

¹Беженарь В.Ф., ¹Павлова Н.Г., ¹Большакова М.В.,
²Пастушенков В.Л., ³Карев В.Е.

Экспрессия гипоксия-индуцируемого фактора (HIF-1- α) в плацентах при хронической плацентарной недостаточности в конце беременности

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П.Павлова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, ² НПО «Фарм-ТРИСАН», Санкт-Петербург, ³ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург

Bezhenar V.F., Pavlova N.G., Bolshakova M.V., Pastushenkov V.L., Karev V.E.

Expression of hypoxia-induced factor (HIF-1- α) in placentas with chronic placental insufficiency at the end of pregnancy

Резюме

В статье представлены данные об экспрессии гипоксия-индуцируемого фактора (HIF-1- α) в 20 плацентах, полученных после операции кесарева сечения, проведенной при доношенной беременности. Критериями включения женщин в основную группу (n=9) явились доношенная беременность, повышенное сопротивление кровотоку только в маточных артериях по данным доплерометрии, задержка роста плода по данным УЗ-фетометрии, сомнительный или патологический тип кривой по данным наружной кардиотокографии (КТГ), отсутствие сократительной деятельности матки и тяжелой экстрагенитальной патологии. Критерии включения в группу сравнения (n=11) - доношенная беременность, отсутствие нарушений плацентарного кровотока по данным доплерометрии, нормальные размеры плода по данным УЗ-фетометрии, нормальный тип КТГ, акушерские или экстрагенитальные показания к проведению операции кесарева сечения в плановом порядке. Экспрессию HIF-1- α определяли в парацентральной части плацент иммуногистохимическим методом с помощью набора кроличьих моноклональных антител PTE-HIF1A-P402-1 (RayBiotech, США). Результаты показали, что в плацентах пациенток основной группы наблюдалась более высокая экспрессия HIF-1- α , чем таковая в плацентах женщин группы сравнения (20,0 \pm 4,8 и 6,8 \pm 2,8% соответственно; p<0,05)

Ключевые слова: гипоксия-индуцируемый фактор (HIF-1- α), плацентарная недостаточность, задержка роста плода

Для цитирования: Беженарь В.Ф., Павлова Н.Г., Большакова М.В., Пастушенков В.Л., Карев В.Е.

Экспрессия гипоксия-индуцируемого фактора (HIF-1- α) в плацентах при хронической плацентарной недостаточности в конце беременности, Уральский медицинский журнал, №05 (188) 2020, с. 141 - 145, DOI 10.25694/URMJ.2020.05.29

Summary

The article presents data on the expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1- α) in 20 placentas obtained after cesarean section performed during full-term pregnancy. Criteria for including women in the main group (n = 9) were full-term pregnancy, increased blood flow resistance only in the uterine arteries according to dopplerometry, fetal growth retardation according to ultrasound fetometry, a dubious or pathological curve type according to external cardiotocography, the absence of contractile uterine activity and severe extragenital pathology. Criteria for inclusion in the comparison group (n = 11) are full-term pregnancy, absence of placental blood flow disturbances according to Dopplerometry data, normal fetal size according to ultrasound fetometry, normal cardiotocography type, obstetric or extragenital indications for cesarean section in a planned manner. HIF-1- α expression was determined in the paracentral part of the placenta by the immunohistochemical method using a rabbit monoclonal antibody kit PTE-HIF1A-P402-1 (RayBiotech, USA). The results showed that in the placentas of the patients of the main group there was a higher expression of HIF-1- α than that in the placentas of women in the comparison group (20.0 \pm 4.8 and 6.8 \pm 2.8%, respectively; p<0.05)

Keywords: hypoxia-inducible factor (HIF-1- α), placental insufficiency, intrauterine growth restriction

For citation: Bezhenar V.F., Pavlova N.G., Bolshakova M.V., Pastushenkov V.L., Karev V.E., Expression of hypoxia-induced factor (HIF-1- α) in placentas with chronic placental insufficiency at the end of pregnancy, Ural Medical Journal, No. 05 (188) 2020, p. 141 - 145, DOI 10.25694/URMJ.2020.05.29

