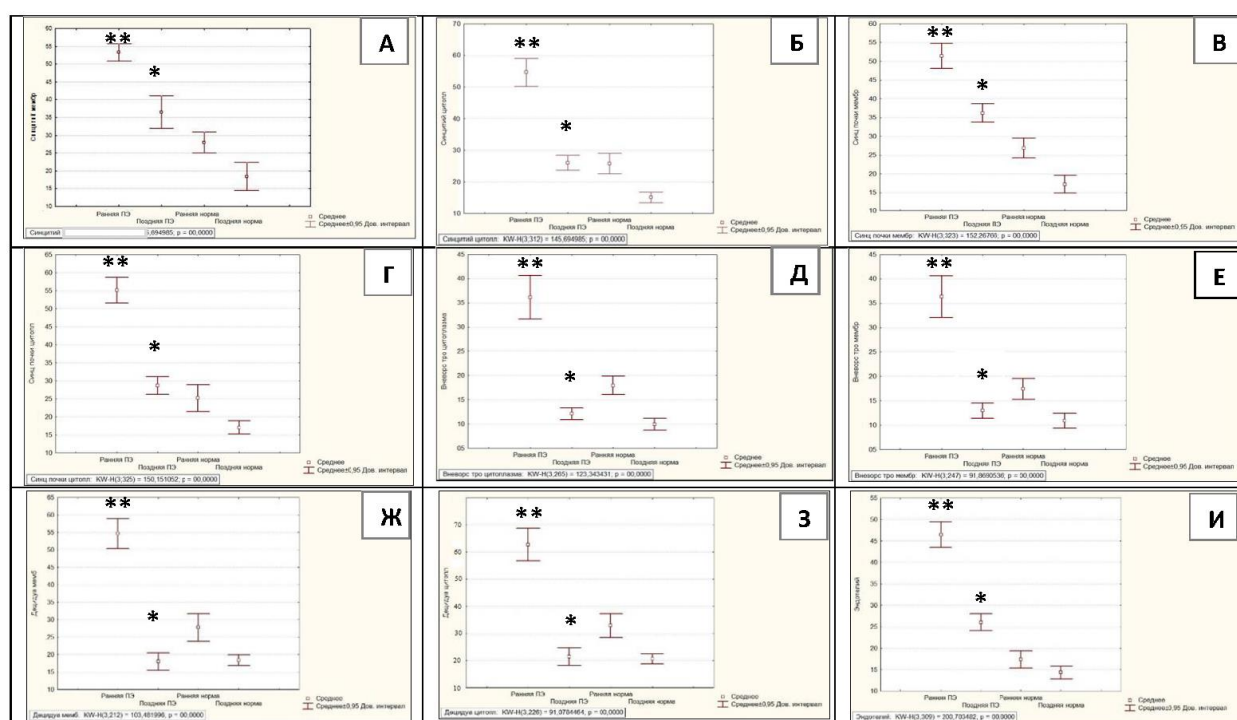


Рисунок 1. Диаграммы экспрессии TLR8 при ранней и поздней преэклампсии и в группах сравнения.

А, Б – в синцитиотрофобласте; А – мембранное окрашивание, Б – цитоплазматическое; В, Г – в синцитиальных узелках; В – мембранное окрашивание, Г – цитоплазматическое; Д, Е – во вневорсинчатом трофобласте; Д – мембранное окрашивание, Е – цитоплазматическое;

Ж, З – в децидуальных клетках; Ж – мембранное окрашивание, З – цитоплазматическое; И – в эндотелии кровеносных сосудов промежуточных ворсин (цитоплазматическое окрашивание);

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; ранняя ПЭ отличается от всех групп ($p < 0.01$); поздняя ПЭ отличается от группы сравнения ($p < 0.05$).

Кроме того, была проанализирована экспрессия TLR8 в зависимости от степени тяжести ПЭ. Так, при тяжелой ПЭ уровень экспрессии TLR8 максимальный в цитоплазме: в СЦТ – 55.76 ± 8.8 и 68.51 ± 101.3 , (мембранное и цитоплазматическое окрашивание соответственно), что значительно отличается от умеренной ПЭ ($p < 0.01$). В образцах плаценты при доношенной неосложненной беременности окрашивание минимально: в СЦТ – 18.39 ± 8.3 и 15.09 ± 5.9 (мембранное и цитоплазматическое окрашивание соответственно) ($p < 0.01$). Та же закономерность отмечается и при умеренной ПЭ – преобладание мембранного окрашивания в СЦТ и в СУ. Отношение мембранного окрашивания к цитоплазматическому в СЦТ составляет (по группам): тяжелая ПЭ – 0.76 ± 0.23 , умеренная ПЭ – 1.59 ± 0.83 и в контроле – 1.29 ± 0.52 . То есть для умеренной ПЭ и группы сравнения характерно преобладание мембранного окрашивания TLR8 над цитоплазматическим в СЦТ, а при тяжелой ПЭ – преобладание цитоплазматического окрашивания над мембранным ($p < 0.05$).

Экспрессия TLR9 в структурах плаценты при преэклампсии

В исследовании при сравнении ранней и поздней ПЭ получены значимые отличия. При ранней ПЭ окрашивание в структурах плаценты повышено. Отмечено увеличение экспрессии TLR9 в гистологических структурах плаценты при ранней ПЭ по сравнению с поздней ПЭ и группами сравнения (рис. 2) ($p < 0.05$). Изменения в наибольшей мере выражены в СЦТ, синцитиальных узелках, вневорсинчатом цитотрофобласте и децидуальных клетках. При этом мембранное окрашивание СЦТ, СУ, вневорсинчатого трофобласта и децидуальных клеток при ранней ПЭ снижено на фоне повышения цитоплазматического.

При анализе уровня экспрессии TLR9 в зависимости от уровня тяжести ПЭ обнаружено повышенное мембранное и цитоплазматическое окрашивание TLR9 в СЦТ в группе тяжелой ПЭ: мембранное 44 (37; 49), цитоплазматическое 42 (35; 47), в сравнении с группами умеренной ПЭ и неосложненной беременности ($p = 0.02$). В частности, в группе неосложненной беременности мембранное окрашивание СЦТ – 7 (4; 17), цитоплазматическое – 6 (4; 16). Сходная тенденция обнаружена и при оценке мембраны и цитоплазмы в синцитиальных узелках (зонах пролиферации трофобласта): максимальное повышение при тяжелой ПЭ по сравнению с другими группами (мембранное – 45 (30; 60), цитоплазматическое – 43 (40; 58), $p = 0.03$). В клетках вневорсинчатого цитотрофобласта максимальное цитоплазматическое окрашивание отмечено при тяжелой ПЭ – 38 (30; 42), а при умеренной ПЭ – 19 (16; 29), что сопоставимо с неосложненной беременностью – 20 (5; 26). В эндотелии сосудов: при тяжелой ПЭ – 23 (16; 28), при умеренной – 22 (18; 26), что значительно выше ($p = 0.01$) группы сравнения – 5 (3; 10). В децидуальных клетках экспрессия достоверно выше ($p = 0.04$) при тяжелой ПЭ – 25 (18; 29), чем в группах сравнения.

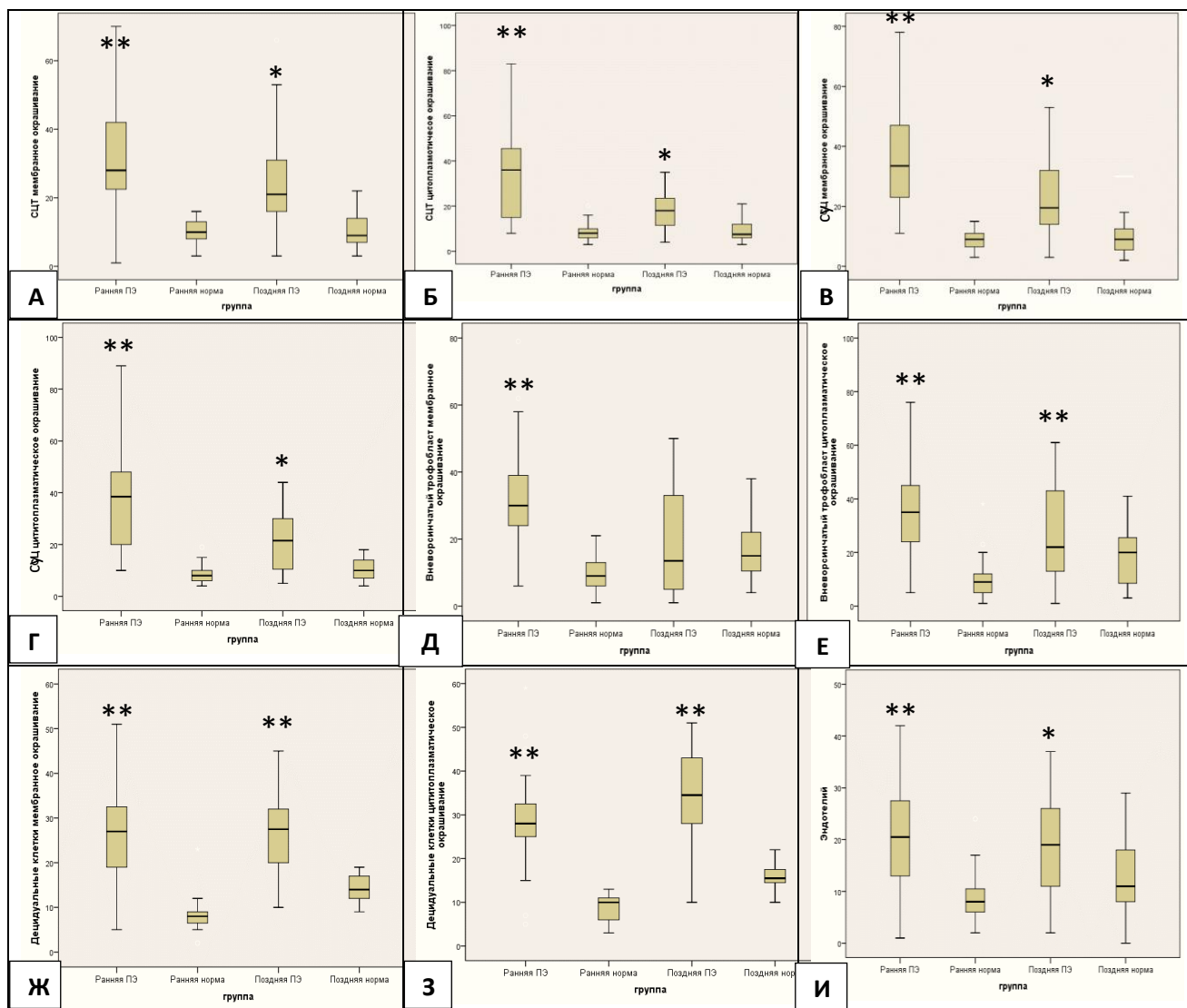


Рисунок 2. Диаграммы экспрессии TLR9 при преэклампсии и в группах сравнения.

