

На правах рукописи

Руденко Екатерина Евгеньевна

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ
БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН ПОСЛЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛЛОГЕННОЙ ЯЙЦЕКЛЕТКИ (ДОНАЦИЯ
ООЦИТОВ И СУРРОГАТНОЕ МАТЕРИНСТВО)**

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Коган Евгения Алтаровна

Официальные оппоненты:

Милованов Андрей Петрович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» Минобрнауки России, лаборатория патологии репродукции, главный научный сотрудник

Забозлаев Федор Георгиевич – доктор медицинских наук, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, патологоанатомическое отделение, заведующий отделением

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «19» «октября» 2020 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991 Москва, Трубецкая ул., д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «_____» «_____» 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

В настоящее время использование методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с применением донорской яйцеклетки могут явиться единственным способом обрести собственного ребенка для супружеской пары, в которой женщина не способна к зачатию или к вынашиванию плода и деторождению. Существуют два вида ВРТ, в которых используется донорская яйцеклетка – донация ооцитов (ЭКО-ДО) и суррогатное материнство (ЭКО-СМ). По данным Российской ассоциации репродукции человека, за последние 10 лет произошло практически 10-ти кратное увеличение количества циклов с использованием донорской яйцеклетки (с 1,035 циклов в 2005г, до 10,670 в 2016г) (Корсак В.С., и соавт, 2019). Несмотря на тщательную прегравидарную подготовку реципиентов ооцитов и включение в программу суррогатного материнства только молодых, соматически здоровых фертильных женщин (согласно Приказу № 107н), при аллогенной беременности показана высокая частота развития осложнений, в частности, гестационной артериальной гипертензии (ГАГ) и преэклампсии (ПЭ). Рядом авторов было показано, что частота развития ГАГ и ПЭ при донации ооцитов достигает 27,4% и 25,4% соответственно, а при суррогатном материнстве 6,4 и 7,6% соответственно (Трифорова Н.С. и соавт., 2017). Возможно, высокий риск осложнений связан с нарушением иммунологической толерантности в системе мать-аллогенный плод, так как уникальной особенностью аллогенной беременности является вынашивание матерью-реципиентом плода, несущего только чужеродные антигены (van der Hoorn et al., 2010). По данным литературы, в плаценте после беременности по программе донации ооцитов обнаруживаются морфологические признаки иммунной альтерации тканей, имеющие сходство с проявлениями реакции отторжения трансплантата: хронический villitis неизвестной этиологии, хронический децидуит и диффузный хронический интервиллузит, массивные отложения фибриноида матричного типа (Perni S C., 2005). Таким образом, вероятно, беременность аллогенным плодом ведет к нарушению толерантности и развитию выраженного иммунного ответа материнского организма на фетальные антигены, что повышает риск развития осложнений беременности с иммунным патогенезом, в частности, преэклампсии (van der Hoorn M.L., 2011).

В последнее время активно исследуется иммуномодулирующая активность экзосом плацентарного происхождения (Stenqvist A.C., Nagaeva O., Baranov V., Mincheva-Nilsson L., 2013). Экзосомы являются разновидностью внеклеточных везикул, дифференцируют по происхождению и биогенезу, размерам и функциям. Внеклеточные везикулы (50 нм–2 мкм) секретируются различными видами клеток, включая человеческую плаценту, которая производит широкий спектр везикул: макровезикулы (синцитиальные ядерные конгломераты, 20 мкм-> 100 мкммоль/л), большие экзосомы (90-120нм), малые экзосомы (60-80нм), экзомы(менее 50нм) (Steven Ting-Yu Chuo, 2018). Главными тетраспанинами экзосом являются CD63, CD9, CD81,

которые используются в качестве маркеров для идентификации и выделения экзосом из биологических жидкостей и тканей, высокоспецифичным маркером плацентарного происхождения экзосом является маркер плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP). Плацентарные экзосомы играют важную роль в развитии осложнений беременности, таких как преэклампсия, гестационный сахарный диабет, преждевременные роды. Патогенетические механизмы с участием экзосом находятся в стадии изучения (Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, et al. 2012). Роль плацентарных экзосом в патогенезе ПЭ изучается по следующим причинам: экзосомы отличаются по концентрации и типу переносимых белков и влияют на формирование иммунной толерантности у матери.