Введение

Известно, что при беременности, осложненной плацентарной дисфункцией, может наблюдаться задержка роста и развития плода/новорожденного. В РФ частота рождения таких новорожденных составляет 67,4 на 1000 [1]. Уменьшение поступления кислорода и питательных веществ к плоду, часто имеющему задержку роста, приводит к нарушению его функционального состояния. При хронических расстройствах плацентарной гемодинамики задержка роста и развития может сопровождаться нарушением созревания центральной нервной, выделительной, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и др. систем плода [2,3,4].

В последние десятилетия многочисленные исследования посвящены разработке мер профилактики и своевременной диагностики перинатальной гипоксии. В клинической практике у беременных и рожениц принято определять качественные и количественные маркеры хронической и острой гипоксии плода, анализ которых проводят неинвазивными и инвазивными методами. Однако, возможности мониторинга функционального состояния плода этими методами ограничена. Так, с одной стороны, у беременных практически отсутствует возможность получения для этих целей плодового материала. С другой стороны, в родах, для его получения требуется ряд условий: достаточное раскрытие маточного зева, отсутствие плодных оболочек и, для получения крови, головное предлежание плода.

Основными методами антенатальной оценки функционального состояния плода являются непрямая кардиотокография (КТГ) и доплерометрия в магистральных сосудах функциональной системы мать-плацента-плод. При этом, по данным литературы, непрямая КТГ, как основной скрининговый метод диагностики функционального состояния плода, характеризуется высокой чувствительностью (до 100%) и низкой специфичностью [5], что приводит к высокой частоте ложноположительных результатов мониторинга, а, следовательно, к высокой частоте оперативного родоразрешения в интересах плода [6].

В активном периоде родов, помимо оценки характера околоплодных вод, при их излитии и достаточном раскрытии маточного зева появляется возможность проведения прямой КТГ и STAN-исследования, а также получения объективной информации о кислотно-основном состоянии (проба Залинга) и уровне лактата в крови плода. Прямая КТГ повышает достоверность метода при его использовании у рожениц с высоким индексом массы тела ≥ 30 кг/м² [7]. Однако, применение этого и других инвазивных методов ограничено повышенным риском восходящей инфекции, особенно у пациенток групп риска. Безусловно, учитывая вышесказанное, предпочтение в алгоритме пренатальной диагностики функционального состояния плода следует отдать мар-

керам гипоксии, определение которых, в том числе ex tempore, станет возможным в периферической крови матери.

В последние годы в литературе обсуждают такой маркер гипоксии как гипоксия-индуцируемый фактор (HIF) - регулятор экспрессии эритропоэтина (EPO), участвующий в каскаде реакций развития гипоксии в организме человека и животных [8]. При этом его содержание в плацентах, крови матери и плода в физиологических условиях и при акушерской патологии либо совсем не изучено, либо описано в единичных публикациях.

Цель исследования:

Провести при доношенной беременности сравнительную оценку уровня экспрессии HIF-1- α в плацентах женщин, имевших и не имевших нарушения маточно-плацентарного кровотока, а также функционального состояния задержавшегося в росте плода.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе клиники акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ. В исследование включены 20 пациенток, родоразрешенных путем операции кесарева сечения при доношенной беременности. Из них 9 женщин составили основную группу, 11 женщин - группу сравнения.

Критериями включения женщин в основную группу (n=9) явились:

- изолированное повышение сопротивления кровотоку в маточных артериях по данным доплерометрии,
- задержка роста плода по данным УЗ-фетометрии,
- отсутствие родовой деятельности,
- нарушение функционального состояния плода по данным наружной КТГ (сомнительный или патологический тип кривой),
- отсутствие тяжелой экстрагенитальной патологии.