А, Б – в синцитиотрофобласте; А – мембранное окрашивание, Б – цитоплазматическое; В, Г – в синцитиальных узелках; В – мембранное окрашивание, Г – цитоплазматическое; Д, Е – во вневорсинчатом трофобласте; Д – мембранное окрашивание; Е – цитоплазматическое;

Ж, З – в децидуальных клетках; Ж – мембранное окрашивание, З – цитоплазматическое; И – в эндотелии сосудов ворсин.

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; ранняя ПЭ отличается от всех групп ($p < 0.01$); поздняя ПЭ отличается от группы сравнения ($p < 0.05$).

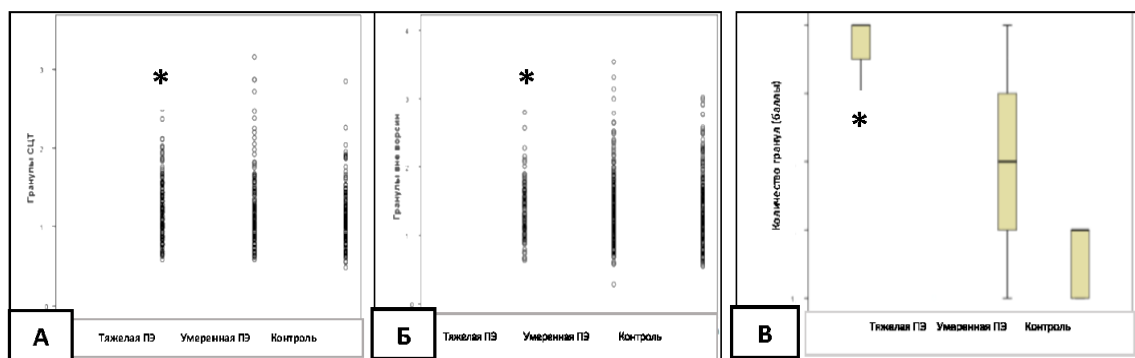


Рисунок 3. Анализ гранулярного типа окрашивания TLR9 в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте; оценка размера гранул в синцитиотрофобласте (А); во вневорсинчатом трофобласте (Б); оценка количества гранул в синцитиотрофобласте (В). *Примечание.* Данные для рис. 2 и 3 приводятся в формате Ме (Q1–Q3), где Ме – медиана, Q1 и Q3 – первый и третий квантили. * – $p < 0.05$.

Кроме того, в цито-, синцитиотрофобласте, во вневорсинчатом трофобласте, а также в цитоплазме макрофагов (клеток Кащенко–Гофбауэра) обнаружены гранулы, окрашенные TLR9. Количество гранул и их размер в СЦТ и во вневорсинчатом трофобласте ассоциированы с тяжестью ПЭ (рис. 3). Гранулы располагаются преимущественно на уровне ядерной мембраны в цито- и СЦТ ворсин, а также в клетках вневорсинчатого трофобласта. Размер гранул в СЦТ при тяжелой ПЭ значимо больше (1.27 ± 0.41), чем при умеренной ПЭ (1.13 ± 0.41) ($p = 0.001$), а также по сравнению с группой неосложненной беременности (1.09 ± 0.30) ($p = 0.001$) (рис. 3А). Размер гранул во вневорсинчатом цитотрофобласте при тяжелой ПЭ – 1.49 ± 0.41 мкм, что значимо больше, чем при умеренной ПЭ, а также в группе неосложненной беременности ($p = 0.001$) (рис. 3Б). В клетках вневорсинчатого цитотрофобласта при физиологической беременности обнаруживается до 20 гранул; при умеренной ПЭ – от 20 до 50 гранул; при тяжелой ПЭ количество гранул достигает 100 в отдельных полях зрения ($p < 0.05$) (рис. 3В). Таким образом, TLR8 и TLR9 показали значимые отличия в ворсинчатом, вневорсинчатом трофобласте, децидуальных клетках, эндотелии сосудов ворсин, в мезенхимальных клетках стромы. TLR9-окрашивание преимущественно цитоплазматическое и гранулярное, TLR8-окрашивание – мембранное и цитоплазматическое. Кроме того, количество и размер TLR9 гранул ассоциировано с тяжестью течения ПЭ.

Экспрессия Tollip, ингибитора TLR-сигнального каскада, в структурах плаценты при преэклампсии

Tollip (Toll-interacting protein) обладает противовоспалительным действием и является ингибитором TLR-сигнального каскада (Bourgeois-Daigneault M.C. et al., 2013; Oguro A. et al., 2011; Zhu L. et al., 2012).

Продукты ИГХ-реакции Tollip определяются в структурах, аналогичных тем, где TLRs имеют цитоплазматическую локализацию (He Y. et al., 2016; Oguro A. et al., 2011). Наибольшие отличия наблюдаются в СЦТ и эндотелии сосудов (табл. 10).

Таблица 10. Иммуногистохимическое цитоплазматическое окрашивание Tollip в СЦТ и в эндотелии промежуточных ворсин

Группа	СЦТ	Эндотелий
Ранняя группа сравнения	8.10 ± 1.18	4.70 ± 0.62
Ранняя ПЭ	7.50 ± 0.59	3.70 ± 0.92
Поздняя ПЭ	8.30 ± 1.54	4.70 ± 0.99
Поздняя группа сравнения	8.70 ± 1.36	4.60 ± 0.46

Примечание. Данные приводятся в формате $M \pm SD$, где М – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

Экспрессия ZBP-1 в структурах плаценты при преэклампсии

Обнаружено повышение цитоплазматического окрашивания ZBP-1 (ДНК-распознающих рецепторов) в структурах плаценты при ранней ПЭ (в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, эндотелии, децидуальных клетках) (табл. 11). Наименьшая экспрессия отмечена в плаценте ранней группы сравнения ($p < 0.05$). Следует особо обратить внимание на снижение мембранного окрашивания в СЦТ при ранней ПЭ тяжелого течения. Данные приведены в таблице 12.

Таблица 11. Цитоплазматическая экспрессия ZBP-1 в различных структурах плаценты в норме и при преэклампсии

Гистологические структуры плаценты	Ранняя ПЭ	Поздняя ПЭ	Ранняя группа сравнения	Поздняя группа сравнения
СЦТ	13* (12; 15.75)	12 (10; 15)	10 (8; 13)	12 (9; 14)
Эндотелий	14* (11; 20.25)	13 (9; 15)	14 (11; 17)	13 (11; 16)
Вневорсинчатый трофобласт	14* (13; 16.5)	15 (9; 18)	10 (7.5; 14)	12 (8; 16)
Децидуальные клетки	20 (16.5; 21.5)	17 (14; 20)	17 (13.75; 20)	17 (13.25; 20.75)

Примечание. Данные представлены в формате Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1, Q3 – первый, третий квартили. Жирным шрифтом выделены достоверные данные, $p < 0.05$.

Таблица 12. Мембранное окрашивание ZBP-1 в синцитиотрофобласте ворсин плаценты и синцитиальных узелках при тяжелой и умеренной ПЭ и в группах сравнения

Группы	СЦТ	СУ
Показатели окрашивания мембраны, $M \pm SD$		
Ранняя группа сравнения (РН)	14.24 ± 3.03	15.13 ± 3.55
Поздняя группа сравнения (ПН)	9.91 ± 1.73	10.52 ± 1.77
Тяжелая преэклампсия (ТПЭ)	11.67 ± 2.24	14.5 ± 1.89
Умеренная преэклампсия (УПЭ)	19.18 ± 4.14	18.8 ± 8.6
Достоверность различий между группами, p		
РН–ПН	0.02	0.031
ТПЭ–УПЭ	0.004	0.207
ПН–УПЭ	0.0006	0.023

Примечание. $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Жирным шрифтом выделены достоверные данные, $p < 0.05$.

Таким образом, исследование показало, что при умеренной ПЭ происходит увеличение уровня мембранного окрашивания СЦТ, но при нарастании тяжести ПЭ ввиду повреждения мембран СЦТ и СУ происходит потеря экспрессии маркера ZBP-1. На основании этого признака можно определить степень тяжести преэклампсии. По результатам исследования оформлен патент на изобретение (Низяева Н.В., патент № RU2641029C1 от 15.01.2018 г.).

Экспрессия RIG-1 в структурах плаценты при преэклампсии

RIG-1, цитоплазматический сенсор противовирусного врожденного иммунитета, распознает 5'-трифосфорилированные одно- и двуцепочечные РНК (Linehan M.M. et al., 2018; Sayed N. et al., 2017). В исследовании показана наибольшая экспрессия RIG-1 в группе неосложненной доношенной беременности в СЦТ в промежуточных, терминальных и стволовых ворсинах плаценты и децидуальных клетках, что значимо выше, чем в других исследуемых группах ($p < 0.01$) (рис. 4 А-В). Значимые отличия также наблюдаются между ранней группой сравнения и поздней ПЭ ($p < 0.01$). В эндотелии капилляров ворсин картина совершенно иная: максимальная экспрессия определяется в группах поздней ПЭ и неосложненной доношенной беременности, по сравнению с ранней группой сравнения и ранней ПЭ ($p < 0.01$) (рис. 4В). В группе ранней ПЭ экспрессия RIG-1 в децидуальных клетках выше, чем в ранней группе сравнения ($p < 0.01$).