ПЭ не только представляет серьезную угрозу для здоровья женщины и ее плода во время беременности и родов, но также повышает повышенный долгосрочный риск развития сердечнососудистых заболеваний, как у матери, так и у ребенка (Staff A.C., et al., 2016). Несмотря на годы изучения, этиология и патогенез преэклампсии остаются до конца не ясными.

Цель исследования: изучить иммуноморфологические механизмы и участие плацентарных экзосом в развитии преэклампсии беременности у женщин после вспомогательных репродуктивных технологий с использованием аллогенной яйцеклетки (донация ооцитов и суррогатное материнство) на материале плацент и биоптатов плацентарного ложа.

Задачи исследования

1. Провести клинико-морфологический анализ беременностей, наступивших в результате экстракорпорального оплодотворения с применением донорской яйцеклетки в программах донации ооцитов и суррогатного материнства с учетом полиморфизма генов системы HLA II.
2. Изучить морфологические особенности плаценты и плацентарного ложа при развитии преэклампсии беременности с аллогенной яйцеклеткой в программах донации ооцитов и суррогатного материнства беременности.
3. Провести иммуногистохимическое исследование маркеров HLA-DR, CD8, CD56, CD138, CD25\4, отражающих процессы становления иммунологической толерантности в структурах плаценты и плацентарного ложа при развитии преэклампсии
4. Изучить особенности экзосомальной активности синцитиотрофобласта и вневорсинчатого цитотрофобласта в плаценте и плацентарном ложе при развитии преэклампсии с помощью микроскопического, электрономикроскопического и иммуногистохимического исследований с определением содержания PLAP, CD9, CD81
5. Сформулировать гипотезу патогенеза преэклампсии на фоне аллогенной беременности в программах донации ооцитов и суррогатного материнства на основе полученных результатов и имеющихся данных литературы.

Научная новизна исследования.

Автором впервые установлено наличие стереотипных механизмов развития преэклампсии, связанных со снижением PLAP+, CD9+, CD81+ экзосом в синцитиотрофобласте ворсин плацент как при аллогенной беременности, так и при беременности после ЭКО с собственными ооцитами.

Впервые дана комплексная гистологическая и иммуногистохимическая характеристика плацент и плацентарного ложа при развитии преэклампсии на фоне аллогенной беременности, с определением маркеров CD138, CD8, HLA-DR, CD56, CD25\4, PLAP, CD9, CD81. При этом впервые установлено, что плаценты и плацентарное ложе на фоне аллогенной беременности при развитии преэклампсии характеризуются формированием очагов хронического иммунного воспаления, проявляющимися развитием хронического базального лимфоплазматитарного децидуита, хронического хориоамнионита, очагового виллита, лимфоплазматитарными инфильтратами в периваскулярных областях радиальных артерий.

Автором впервые показано накопление плазматических клеток, CD8+T-лимфоцитов, HLA-DR+ дендритных клеток, CD56+ uNK-клеток, уменьшение количества CD25\4+ Treg в местах наиболее тесного контакта материнских и плодовых тканей в структурах плацент и плацентарного ложа при развитии преэклампсии, что может быть расценено как проявление нарушения иммунологической толерантности.

Практическая значимость

Данные, полученные в результате проведенной работы, могут быть использованы для разработки системы подбора суррогатных матерей, подготовки матерей-реципиентов. Дальнейшая разработка темы может положить основу для создания методов неинвазивной диагностики риска развития ПЭ на основе определения раннего экзосомального профиля и молекулярного соответствия по системе HLA.

Материалы диссертации используются в практической работе Университетской клинической больницы №2, Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева (директор – д.м.н., проф. А.И. Ищенко), кафедры акушерства и гинекологии №1 лечебного факультета, а также при чтении лекций и проведении семинарских занятий по патологии перинатального периода для студентов 3 курса Института клинической медицины и Института здоровья детей на кафедре патологической анатомии им. А.И. Струкова (заведующая кафедрой – д.м.н., чл.-корр. РАЕ, проф. Коган Е.А.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клинико-анамнестический анализ 89 беременностей, наступивших в результате экстракорпорального оплодотворения с применением донорской яйцеклетки в программах донации ооцитов и суррогатного материнства, показал преобладание в группе донации ооцитов

женщин старше 40 лет с отягощенным соматическим и акушерско-гинекологическим анамнезом и высокой частотой развития гипертензивных осложнений беременности. В группе суррогатных матерей преобладали соматически здоровые женщины моложе 30 лет с частотой развития ПЭ в 17% случаев. Исследование полиморфизма генов HLA II (DQA1, DQB1, DRB1) показало, что увеличение числа несовпадений по системе HLA II не ассоциировано с увеличением частоты развития ПЭ.