Критерии включения беременных в группу сравнения (n=11) были:

- отсутствие нарушений плацентарного кровотока по данным доплерометрии,
- нормальные размеры плода по данным УЗ-фетометрии,
- нормальное функциональное состояние плода по данным наружной КТГ,
- акушерские и экстрагенитальные показания к проведению операции кесарева сечения в плановом порядке при доношенной беременности.

Критерии невключения:

- срок гестации меньше 37 и больше 40 недель
- родовая деятельность

- пороки развития плода
- подтвержденные лабораторно признаки внутриутробной инфекции у новорожденного

Все ультразвуковые исследования женщинам выполнены на УЗ-аппарате Voluson 730-Expert (GE, США). Резистентность маточных артерий считали повышенной при пульсационном индексе (PI) равном или превышающем 90 перцентилю для срока беременности (IA степень гемодинамических нарушений) [9]. Задержку роста устанавливали при предполагаемой массе плода или фетометрических параметрах ниже 10 перцентиля для срока беременности [10].

КТГ проводили на аппарате Philips-Avalon FM 20. Результаты интерпретировали по классификации, рекомендованной FIGO (1987г.).

У всех новорожденных забор крови из артерии пуповины осуществляли между двумя зажимами на 1 минуте после рождения. Определяли рН, рСО₂, рО₂ на анализаторе i-STAT System (Abbott, США).

Ткань плаценты размерами 1,0×1,0×0,5см, включающая ворсинчатый хорион, базальную и хориальную пластинки, получали из парацентральной зоны. Ее фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (Biovitrum, Россия) на 24 часа, а затем заключали в парафин. В последующем изготавливали срезы толщиной 4мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки экспрессии HIF-1- α в плацентах использовали кроличьи моноклональные антитела РТЕ-HIF1A-P402-1

(RayBiotech, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета «Microsoft Excel». При нормальном распределении рассчитывали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), использовали t-тест для определения статистической значимости. Для выявления возможной связи между показателями проводили корреляционный анализ с определением коэффициента корреляции Спирмена. Для качественных данных и определения статистической значимости рассчитывали частоты и использовали точный тест Фишера. Различия между сравниваемыми величинами признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Возраст женщин основной группы и группы сравнения не различался и составил 28,9±3,4 и 32,7±2,5лет соответственно ($p < 0,05$). Беременные обеих групп были сопоставимы по паритету (по 5 первородящих женщин в каждой группе).

В таблице 1 представлены антропометрические и функциональные параметры новорожденных и плацент сопоставляемых групп женщин.

Анализ показал, что у женщин основной группы была больше как масса плацент (на 12%), так и масса новорожденных (в 1,5 раза), чем таковые у пациенток группы сравнения. При этом, 4 новорожденных основной группы женщин имели 2 степень задержки роста,

Таблица 1. Масса плацент, антропометрические и функциональные параметры новорожденных от женщин групп сравнения

Параметры	Основная группа	Группа сравнения	p - значение
Масса плаценты (граммы)	487,0±23,2	555,0±26,5	0,0002
Масса новорожденных (граммы)	2560,0±254,0	2680,0±408,0	0,009
Рост плода (сантиметры)	48,0±2,4	52,0±1,9	0,009
Оценка по Апгар на 1 мин (баллы)	7,6±0,5	8,0±0,9	0,009
Оценка по Апгар на 5 мин (баллы)	7,9±0,6	8,6±0,5	0,009
рН крови новорожденного	7,25±0,1	7,33±0,1	0,05
рСО ₂ крови новорожденного (mmHg)	50,9±3,8	48,6±1,5	0,14
рО ₂ крови новорожденного (mmHg)	42,4±1,6	42,5±0,7	0,87

Таблица 2. Корреляционный анализ антропометрических параметров новорожденных и массы плацент с экспрессией HIF-1- α в плацентах женщин основной группы

параметры	r, коэффициент корреляции	p - значение
HIF-1- α и масса новорожденного	-0,76	0,0002
HIF-1- α и рост новорожденного	-0,57	0,0001
HIF-1- α и масса плаценты	-0,74	0,0002

Таблица 3. Показатели корреляции параметров газового состава крови у новорожденных с экспрессией HIF-1- α в плацентах у женщин основной группы