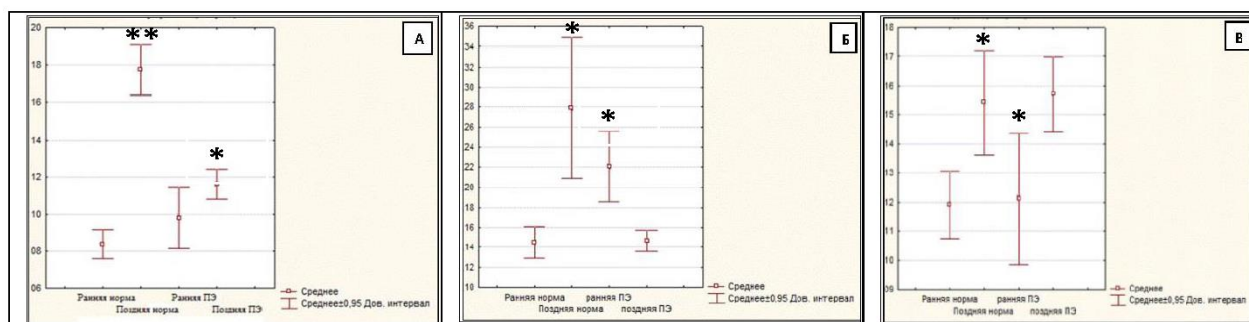


Рисунок 4. Диаграммы экспрессии RIG-1 в структурах плаценты при ранней и поздней преэклампсии.

А – в синцитиотрофобласте, Б – в децидуальных клетках, В – в эндотелии кровеносных сосудов ворсин; * – $p < 0.05$.

Парадоксально, но повышенная экспрессия RIG-1, с одной стороны, приводит к повышению секреции интерферонов и провоспалительных цитокинов на фоне активации каспаз, что запускает апоптоз клеток (Sayed N. et al., 2015), а с другой – способствует активации стволовых клеток, что необходимо при репарации органов и тканей (Linehan M.M. et al., 2018; Sayed N. et al., 2017). Кроме того, нарушение RIG-1-сигналинга также ассоциировано с развитием аутоиммунных реакций (Leung D.W. et al., 2012; Loo Y.M., Gale Jr. M., 2011). Снижение уровня RIG-1 может способствовать нарушению функций и роста плаценты при ПЭ.

Экспрессия NOD-1-рецепторов в ткани плаценты при преэклампсии

NOD-1 (nucleotide-binding oligomerization domain) – цитоплазматические рецепторы, распознающие ДНК бактерий и вирусов и участвующие в антибактериальной и противовирусной защите, также регулирующие апоптоз. При ИГХ-исследовании выявлено выраженное окрашивание структур плаценты со значимым повышением экспрессии

NOD-1 преимущественно в группе ранней ПЭ и ПЭ тяжелого течения, по сравнению с другими группами исследования (табл. 13).

Таблица 13. Анализ экспрессии NOD-1 в структурах плаценты при неосложненной беременности и при преэклампсии

Гистологические структуры плаценты	Ранняя ПЭ	Поздняя ПЭ	Ранняя группа сравнения	Поздняя группа сравнения
СЦТ	31* (28; 36)	27 (21; 33)	28 (24; 35)	29 (22; 33)
Мезенхимальные клетки стромы	23.5* (18; 30)	18 (14; 24)	26 (19; 33)	21.5 (17.75; 26)
Вневорсинчатый цитотрофобласт	26.5* (17.25; 36)	23 (18.5; 27.5)	27* (22.75; 32)	28 (21; 34)
Эндотелий	27.5 (20.75; 32.25)	26 (21; 31)	27* (21; 32)	25 (21; 30)
Децидуальные клетки	39 (30; 46)	31 (22.25; 41.75)	36 (26; 46)	36 (29.5; 44.5)

Примечание. Данные представлены в формате Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1, Q3 – первый, третий квартили; жирным шрифтом выделены достоверные данные, $p < 0.05$.

Таким образом, наиболее высокая цитоплазматическая экспрессия TLRs, NOD, ZBP-1 при тяжелой ПЭ наблюдается в цитотрофобласте, СЦТ, СУ, вневорсинчатом цитотрофобласте, децидуальных клетках. Экспрессия ZBP-1 (DAI) в плаценте и изменения при ПЭ также нами описаны впервые.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ В МАТЕРИНСКОЙ КРОВИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЛОДА КАК ПРЕДИКТОРА РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

(совместно с заведующим лабораторией цитологии, к.б.н. Красным А.М.)

Известно, что во время беременности в биологических жидкостях, включая плазму крови, можно выявить наличие свободной внеклеточной ДНК плода (пДНК) (Biswas K.S., 2016), однако данные об использовании пДНК в качестве прогностического маркера ПЭ, изложенные в различных источниках, противоречивы (Dugoff L. et al., 2016; Seval M.M. et al., 2015).

Дизайн исследования – проспективное когортное исследование на основе анализа образцов плазмы крови 580 женщин, из которых ПЭ была диагностирована в 20 случаях (3.44%), преждевременные роды – в 19 (3.27%). Концентрация пДНК определялась методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-RT) посредством оценки гиперметилированной части гена *RASSF1A*, являющегося специфичным для плаценты. ПЦР-RT проводилась на сроках 11–14, 24–26, 30–32 недель гестации. В исследовании было выявлено, что, по сравнению с неосложненной беременностью, концентрация пДНК в плазме крови матери значимо выше в группе ПЭ на всех сроках начиная с 11–14 недель гестации (табл. 14). При этом доля пДНК при ранней ПЭ на всех сроках превышала долю при поздней ПЭ.

Таблица 14. Концентрация свободной внеклеточной фетальной ДНК при преэклампсии и неосложненной беременности на разных сроках гестации

Сроки гестации (недели)	Группы исследования		Значимость <i>p</i>
	Преэклампсия	Неосложненная беременность	
11–14	89.36 (35.43; 143.29)	28.71 (15.64; 41.72)	0.002
24–26	105.03 (61.52; 148.54)	39.15 (24.92; 53.38)	0.004
30–32	224.81 (56.16; 539.61)	32.62 (16.49; 71.10)	0.04

Примечание. пДНК измерена в ГЭ/мл (геномный эквивалент на миллилитр плазмы); данные приводятся в формате Ме (Q1; Q3), где Ме – медиана, Q1, Q3 – первый и третий квартили.

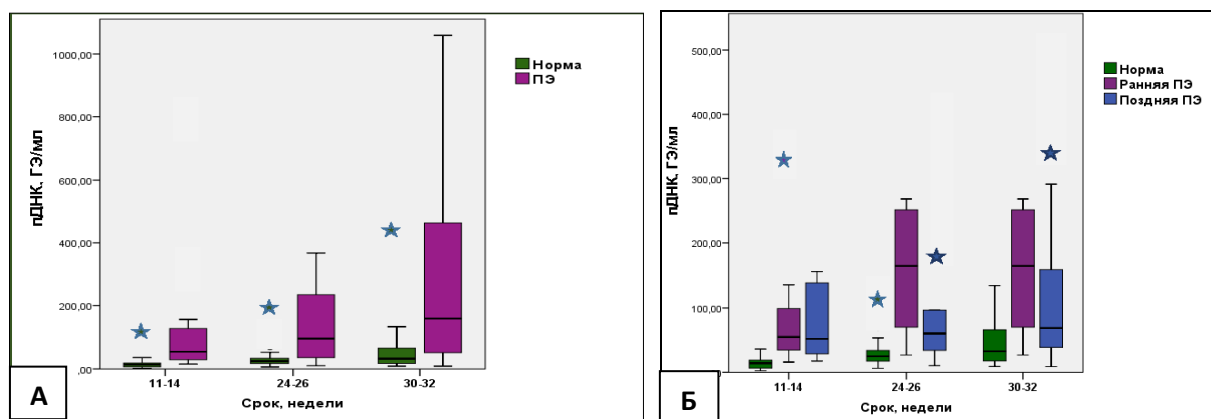


Рисунок 5. А – уровень пДНК в материнской плазме при неосложненной беременности и при преэклампсии на разных сроках гестации. Б – уровень пДНК в материнской плазме при неосложненной беременности, при ранней и поздней ПЭ на разных сроках гестации. Концентрация пДНК измерена в ГЭ/мл. Значимые показатели отмечены звездочками.

На всех сроках гестации при ранней ПЭ уровень пДНК значимо выше (в 6–8 раз), чем при поздней ПЭ и при неосложненной беременности (рис. 5). Кроме того, показано, что при тяжелой ПЭ уровень пДНК значимо выше, по сравнению с умеренной ПЭ (рис. 6), что особенно заметно на сроках 24–26 и 30–32 недель гестации ($p < 0.05$).

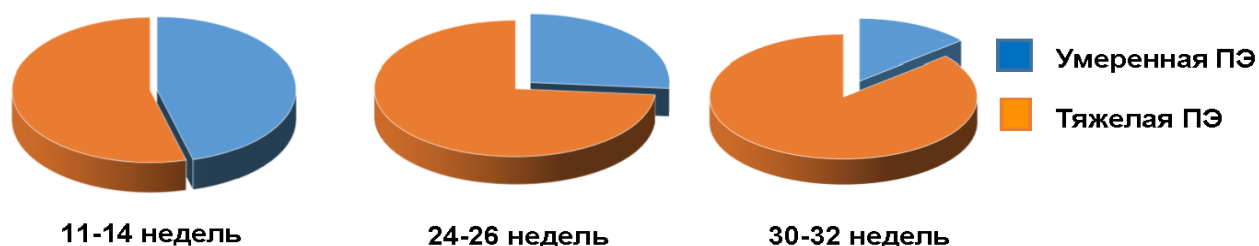


Рисунок 6. Соотношение пДНК в материнской плазме при тяжелой и умеренной преэклампсии на сроках 11–14 (А), 24–26 (Б), 30–32 (В) недель гестации.

Значительное повреждение и слущивание трофобласта с поверхности ворсин, а также выраженные дистрофические изменения при тяжелой ПЭ – причина повышения пДНК (Баев О.Р. и др., 2019; Низяева Н.В. и др., 2019з). Результаты нашего исследования показали, что повышение пДНК – специфический признак преэклампсии, поэтому оно представляет собой полезный диагностический и прогностический маркер ПЭ, начиная с 11 недель беременности, и может стать основой для разработки тест-системы.

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ГЕНЕЗЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ

(совместно с заведующей научно-диагностической лабораторией, д.м.н. Иванец Т.Ю.)

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) – одна из наиболее важных систем организма человека, ответственных за повышение тонуса сосудов и регуляцию артериального давления. Известно, что под влиянием ренина N-концевой фрагмент ангиотензиногена гидролизуется, что приводит к образованию инертного декапептида Ang (1–10) (ангиотензин I). С помощью ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) C-концевой дипептид отщепляется от неактивной молекулы ангиотензина I, и образуется октапептид Ang (1–8) (ангиотензин II), обладающий мощным сосудосуживающим действием (Fyhrquist F. et al., 1995). Под влиянием другого ангиотензин-превращающего фермента АСЕ2 образуется ангиотензин 1–7, который, напротив, имеет выраженный сосудорасширяющий эффект (Gironacci M.M., 2015). Нарушения в РАС могут играть важную роль в генезе ПЭ.

Оценка экспрессии ренина и пептидов ангиотензина в ткани плаценты (иммуногистохимическое исследование)

В гистологических структурах плаценты при ранней и поздней ПЭ было отмечено повышение уровня ренина и пептидов ангиотензина в плаценте, прежде всего в трофобласте и СУ, во вневорсинчатом трофобласте, по сравнению с группой сравнения соответствующих сроков гестации (табл. 15).

Таблица 15. Экспрессия пептидов ангиотензина в структурах плаценты при преэклампсии

	Ранняя ПЭ	Ранняя группа сравнения	Поздняя ПЭ	Поздняя группа сравнения
Синцитиотрофобласт, мембранное окрашивание	51 (36.5–61)	41.5 (28–55)	47 (33–63.25)	46 (38–57.5)
<i>p</i>	0.021		0.86	
Синцитиотрофобласт, цитоплазматическое окрашивание	81 (60.5–96)	54 (41–72.25)	78.5 (46–92.5)	68 (51.5–87)
<i>p</i>	< 0.0001		0.23	
Вневорсинчатый трофобласт, мембранное окрашивание	35.5 (28–46.5)	27 (19–35)	30 (24–40)	37 (26–53)
<i>p</i>	< 0.0001		0.0006	
Вневорсинчатый трофобласт, цитоплазматическое окрашивание	43.5 (30.2–55.2)	27.5 (18–37.5)	37 (28–46)	34 (22–51)
<i>p</i>	< 0.0001		0.71	
Эндотелий цитоплазматическое окрашивание	30 (24–37.75)	33 (27–49)	33 (23.75–42)	31 (22.75–43)
<i>p</i>	0.0025		0.83	
Фибробластоподобные клетки стромы ворсин цитоплазматическое	28 (18.5–37)	34 (25.25–47.5)	23 (16–33)	27.5 (22–36)

окрашивание				
	<i>p</i>	0.0017		0.04

Примечание. Оценка ангиотензина I, II и ангиотензиногена ввиду перекрестного реагирования с антителами производилась суммарно как пептидов ангиотензина (результаты ИГХ-исследования). Данные приводятся в формате Me (Q1–Q3), где Me – медиана, Q1, Q3 – первый и третий квартили, Q1–Q3 – интерквартильный интервал.

Анализ метаболитов РАС (ангиотензина II и ангиотензина 1–7, ренина)

в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа

При анализе зависимости уровня ангиотензинов от степени тяжести ПЭ выявлено, что уровень вазоконстриктора Ang 1–8 в материнской плазме при тяжелой ПЭ значимо выше (24.0 ± 5.0 пг/мл), чем при умеренной ПЭ (15.3 ± 1.2 пг/мл, $p = 0.046$) и при неосложненной доношенной беременности (14.7 ± 1.9 пг/мл; $p = 0.023$). В плазме крови пациенток с тяжелой ПЭ отмечено повышение уровня Ang 1–7 до 424.0 ± 16.6 пг/мл, что выше, чем при умеренной ПЭ (361.1 ± 26.7 пг/мл, $p = 0.051$) и при неосложненной доношенной беременности (390.7 ± 13.86 пг/мл, $p = 0.095$). Повышение уровня Ang 1–7 в плазме крови может быть одним из важных компенсаторно-приспособительных механизмов в случаях тяжелой ПЭ.

При оценке уровня ренина значимых различий в концентрациях ренина не отмечено ($p > 0.05$).

Уровень Ang 1–8 в группе ранней ПЭ – 23.8 ± 5.1 пг/мл, что достоверно выше уровня в ранней группе сравнения – 9.7 ± 1.2 пг/мл ($p < 0.05$). В группе поздней ПЭ и в поздней группе сравнения уровень Ang 1–8 составляет 15.5 ± 1.2 пг/мл и 14.7 ± 1.9 пг/мл соответственно ($p > 0.05$) (рис. 7).

Уровень вазодилататора ангиотензина 1–7 (Ang 1–7) при ранней ПЭ значимо ниже, чем в ранней группе сравнения (379.7 ± 23.0 пг/мл и 771.7 ± 44.2 пг/мл соответственно, $p = 0.0001$), при поздней ПЭ и в поздней группе сравнения концентрация Ang 1–7: 388.3 ± 27.3 пг/мл и 390.7 ± 13.9 пг/мл соответственно ($p > 0.05$) (рис. 7 А, Б). Результаты исследования позволяют рассчитать соотношение уровней Ang 1–7 и Ang 1–8 в группах исследования: при тяжелой ПЭ – 21.8 ± 3.1 , при умеренной – 26.5 ± 4.9 , при неосложненной беременности – 29.4 ± 2.6 , что указывает на неполноценность компенсаторных механизмов в регуляции РАС при тяжелой ПЭ из-за недостаточного повышения уровня Ang 1–7 в ответ на избыточную патологическую продукцию Ang 1–8. Наиболее ярко указанные изменения проявляются при ПЭ тяжелого течения и на сроке до 34 недель гестации.

Таким образом, снижение соотношения Ang 1–7 и Ang 1–8 свидетельствует о высокой предрасположенности беременных к гипертензивным осложнениям (Хлестова Г.В., Низяева Н.В. и др., 2019).

Наряду с этим показана возможность синтеза плацентой ключевых лигандов РАС ренина и ангиотензина с повышением их уровня в структурах плаценты при ПЭ. Если учесть, что тяжелая ПЭ ассоциирована с повреждением плаценты и трофобласта (Низяева Н.В. и др., 2019з), то

становится очевидным, что слущивание и массивное поступление клеток трофобласта в материнский кровоток приводит к изменениям соотношения метаболитов РАС в плазме крови, что способствует повышению артериального давления.

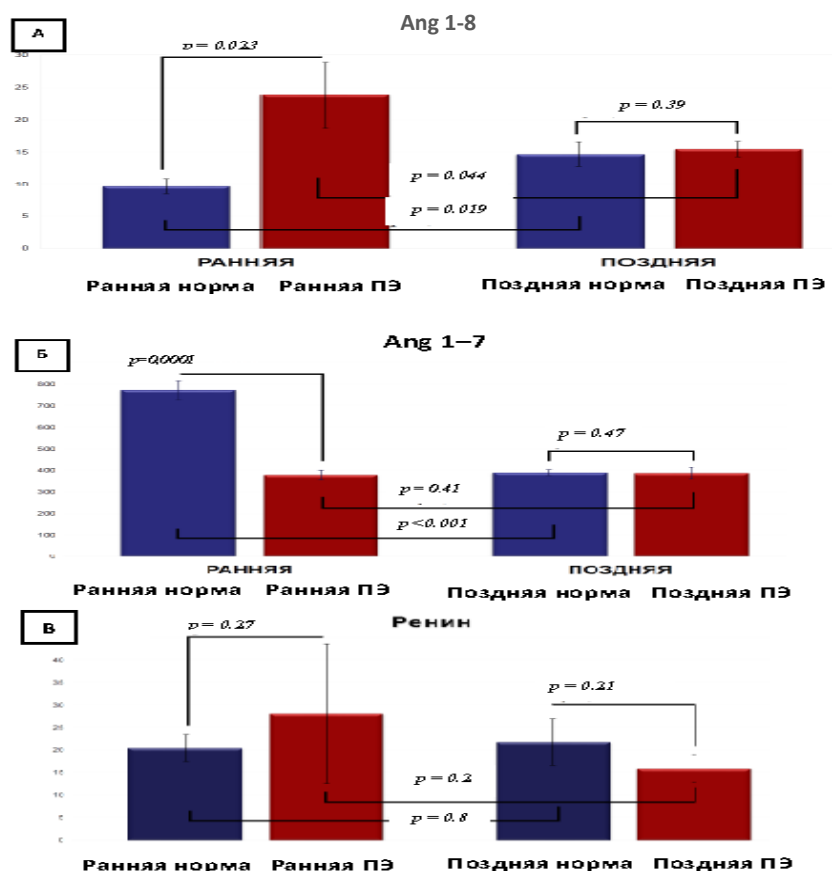


Рисунок 7. Концентрация Ang 1–8 (А), Ang 1–7 (Б), ренина (В) в плазме крови при ранней и поздней преэклампсии и неосложненной беременности.