параметры	r, коэффициент корреляции	p - значение
HIF-1- α и pH	-0,356	0,16
HIF-1- α и pCO ₂	0,14	0,60
HIF-1- α и pO ₂	0,33	0,19

остальные - 1 степень (по диаграмме T.R.Fenton, 2013). Плацентарно-плодовый индекс, который считают морфологическим индикатором циркуляторно-метаболического равновесия фетоплацентарной системы, был достоверно выше у пациенток основной группы по сравнению с этим показателем у женщин группы сравнения (0,19±0,009 и 0,13±0,008 соответственно; p<0,05). Это характеризует, по данным литературы, компенсаторно-приспособительную гиперплазию плацентарной ткани у женщин с задержкой роста у плода [11]. При доношенной физиологической беременности этот показатель составляет 0,14-0,12.

Результаты нашего исследования показали, что при хронической плацентарной недостаточности экспрессия HIF-1- α в плацентах женщин основной группы была в 3 раза выше, чем в плацентах группы сравнения (20,0±4,8 % и 6,8±2,8 % соответственно, p<0,05). На рис.1 (Примечание редактора: этот рисунок см. на цветной вкладке) представлена соответственно экспрессия HIF-1- α в плацентах женщин основной группы и группы сравнения. При этом в плацентах женщин основной группы HIF-1- α накапливается не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток.

В нашем исследовании корреляционный анализ достоверно показал, что чем меньше росто-весовые показатели у новорожденного и масса плаценты, тем больше экспрессия HIF-1- α в плацентах (см. таблицу 2). Повышенная экспрессия HIF-1- α в плацентах у женщин основной группы с задержкой роста у плода, вероятно, связана с активацией генов гипоксиязависимых факторов, которые приводят к плацентарной недостаточности, сопровождающуюся эндотелиальной дисфункцией, и ведущей к задержке роста у новорожденного.

Изучение маркеров задержки роста плода было продемонстрировано и в работе Гагариной А.В. [12], которая показала, что содержание альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина в периферической крови у женщин обратно коррелирует с росто-весовыми показателями у плода. Автор объясняет полученный результат нарушением транспортной и синтетической

функции плаценты.

Повышение экспрессии HIF-1- α в плацентах у женщин основной группы может быть ассоциировано не только задержкой роста у плода, но и нарушением его функционального состояния. Так, в нашем исследовании при регистрации КТГ у 5 женщин основной группы наблюдался сомнительный тип КТГ кривой, у остальных 4 женщин - патологический. При этом все новорожденные были переведены в физиологическое отделение. Оценка по шкале Апгар у всех новорожденных составляла выше 7 баллов, однако она была ниже у новорожденных женщин основной группы по сравнению с новорожденными женщин группы сравнения (см. таблицу 1). У тех женщин основной группы у кого из них была патологическая кривая по данным КТГ, Апгар был достоверно (p<0,05) ниже (на 1 мин. 7,3±0,5 балла и на 5 мин. 7,4 ±0,6 балла), чем в с сомнительным типом кривой (на 1 мин. 7,5±0,2 баллов и на 5 мин. 7,8 ±0,3 баллов). Мы сравнили новорожденных женщин основной группы по кислотно-основному состоянию крови (pH, pCO₂, pO₂). Различий по показателям pH и pCO₂ выявлено не было, однако pH у новорожденных женщин основной группы, имевших патологический тип КТГ был ниже, чем с сомнительным типом КТГ (7,23±0,2 и 7,3±0,1; p<0,05.). Сравнение новорожденных у женщин основной группы по HIF показало, что при наличии патологической кривой на КТГ экспрессия HIF-1- α в плацентах была выше (24,1±2,4 %), чем у женщин с сомнительным типом кривой (16,7±3,3), p<0,05.

Коррелируя параметры газового состава крови у новорожденных с данными экспрессии HIF-1- α в плацентах у женщин основной группы корреляции обнаружено не было, что, вероятно, связано с коротким периодом полураспада и неустойчивостью временного интервала экспрессии/распада HIF-1- α при хронической плацентарной недостаточности. Данные представлены на таблице 3.