Представленная работа имеет фундаментальное значение, подчеркивая роль плаценты в развитии гипертензивных состояний как дополнительного источника вазоконстрикторов.

ЗНАЧЕНИЕ SERPINA1 ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

(совместно с заведующей лабораторией протеомики и метаболомики в репродукции, к.б.н. Стародубцевой Н.Л., заведующим отделом системной биологии в репродукции, д.ф.-м.н. Франкевичем В.Е.)

Анализ пептидов SERPINA1 в моче женщин, страдающих гипертензивными расстройствами при беременности

SERPINA1 (α 1-антитрипсин) – это первично экспрессируемый в печени белок плазмы, участвующий в ингибировании сериновых протеаз, в первую очередь нейтрофильной эластазы, также ингибирующий трипсин, химотрипсин и активатор плазминогена (Winkler I.G. et al., 2005). По результатам исследования мочевого остатка методом жидкостной масс-

спектрометрии пептиды SERPINA1 показали значимые отличия. Пептиды SERPINA1 – это фрагменты амилоидоподобного вещества, образованного путем агрегации молекул SERPINA1 (Kononikhin A.S. et al., 2016; Sergeeva V.A. et al., 2020). При частичном разрушении амилоида фрагменты SERPINA1 обнаружены в моче. Пациентки с ПЭ разделены на две группы: с наличием пептидов SERPINA1 в моче (ПЭ_SER+) и без SERPINA1 в моче (ПЭ_SER–). Наиболее выраженные нарушения наблюдаются в группе ПЭ с обнаружением SERPINA1 в моче (табл. 16).

Таблица 16. Клинические особенности пациенток, страдающих преэклампсией, с положительным и отрицательным тестом на определение SERPINA1 в моче

Клинические параметры	ПЭ_SER+ n = 23	ПЭ_SER– n = 21	p
	M ± SD		
Систолическое АД, мм рт. ст.	154.76±10.30	148.52±9.55	0.0099
Диастолическое АД, мм рт. ст.	98.33±8.17	96.52±8.00	0.350
Среднее АД, мм рт. ст.	117.14±8.58	113.86±7.86	0.096
Протеинурия, мг/мл	2.67±1.20	1.44±1.12	0.0064
	n (%)		
Протеинурия, > 3 мг/мл	9 (39.1)	2 (9.5)	0.010
Задержка роста плода	4 (17.4)	5 (23.8)	0.610
Тяжелая ПЭ	17 (74.0)	6 (28.5)	0.002
	Me (IQR)		
Соотношение sFLT/PLGF	130.93 (112.52)	192.52 (100.50)	0.474

Примечание. М – среднее значение, SD – стандартное отклонение; Me – медиана, IQR – интерквартильный интервал; жирным шрифтом выделены значимые различия, $p < 0.05$.

Особенности экспрессии SERPINA1 в структурах плаценты при преэклампсии

При неосложненной беременности ИГХ-исследование (окрашивание первичными антителами к SERPINA1) образцов плаценты показало слабое окрашивание цито- и СЦТ различных типов ворсин плаценты (стволовых, зрелых и незрелых промежуточных, терминальных), также слабое окрашивание было обнаружено в клетках вневорсинчатого трофобласта, децидуальных клетках, СУ, единичных мезенхимальных клетках стромы, плацентарных макрофагах (клетках Кащенко–Гофбауэра) и клетках амниотического эпителия. Плодный фибриноид не показал ИГХ-окрашивания.

Напротив, при ПЭ экспрессия SERPINA1 значимо увеличена в цито- и СЦТ, СУ, вневорсинчатом трофобласте и децидуальных клетках, особенно в группе ПЭ_SER+. В группе ПЭ_SER– в образцах плаценты преобладает мембранное окрашивание в СЦТ, а в группе ПЭ_SER+ в цито- и СЦТ доминирует цитоплазматическое окрашивание, что можно объяснить частичным повреждением СЦТ.

Кроме того, интенсивное окрашивание отмечено в межворсинчатом плодном фибриноиде (Лангханса) и в области децидуальной пластинки (фибриноид Рора и Нитабух). В цитоплазме цито- и СЦТ также присутствовали окрашенные гранулы SERPINA1 как при ПЭ, так и при

неосложненной беременности. Количество гранул и их размер отличались в группах ПЭ_SER+ и ПЭ_SER- (табл. 9).

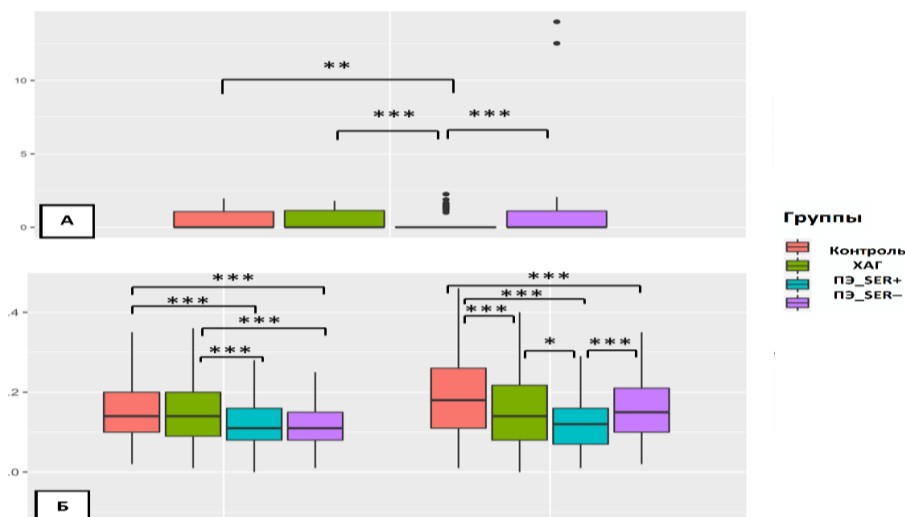


Рисунок 8. Оценка размера гранул SERPINA1 в синцитиотрофобласте при преэклампсии (в мкм).

А – окрашенные гранулы SERPINA1;

Б – сравнительный уровень экспрессии SERPINA1 в мембране и цитоплазме СЦТ.

Результаты представлены по 4 группам: группа неосложненной беременности (контроль), ХАГ (хроническая артериальная гипертензия), ПЭ_SER- (ПЭ с отрицательным тестом SERPINA1 в моче) и ПЭ_SER+ (ПЭ с положительным тестом SERPINA1 в моче);

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Нами показана тенденция ($p = 0.07$) к увеличению количества и размера гранул в СЦТ при ХАГ. Наряду с этим, гранулы отсутствовали в СЦТ при тяжелой ПЭ (ПЭ_SER+), а в ряде наблюдений отмечена потеря мембранного и цитоплазматического окрашивания, что связано с повреждением трофобласта ворсин ($p < 0.001$).

Анализ корреляций экспрессии SERPINA1 в ткани плаценты и уровня SERPINA1 в моче беременных с клинко-лабораторными показателями

В результате исследования установлено, что наличие пептидов SERPINA1 в моче коррелирует практически со всеми значимыми клиническими и лабораторными показателями гипертонических расстройств при беременности. Средняя интенсивность пептидов SERPINA1, выделяемых с мочой, положительно коррелирует с АД ($rs = 0.30$), протеинурией ($rs = 0.30$), маркерами повреждения печени: АЛТ ($rs = 0.33$), АСТ ($rs = 0.37$), ЛДГ ($rs = 0.36$), с соотношением sFLT/PLGF ($rs = 0.33$), временем пребывания новорожденных в отделении интенсивной терапии ($rs = 0.37$), но отрицательно – со скоростью клубочковой фильтрации ($rs = -0.40$).

Аналогичная значимая корреляция ($p < 0.05$) обнаружена и для ИГХ-окрашивания SERPINA1 в мембране и цитоплазме СЦТ с некоторыми показателями, в том числе с систолическим ($rs = -0.54$) и диастолическим ($rs = -0.45$) АД, уровнем протеинурии ($rs = -0.56$), уровнем мочевины ($rs = -$

0.35), с весом ($r_s = 0.45$) и ростом ребенка ($r_s = 0.42$), временем пребывания новорожденных в отделении интенсивной терапии ($r_s = -0.45$). В проведенном исследовании SERPINA1 продемонстрировал высокую специфичность при разделении ПЭ по степени тяжести. В плаценте пептиды SERPINA1 показали повышенную экспрессию, прежде всего в цитоплазме и мембране цито- и СЦТ. При ПЭ умеренного течения (ПЭ_SER-) и ХАГ наблюдалось максимальное окрашивание SERPINA1 в СЦТ, а также определялись окрашенные гранулы ($p < 0.05$). Потеря мембранного и цитоплазматического окрашивания SERPINA1, а также уменьшение количества и размера окрашенных гранул и обнаружение SERPINA1 в моче патогномично для тяжелой ПЭ. С разрушением цито- и СЦТ при тяжелой ПЭ (Nizyaeva N.V. et al., 2019) связывают потерю окрашивания SERPINA1 вплоть до его полного исчезновения в группе ПЭ_SER+. Повреждение и слущивание трофобласта приводит к высвобождению гранул, содержащих SERPINA1, и поступлению их в материнский кровоток, что обуславливает появление пептидов SERPINA1 в моче.

Депозиты плодного фибриноида образуются в очагах повреждения плаценты (Benirschke K. et al., 2012). Защитная функция плодного фибриноида заключается в предотвращении возникновения иммунного конфликта между матерью и плодом (Kim M.J. et al., 2009; Placental and gestational..., 2017). Повышенный синтез SERPINA1 в трофобласте и накопление его в депозитах плодного фибриноида блокируют инвазивный трофобласт, что можно считать ключевым механизмом регулирования степени его инвазии (Starodubtseva N. et al., 2020).

Таким образом, по наличию SERPINA1 в моче ПЭ можно разделить на 2 патогенетических варианта: с более легким (с негативным тестом SERPINA1 в моче) и с более тяжелым (при наличии SERPINA1 в моче) течением, сопровождаемым более высоким артериальным давлением, более высоким процентом сердечно-сосудистой патологии, повышенным уровнем протеинурии, нарушениями в системе свертывания крови, более высоким уровнем повреждения ворсин плаценты и трофобласта. Распределение по группам соответствовало умеренной и тяжелой ПЭ. Выявление пептидов SERPINA1 в моче имеет высокую диагностическую значимость, при этом их обнаружение осуществляется неинвазивными методами и может помочь в выборе акушерской тактики.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ПЛАЦЕНТЕ И В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Согласно литературным данным, наиболее специфичные микроРНК плаценты экспрессируются в цито- и СЦТ (Morales-Prieto D.M. et al., 2012). Считается, что микроРНК, ассоциированные с трофобластом, регулируют эмбриональное развитие и клеточную дифференцировку, кодируются особыми кластерами генов, преимущественно расположенными на 14 (кластер C14MC) и 19 (кластеры C19MC) хромосомах (Morales-Prieto D.M.

et al., 2013). Исследование было выполнено на образцах плаценты и плазмы крови, взятых у пациенток, страдающих ПЭ.

Таблица 17. Количество пациенток в группах исследования

Количество пациенток	Тяжелая ПЭ	Умеренная ПЭ	Группы сравнения
Всего	17	13	26
до 34 недель гестации	14	2	10
после 34 недель гестации	3	11	16

Оценка экспрессии микроРНК в ткани плаценты при ранней и поздней преэклампсии методом CISH

Для подтверждения способности ткани плаценты к синтезу микроРНК и уточнения их локализации в гистологических структурах плаценты было проведено исследование методом хромогенной гибридизации *in situ* (CISH). В ходе исследования произведена оценка экспрессии некоторых микроРНК: -17, -181a, -519a, -146a, -155, что позволило идентифицировать их локализацию в ткани плаценты. Экспрессия оценивалась по наличию коричневого окрашивания в гистологических структурах плаценты. Хотя плацентарные микроРНК-17, -181a, -519a считаются специфичными для трофобласта, они определялись не только в цитоплазме цито- и СЦТ, но и в СУ, в децидуальных клетках и единичных мезенхимальных клетках стромы ворсин плаценты. В этих структурах присутствовала умеренная экспрессия. В эндотелии сосудов имело место также слабое окрашивание. Данные экспрессии приведены в таблице 18.

Таблица 18. Экспрессия микроРНК-17, микроРНК-181a, микроРНК-519a в ворсинах плаценты при преэклампсии и при неосложненной беременности (метод CISH)

микроРНК	микроРНК-17		микроРНК-181a		микроРНК-519a	
Группы	СЦТ	Эндотелий	СЦТ	Эндотелий	СЦТ	Эндотелий
Ранняя ПЭ	7.11±0.61*	2.11±0.22	1.56±0.11*	2.56±0.29	3.56±0.87*	0.769±0.44
Ранняя группа сравнения	5.89±0.484	1.89±0.4	2.67±0.19	2.44±0.22	6.11±1.28	1.0±0.01
Поздняя ПЭ	4.44±1.24	2.44±0.48	2.33±0.10	2.00±0.51*	5.25±0.87	0.957±0.48
Поздняя группа сравнения	5.67±0.10	1.56±0.29	4.22±0.18	3.00±0.33	8.78±2.58	1.732±1.0

Примечание: * – значимые отличия ($p < 0.05$); данные приводятся в формате $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение; оценка в единицах оптической плотности выполнена с помощью программы анализа изображения Nis-Elements.

При оценке экспрессии микроРНК-146a и -155 в ткани плаценты методом CISH при неосложненной беременности окрашивание присутствовало в мембране и цитоплазме, в цито- и СЦТ всех типов ворсин, во вневорсинчатом цитотрофобласте, СУ, децидуальных клетках, в единичных фибробластоподобных клетках стромы стволовых промежуточных ворсин. Наибольшая экспрессия выявлена в СЦТ и СУ,

поэтому полуколичественно экспрессия оценена именно в этих структурах. Окрашивание микроРНК-155 и -146а в эндотелии сосудов ворсин минимально, вплоть до полной его потери, его можно считать незначимым. Данные экспрессии представлены в таблице 19.

Таблица 19. Экспрессия микроРНК-146а и микроРНК-155 в ворсинах плаценты при преэклампсии и при неосложненной беременности (метод CISH)

микроРНК	микроРНК-146а		микроРНК-155	
Гистологические структуры	СУ	СЦТ	СУ	СЦТ
	M ± SD			
Ранняя группа сравнения (РН)	2.3±1.331	1.9±0.462	4.5±1.06	2.5±0.22
Ранняя ПЭ (РПЭ)	2.2±0.747	2±0.544	5.0±0.82	4.5±0.35
Поздняя группа сравнения (ПН)	5.5±1.77	4.4±1.478	8.2±0.97	8.1±0.95
Поздняя ПЭ (ППЭ)	2.3±0.682	2.8±0.479	4.9±0.46	5.1±0.03
	p			
РН–ПН	0.002	0.001	0.022	0.0001
ПН–ППЭ	0.001	0.037	0.005	0.005
РН–РПЭ	0.868	0.724	0.737	0.003
РПЭ–ППЭ	0.81	0.032	0.944	0.204

Примечание. Данные приводятся в формате M ± SD, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение; p – значимость отличий; оценка в единицах оптической плотности выполнена с помощью программы анализа изображения Nis-Elements.

Анализ профиля микроРНК в ткани плаценты и в плазме крови при ранней и поздней преэклампсии (методом ПЦР-RT)

Первоначально микроРНК были проанализированы методом глубокого секвенирования на ограниченном количестве образцов. Для подтверждения этих данных был использован метод количественной ПЦР-RT, и проанализированы образцы плаценты и плазмы крови. ПЦР-анализ позволил отметить значимое снижение экспрессии выбранных 6 микроРНК: -532-5p, -423-5p, -127-3p, -376a-5p, -539-5p, -519a-3p в ткани плаценты как при ранней, так и при поздней ПЭ ($p < 0.001$). Повышение уровня микроРНК-423-5p в плазме крови беременных отмечено при ранней ПЭ. Для оценки геномишеней изучаемых микроРНК проведен анализ баз данных (diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/, <http://www.microna.gr/miRPathv2>, <https://www.genecards.org>, www.mirbase.org, www.microna.gr/miRPathv2, www.mirbase.org) (табл.20).

Таблица 20. Экспрессия микроРНК в ткани плаценты при ранней и поздней преэклампсии и при неосложненной беременности (определение методом ПЦР-RT)

микроРНК	Ранняя ПЭ	Ранняя группа сравнения	Поздняя ПЭ	Поздняя группа сравнения
микроРНК-532-5p	7.61 (7.57–7.66)	9.38** (9.0–9.87)	8.15 (7.9–8.40)	9.48** (9.12–10.19)
микроРНК-423-5p	4.04 ^{##} (3.40–4.189)	9.38** (9.0–9.87)	4.33 (4.13–4.54)	4.42 (4.23–4.62)
микроРНК-127-3p	5.28 (5.13–5.44)	6.49** (6.12–6.85)	5.6 (5.27–5.93)	6.31* (6.14–6.48)

микроРНК-376а-5р	11.32 (11.11–11.53)	12.8** (12.28–13.32)	11.84 (11.52–12.16)	12.50** (12.16–12.84)
микроРНК-539-5р	9.72 (9.3– 10.19)	11.16** (10.72–11.6)	9.59 (9.27–9.92)	11.27** (10.95–11.59)
микроРНК-519-3р	0.92## (0.67–1.42)	1.51** (1.056–1.97)	0.97## (0.68–1.27)	1.30** (1.14–1.46)

Примечание. ## – значимое повышение отмечено и в плазме крови; * – значимые изменения ($p < 0.05$); ** – наиболее значимые изменения ($p < 0.001$); данные приводятся в формате Me (Q1–Q3), где Me – медиана, Q1–Q3 – межквартильный интервал.

В процессе исследования различными методами (CISH, глубокого секвенирования с подтверждением ПЦР-RT) изучены микроРНК в ткани плаценты и плазме крови. В результате исследования установлено, что в плаценте специфические плацентарные микроРНК не только синтезируются в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, но и продуцируются СУ, мезенхимальными клетками стромы, децидуальными клетками. Наибольшая их экспрессия отмечена в трофобласте.

При ранней и поздней ПЭ экспрессия ряда микроРНК имеет сходный профиль, что, вероятно, показывает, что для разных вариантов ПЭ характерны общие патогенетические пути заболевания. При ПЭ основное действие анализируемых микроРНК направлено на избирательную модуляцию пролиферативной активности клеток, адгезии, инвазии, ангиогенеза и на регуляцию воспалительного ответа, а также связано с активацией стволовых клеток. МикроРНК, показавшие наибольшие отличия, участвуют в регуляции PTEN/PI3K/Akt- и Wnt/ β -catenin-, а также toll-like-сигнальных путей.

Таким образом, нами описаны значимые снижения уровня микроРНК-532-5р, -423-5р, -127-3р, -376а-5р, -539-5р, -519а-3р в ткани плаценты при ранней и при поздней ПЭ. При этом значимое повышение в плазме крови показала микроРНК-423-5р.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного комплексного клинικο-морфологического и молекулярно-генетического изучения плаценты и оценки концентрации ряда молекул в биологических жидкостях (плазма крови, моча беременных) были установлены новые механизмы патогенеза ПЭ. В работе особо подчеркнута роль плаценты как основного «модератора» беременности: помимо основной функции газообмена между матерью и плодом, она осуществляет секреторную и эндокринную функции. При этом СЦТ представляет собой депо, содержащее большое количество гормоноподобных веществ, факторов роста, микроРНК, а также вазоактивных веществ и молекул, связанных с регуляцией артериального давления, которые, поступая в кровоток матери, способствуют поддержанию физиологического течения беременности.