Нужно отметить, что в ранее проведенных исследованиях было показано, что развитие ацидоза наблюдалось у новорожденных с задержкой роста плода, но рожденных в более ранние сроки [13].

Вывод

Повышение экспрессии HIF-1- α в плацентах у женщин может объясняться как длительно протекающим расстройством плацентарного кровообращения, так и нарушением функционального состояния у плода, возникшего накануне родоразрешения. Полученные данные требуют дальнейших исследований. ■

Беженарь Виталий Федорович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства, гинекологии и неонатологии/репродуктологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; **Павлова Наталия Григорьевна**, д.м.н., профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; **Большакова Мария Владимировна**, очный аспирант кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; **Пастушенков Владимир Леонидович**, д.м.н., профессор, генеральный директор НПО «Фарм-ТРИСАН», г Санкт-Петербург; **Карев Вадим Евгеньевич**, к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией патоморфологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России. Автор, ответственный за переписку: Беженарь Виталий Федорович, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, 197022, Россия, e-mail: bez-vitaly@yandex.ru.

Литература:

1. Летифов Г.М., Прометной Д.В., Давыдова Н.А., Рамазанова Н.В. Задержка внутриутробного развития плода (факторы риска, ближайшие и отдаленные последствия). Обзор литературы // Практика в помощь врачу-педиатру. — С. 18-22.
2. S.R. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion / S.R.Ojeda, A.Lomniczi, U.S.Sandau // J. Neuroendocrinol. - 2008. — V.20. — P.732-742.
3. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy / A.Onogi, K.Naruse, T.Sado [et al.] // Placenta. - 2011.- 32. — P.665-670.
4. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis / M.C.Maiuri, E.Zalckvar, A.Kimchi [et al.] // J.Nat.Rev. Mol. Cell. Biol. - 2007. — V.8. — P.741-752.
5. Comparison of five classification systems for interpreting electronic fetal monitoring in predicting neonatal status at birth / M. Di Tommaso, V.Seravalli, A.Cordisco [et al.]// Matern Fetal Neonatal Med.- 2015.-26.-P.487-490.
6. Outcome of severe intrapartum acidemia diagnosed with fetal scalp blood sampling/ M.Holzmann, S.Cnattingius, L.Nordstrom // Perinat Med.- 2015.-39.-P.545-548.
7. Evaluation of an external fetal electrocardiogram monitoring system: A randomized controlled trial/ M.Monson, C.Heuser, B.D.Einerson[et al.]// J.Obstet. Gynecol.- 2020.- Feb 19.-20.-P.30150-2.
8. Большакова М.В., Беженарь В.Ф., Павлова Н.Г., Пастушенков В.Л., Габаева М.М. Современные представления о патогенезе гипоксии плода и роли в нем гипоксия-индуцируемого фактора (HIF). Акушерство и Гинекология Санкт-Петербурга. 2019;(1):19-24.
9. Павлова Н.Г., Аржанова О.Н., Зайнулина М.С., ред. Плацентарная недостаточность: учебно-методическое пособие. СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. 27 с.
10. Дементьева Г.М., Короткова Е.В. Оценка физического развития новорожденного. М., 1984.
11. Иванова Л.А., Титкова Е.В. Особенности строения плацентарного комплекса и основные причины перинатальных потерь // Педиатр. — 2018. — Т. 9. — № 1. — С. 5–10.
12. Гагарина, А.В. Плацентарная недостаточность при повышенном содержании альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина в крови беременных женщин: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук/ А.В.Гагарина.-СПб., 2004.-249 стр.
13. Блинецова Е.А., Антонова Л.К., Кулакова Н.И. Особенности течения неонатального периода у недоношенных детей с задержкой внутриутробного развития. НЕОНАТОЛОГИЯ: новости, мнения, обучение №3 2017, стр. 83-88.