Нарушение соотношения Ang 1–8, обладающего вазоконстрикторным эффектом, и вазодилатирующего Ang 1–7 в плазме крови отражает

нарушения в РАС, отвечающей за регуляцию артериального давления. В настоящей работе также показана роль плаценты в синтезе лигандов РАС, что имеет фундаментальное значение для понимания роли плаценты в развитии гипертензивных расстройств при беременности.

Ингибитор протеаз SERPINA1 обладает способностью к образованию супрамолекулярных структур (амилоида). Выявление в моче беременных при тяжелой ПЭ фрагментов SERPINA1 отражает специфические нарушения процессинга белка при ПЭ. На фоне этого повышенный синтез SERPINA1 в трофобласте при ПЭ и накопление его в депозитах плодного фибриноида блокирует инвазивный трофобласт, что является одним из важных механизмов регулирования степени его инвазии.

Значимое повреждение мембран и сращивание СЦТ ведет к резкому нарушению гемоплацентарного барьера и поступлению DAMPs, в том числе и поврежденной ДНК, в кровоток матери, которые при связывании с ПРР, в том числе и с ДНК-распознающими рецепторами, становятся триггером системного воспалительного ответа и эндотелиальной дисфункции. Это опосредует развитие полиорганной недостаточности и манифестацию симптомов ПЭ. Повышение уровня пДНК до клинической манифестации (начиная с 11 недель гестации) свидетельствует о том, что неполноценность трофобласта и повреждение структур плаценты являются ведущими в генезе ПЭ. Кроме того, нарушения регуляции тонуса сосудов, обусловленные уменьшением количества Тц, и замещение их клетками с фибробластической дифференцировкой также способствуют усилению гипоксии плаценты. Тц можно рассматривать в качестве своеобразной ниши, или зоны, для регенерации и роста ворсины, для закладки новых сосудов, поэтому их повреждение и фиброзирование на более ранних сроках гестации приводит к более тяжелому течению ПЭ.

В процессе исследования отмечены сходные изменения в плаценте при ранней и поздней ПЭ – это свидетельствует о вовлечении общих патогенетических и сигнальных путей в развитие заболевания, что подтверждает и сходный профиль микроРНК. Ранняя ПЭ имеет обычно более тяжелое течение по сравнению с поздней, что объясняется более ранней манифестацией заболевания, незрелостью механизмов адаптации до 34 недель гестации, степенью повреждения гистологических структур плаценты, прежде всего СЦТ, а также уровнем фиброзирования стромы ворсин. Патогенез ПЭ отражен на рисунке 9.



Рисунок 9. Схема патогенеза преэклампсии.

В результате исследования были разработаны методы диагностики и прогнозирования течения и исхода беременности до манифестации клинических проявлений, что будет способствовать повышению качества лечения, разработке принципов и методов таргетной терапии, направленной на улучшение регенераторных свойств трофобласта, сохранение гемоплацентарного барьера и предотвращение поступления фрагментов трофобласта в кровоток матери, а также персонализированному подходу к назначению терапии.

Выполненная работа открывает перспективное направление для дальнейших исследований, направленных на изучение морфологических особенностей плаценты, молекулярных и иммунных механизмов при патологии беременности и при ПЭ, на поиск новых маркеров и на создание эффективных диагностических тестов при гипертензивных расстройствах во время беременности.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелая преэклампсия ассоциирована с выраженным истощением компенсаторных механизмов плаценты, проявляющимся повреждением и слущиванием синцитиотрофобласта с поверхности ворсины (от 25 до 50% от периметра ворсины), повышением количества депозитов плодного фибриноида, что опосредует формирование афункциональных зон, приводя к уменьшению межворсинчатого пространства, и характеризуется развитием фиброза стромы ворсин и неполноценного ангиогенеза, более

высоким процентом инфарктов ворсинчатого дерева (с поражением более 3 из 10 полей зрения) на фоне снижения количества синцитиальных узелков. Указанные морфофункциональные изменения являются проявлениями ишемии ткани плаценты и отражают сниженную способность плаценты к регенерации, что лежит в основе гипотрофических изменений не только плаценты, но и плода.

2. Для умеренной преэклампсии свойственны морфологические изменения плаценты, которые можно отнести к проявлениям компенсации в виде гиперкапилляризации терминальных ворсин, увеличения количества синцитиальных узелков, повышенного количества вакуолей в цитоплазме синцитиотрофобласта, при этом масса плаценты сопоставима с нормальной.
3. Ранняя и поздняя преэклампсия могут рассматриваться как два клинических варианта осложнения беременности с различной клинико-анамнестической картиной, имеющих разные исходы, влияние на течение беременности и состояние плода. Ранняя преэклампсия имеет обычно более тяжелое течение по сравнению с поздней, что обусловлено более ранней манифестацией заболевания, незрелостью механизмов адаптации до 34 недель гестации, степенью повреждения гистологических структур плаценты, прежде всего синцитиотрофобласта, а также уровнем фиброобразования стромы ворсин. Свободная внеклеточная фетальная ДНК, являясь отражением степени повреждения ворсинчатого дерева, значительно повышена при ранней преэклампсии, по сравнению с поздней преэклампсией.
4. На основании данных электронной микроскопии и иммуногистохимии в плаценте выявлена гетерогенная популяция телоцитов, отличающихся локализацией, иммуногистохимическими и ультраструктурными характеристиками. Наиболее важным признаком в оценке развития ворсинчатого дерева при преэклампсии является снижение количества телоцитов и появление клеток с ультраструктурными признаками фибробластов и фиброцитов (на основании увеличения объема цитоплазмы клеток, утолщения их отростков, увеличения количества цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума). При преэклампсии до 34 недель изменения касаются преимущественно телоцитов стромы промежуточных ворсин, что ассоциировано со сниженным ангиогенезом и фиброзом, с присутствием депозитов коллагена под базальной мембраной и в строме ворсин, обуславливая утолщение гемоплацентарного барьера и вызывая ухудшение газообмена в системе мать–плацента–плод. При поздней преэклампсии нарушения преимущественно затрагивают телоциты, расположенные в стенке сосудов стволовых ворсин (присутствие в цитоплазме гранул гликогена, липидных капель), что ведет к нарушению регуляции сосудистого тонуса. ТМЕМ16а рекомендовано использовать в качестве маркера для идентификации телоцитов.

5. Одной из причин развития гипертензивных состояний при беременности является повышенный синтез метаболитов ренин-ангиотензиновой системы структурами плаценты. Разрушение трофобласта при преэклампсии и поступление метаболитов ренин-ангиотензиновой системы в материнский кровоток проявляется повышением уровня ангиотензина II и снижением уровня ангиотензина 1–7 в плазме крови.
6. При ранней преэклампсии и преэклампсии тяжелого течения в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте, децидуальных клетках отмечены нарушения экспрессии ДНК-распознающих рецепторов (ZBP-1, TLR8, TLR9), характеризующиеся повышением цитоплазматического окрашивания и снижением мембранного. Кроме того, в ворсинчатом и вневорсинчатом трофобласте для TLR9 обнаружен гранулярный тип окрашивания, количество и размер окрашенных гранул были ассоциированы с тяжестью преэклампсии.
7. Снижение экспрессии в ткани плаценты микроРНК-127-3p, -376a-5p, -423-5p, -519-3p, -532-5p, -539-5p, -181, -let-7e-5p, -let-7c-5p при преэклампсии подтверждает нарушение регуляции воспалительного ответа, апоптоза и пролиферации. Кроме того, было установлено, что способностью к синтезу микроРНК обладает не только цито- и синцитиотрофобласт, но и вневорсинчатый трофобласт, децидуальные клетки, а также мезенхимальные клетки стромы.
8. По наличию SERPINA1 в моче преэклампсию можно разделить на 2 патогенетических варианта: более благоприятный (с негативным тестом SERPINA1 в моче) и менее благоприятный (с обнаружением SERPINA1 в моче). Пациентки с положительным тестом SERPINA1 в моче отличались более тяжелым течением заболевания (высоким артериальным давлением, повышенным уровнем протеинурии, нарушениями в системе свертывания крови, а также более длительным периодом выхаживания новорожденных).
9. Умеренная преэклампсия и хроническая артериальная гипертензия характеризовались повышением трех типов окрашивания (мембранного, цитоплазматического, гранулярного) SERPINA1 в синцитиотрофобласте ворсин плаценты. Потеря мембранного и гранулярного окрашивания SERPINA1 в синцитиотрофобласте ассоциирована с появлением SERPINA1 в моче и переходом преэклампсии от стадии компенсации к стадии декомпенсации, что связано с разрушением мембран синцитиотрофобласта. Накопление SERPINA1 при преэклампсии в депозитах плодного фибриноида с периворсинчатым расположением и в области децидуальной пластинки является дополнительным фактором сниженной инвазии трофобласта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установлены морфологические изменения плаценты в зависимости от начала манифестации клинических проявлений и степени тяжести преэклампсии, которые целесообразно использовать для врачей-патологоанатомов в практической работе.

2. Появление пептидов SERPINA1 в моче (чувствительность 52%, специфичность 100%) ассоциировано с исчезновением иммуногистохимического окрашивания SERPINA1 в синцитиотрофобласте ворсин плаценты, что позволяет выявлять пациенток с наиболее тяжелым течением заболевания.

3. Снижение соотношения вазодилатора ангиотензина (1–7) и вазоконстриктора ангиотензина II до 25 и менее, выявленное с помощью иммуноферментного анализа в плазме крови на сроках до 34 недель гестации, целесообразно использовать как показатель тяжелой преэклампсии.

4. Определение уровня фетальной ДНК в плазме крови матери до развития манифестации клинических симптомов преэклампсии, начиная с 11 недель беременности, является основой для создания диагностического и прогностического теста преэклампсии.

5. МикроРНК-423-5p значимо повышается в материнской плазме при преэклампсии на сроках до 34 недель гестации.

Возможные области применения и формы внедрения

Полученные результаты исследования представляют интерес для патологической анатомии, акушерства и гинекологии, молекулярной биологии, клинической лабораторной диагностики, неонатологии.

Экономический эффект от внедрения будет определяться повышением качества диагностики ПЭ и прогнозирования заболевания до манифестации клинических проявлений, что позволит улучшить результаты лечения пациенток. Раскрытие механизмов патогенеза ПЭ будет способствовать в дальнейшем разработке принципов и методов таргетной терапии, направленной на улучшение регенераторных свойств трофобласта, на сохранение гемоплацентарного барьера и предотвращение поступления фрагментов трофобласта в кровотоки матери.

Данные, изложенные в диссертации, могут быть использованы для преподавания студентам и курсантам высших учебных заведений, на кафедрах по специальностям патологическая анатомия, гистология, эмбриология, акушерство и гинекология. Результаты научных исследований Низяевой Н.В. используются в процессе обучения ординаторов кафедры неонатологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, а также при обучении студентов 3 курсов в курсе патологической анатомии в главе «Болезни женских половых органов».

Патология беременности и родов» на кафедре патологической анатомии и клинической патологической анатомии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты научных исследований Низяевой Н.В. внедрены в практику работы патологоанатомических отделений ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница» Департамента здравоохранения г. Москвы, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова» Департамента здравоохранения г. Москвы и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭР – агранулярный эндоплазматический ретикулум (гладкий)
гЭПР – гранулярный эндоплазматический ретикулум (шероховатый)
ИГХ – иммуногистохимия, иммуногистохимический
Мембр. – мембранное
ПН – поздняя норма (группа сравнения после 34 недель гестации) для поздней ПЭ
ПРР – паттерн-распознающие рецепторы
ППЭ – поздняя преэклампсия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭ – преэклампсия
РАС – ренин-ангиотензиновая система
РН – ранняя норма (группа сравнения до 34 недель гестации) для ранней ПЭ
РПЭ – ранняя преэклампсия
СЦТ – синцитиотрофобласт
Тц – телоциты
ХАГ – хроническая артериальная гипертензия
Цит – цитоплазматическое
Энд. – эндотелий
ACE (angiotensin-converting enzyme) – ангиотензин-превращающий фермент
CISH (chromogenic *in situ* hybridization) – метод гибридизации *in situ* с хромогеном
DAMPs (damage-associated molecular patterns) – молекулы, связанные с повреждением
NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) – нуклеотид-связывающий домен олигомеризации
RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1) – индуцируемый ретиноевой кислотой ген 1
RT (real time) – в реальном времени
TLRs (Toll-like receptors) – толл-подобные рецепторы

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

НИЗЯЕВОЙ НАТАЛЬИ ВИКТОРОВНЫ

1. Низяева, Н.В. Роль дендритных клеток и паттерн-распознающих рецепторов в развитии патологии беременности / Н.В. Низяева и др. // Успехи современной биологии. – 2014а. – Т. 134. – № 6. – С. 563–572.
2. Низяева, Н.В. Методические основы изучения ткани плаценты и оптимизация режимов предподготовки материала / Н.В. Низяева и др. // Акушерство и гинекология. – 2014б. – № 8. – С. 10–18.
3. Низяева, Н.В. Интерстициальные пейсмейкерные клетки / Н.В. Низяева и др. // Вестник РАМН. – 2014в. – № 7–8. – С. 17–24.
4. Низяева, Н.В. Особенности экспрессии TLR4 в структурных элементах плаценты при преэклампсии / Г.В. Куликова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015а. – Т. 160. – № 11. – С. 676–679.
5. Низяева, Н.В. МикроРНК как важные диагностические предвестники развития акушерской патологии / Н.В. Низяева и др. // Вестник РАМН. – 2015б. – Т. 70. – № 4. – С. 484–492.
6. Низяева, Н.В. Идентификация ассоциированных с преэклампсией микроРНК методом глубокого секвенирования и количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени / А.В. Тимофеева и др. // Акушерство и гинекология. – 2016а. – № 8. – С. 60–70.
7. Низяева, Н.В. Роль инфекционно-воспалительного фактора в развитии иммунологической толерантности в генезе преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // Успехи современной биологии. – 2016б. – Т. 136. – С. 596–602.
8. Низяева, Н.В. Соматический тканевый хромосомный мозаицизм у монозиготной тройни в сочетании с ранней преэклампсией / Н.В. Зарецкая и др. // Акушерство и гинекология. – 2016в. – № 7. – С. 111–118.
9. Низяева, Н.В. Ультраструктурные особенности телоцитов плаценты / Н.В. Низяева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016г. – № 11. – С. 653–659.
10. Nizyaeva, N.V. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia / G.T. Sukhikh et al. // Placenta. – 2016д. – Vol. 43. – № 7. – P. 69–76.
11. Низяева, Н.В. Условия получения образцов ткани плаценты для культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / Н.В. Низяева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016е. – Т. 162. – № 10. – С. 500–506.
12. Nizyaeva, N.V. Specific features of TLR4 expression in structural elements of placenta in patients with preeclampsia / G.V. Kulikova et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016ж. – Vol. 160 (5). – P. 718–721.
13. Nizyaeva, N.V. The role of microRNA in regulation of the body's immune responses / N.V. Nizyaeva et al. // Biology bulletin reviews. – 2016з. – Vol. 6. – № 6. – P. 473–482.
14. Низяева, Н.В. Морфологические особенности мезенхимальных клеток стромы ворсин хориона / Н.В. Низяева и др. // Вестник РАМН. – 2017а. – Т. 72. – № 1. – С. 76–83.
15. Низяева, Н.В. Иммуногистохимические и ультраструктурные особенности телоцитов плаценты при преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // Гены и клетки – 2017б. – Т. 12. – № 3. – С. 176–177.
16. Низяева, Н.В. Экспрессия микроРНК-146а и микроРНК-155 в ворсинах плаценты при ранней и поздней преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017в. – Т. 163. – № 3. – С. 381–387.
17. Низяева, Н.В. Экспрессия TLR4 и ингибитора TOLLIP в плаценте при ранней и поздней преэклампсии / Г.В. Куликова и др. // Гены и клетки. – 2017г. – Т. 12. – № 3. – С. 142–143.
18. Nizyaeva, N.V. DAI-1 receptor expression in placenta in early- and late-onset preeclampsia / N.V. Nizyaeva et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017д. – Vol. 164. – № 1. – P. 109–114.
19. Nizyaeva, N.V. Dynamics of renin, angiotensin II, and angiotensin (1–7) during pregnancy and predisposition to hypertension-associated complications / G.V. Khlestova et al. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018а. – Vol. 165 (4). – P. 438–439.

20. **Nizyaeva, N.V.** Change in oncomicroRNA expression in the placenta during preeclampsia / N.V. Nizyaeva et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018б. – Vol. 165 (6). – P. 793–797.
21. **Низяева, Н.В.** Особенности экспрессии TLR4 и ингибитора TLR-каскада TOLLIP в плаценте при ранней и поздней преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2018в. – Т. 166. – № 10. – С. 507–511.
22. **Nizyaeva, N.V.** Ultrastructural and immunohistochemical features of telocytes in placental villi in preeclampsia / N.V. Nizyaeva et al. // *Scientific Reports*. – 2018г. – Vol. 8 (1). – P. 3453.
23. **Низяева, Н.В.** Особенности экспрессии TLR8 в ткани плаценты при преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2019а. – №4. – Приложение 4. – С. 49.
24. **Низяева, Н.В.** Повышение экспрессии TLR8 в ткани плаценты при преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019б. – Т. 168. – № 9. – С. 371–375.
25. **Низяева, Н.В.** RIG-1, молекула, способствующая активации стволовых клеток, снижена в плаценте при преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2019в. – №4. – Приложение 4. – С. 50.
26. **Низяева, Н.В.** Динамика изменений ренина, ангиотензина (1–7) и ангиотензина II при тяжелой и умеренной преэклампсии / Г.В. Хлестова и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2019г. – № 1. – С. 62–66.
27. **Низяева, Н.В.** Особенности экспрессии RIG-1 в ворсинах плаценты при преэклампсии / Н.В. Низяева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019д. – Т. 167. – № 6. – С. 752–756.
28. **Низяева, Н.В.** Роль ренин-ангиотензиновой системы при гипертензивных состояниях при беременности / Г.В. Хлестова и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2019е. – №4. – Приложение 4. – С. 93.
29. **Низяева, Н.В.** Содержание внеклеточной ДНК плода в материнской крови и экспрессия ДНК-распознающих ZBP-1 рецепторов в структурах плаценты при преэклампсии и преждевременных родах / О.Р. Баев и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2019ж. – № 3. – С. 179–184.
30. **Низяева, Н.В.** Ультраструктурные и иммуногистохимические особенности плаценты при преэклампсии в сочетании с задержкой роста плода / Н.В. Низяева и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2019з. – №11. – С. 97–106.
31. **Nizyaeva, N.** SERPINA1 peptides in urine as a potential marker of preeclampsia severity / N. Starodubtseva et al. // *International Journal Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21 (3). – P. e 914.
32. **Низяева, Н.В.** Особенности экспрессии TLR9 в плаценте при преэклампсии и задержке роста плода / Н.В. Низяева и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2021. – №1. – С. 60–70.

ПАТЕНТЫ

1. Баев О.Р., Иванец Т.Ю., **Низяева Н.В.**, Романов А.Ю., Хлестова Г.В., Щеголев А.И. Способ диагностики преэклампсии на сроках гестации до 34 недель по оценке уровней вазоконстриктора ANG (1–8) и вазодилатора ANG (1-7) // Патент № RU2663456C1 от 06.08.2018 г. (заявка 2017130534 от 29.08.2017).
2. **Низяева Н.В.**, Куликова Г.В., Наговицына М.Н., Баев О.Р., Хлестова Г.В., Щеголев А.И. Способ диагностики тяжести преэклампсии на основании оценки экспрессии ДНК-распознающих рецепторов DAI-1 в ткани плаценты // Патент № RU2641029C1 от 15.01.2018 г. (заявка 2017111609 от 06.04.2017).