2. Плацента при развитии преэклампсии на фоне аллогенной беременности характеризуется признаками иммунной альтерации с развитием хронического иммунного воспаления, что проявляется в виде: массивных отложений фибриноида в межворсинчатом пространстве и базальной пластинке, образования перивиллезного фибриноида с лимфогистиоцитарной инфильтрацией, хронического базального лимфоплазматического децидуита, хронического хориоамнионита, очагового виллита; иммуногистохимическое исследование выявило статистически достоверное увеличение плазматических клеток, CD8+Т-лимфоцитов, HLA-DR+ дендритных клеток, CD56+ uNK-клеток, уменьшение количества CD25⁺ Treg в местах контакта материнских и плодовых тканей по сравнению с группой контроля.

3. Плацентарное ложе при развитии преэклампсии на фоне аллогенной беременности характеризуются статистически достоверным усилением лимфогистиоплазматической инфильтрации в периваскулярной области, увеличением количества МГК вневорсинчатого цитотрофобласта и нарушением ремоделирования спиральных и радиальных артерий; исследование выявило статистически достоверное увеличение CD8+Т-лимфоцитов, CD56+ NK-клеток, CD138+ плазматических клеток, HLA-DR+дендритных клеток в периваскулярных областях радиальных артерий миометриального сегмента и строме плацентарного ложа.

4. Развитие преэклампсии в группах аллогенной беременности и в группе беременностей с собственными ооцитами сопровождается уменьшением экзосомальной активности синцитиотрофобласта ворсин, что подтверждается снижением содержания количества PLAP⁺, CD9⁺, CD81⁺ экзосом в клетках синцитиотрофобласта.

Апробация диссертационного материала

Материалы диссертации доложены на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017), XXX Европейском патологическом конгрессе (Бильбао, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна» (Москва, 2018), XXXI Европейском патологическом конгрессе (Ницца, 2019) с присуждением награды в номинации «Патобиология», Российском обществе патологоанатомов (Москва, 2018, 2019), Международном медицинском форуме "Вузовская наука. Инновации" (Москва, 2019) , Конференции с Международным участием, посвященная 170-летию кафедры патологической анатомии им. А.И.Струкова (Москва, 2019).

Апробация диссертации состоялась на расширенной межучрежденческой научной конференции кафедры патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «25» февраля 2020 года.

Внедрение результатов исследования в практику

Материалы диссертации используются в практической работе Университетской клинической больницы №2, Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева (директор – д.м.н., проф. А.И. Ищенко), кафедры акушерства и гинекологии №1 лечебного факультета, а также при чтении лекций и проведении семинарских занятий по патологии перинатального периода для студентов 3 курса Института клинической медицины и Института здоровья детей на кафедре патологической анатомии им. А.И. Струкова (заведующая кафедрой – д.м.н., чл.-корр. РАЕН, проф. Коган Е.А.)

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02– патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам 1, 2, 3 и 4.

Публикации результатов работы

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 2 работы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 1 публикация в зарубежном издании, индексируемом в Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 182 страницах машинописи, содержит 22 таблицы, 20 рисунков, 19 гистограмм. Диссертация состоит из введения, глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 16 отечественных и 232 иностранных источника.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Для выполнения задач, поставленных в данном исследовании, было проведено ретроспективное и проспективное исследование. Исследование проводилось на архивном материале (парафиновых блоках) последов и плацентарных площадок, а также биопсийном материале последов (комплекс плацентарный диск, плодные оболочки, пуповина), полученных после родоразрешения через естественные пути или после операции Кесарева сечения; на биопсийном материале плацентарных площадок, полученном во время проведения операции Кесарева сечения. Изучены плаценты и биоптаты плацентарного ложа, полученные от 110 пациенток, роды которых проходили в Университетской клинической больнице №2, Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева (директор – д.м.н., проф. А.И. Ищенко) в период с 2010 по 2019гг. Основную

группу составили 89 пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО с донорской яйцеклеткой по программе суррогатного материнства (47 пациенток) и донации ооцитов (42 пациентки) и 21 пациентка (группа сравнения), беременность которых наступила после ЭКО с собственной яйцеклеткой (ЭКО-СО) (Рис. 1)

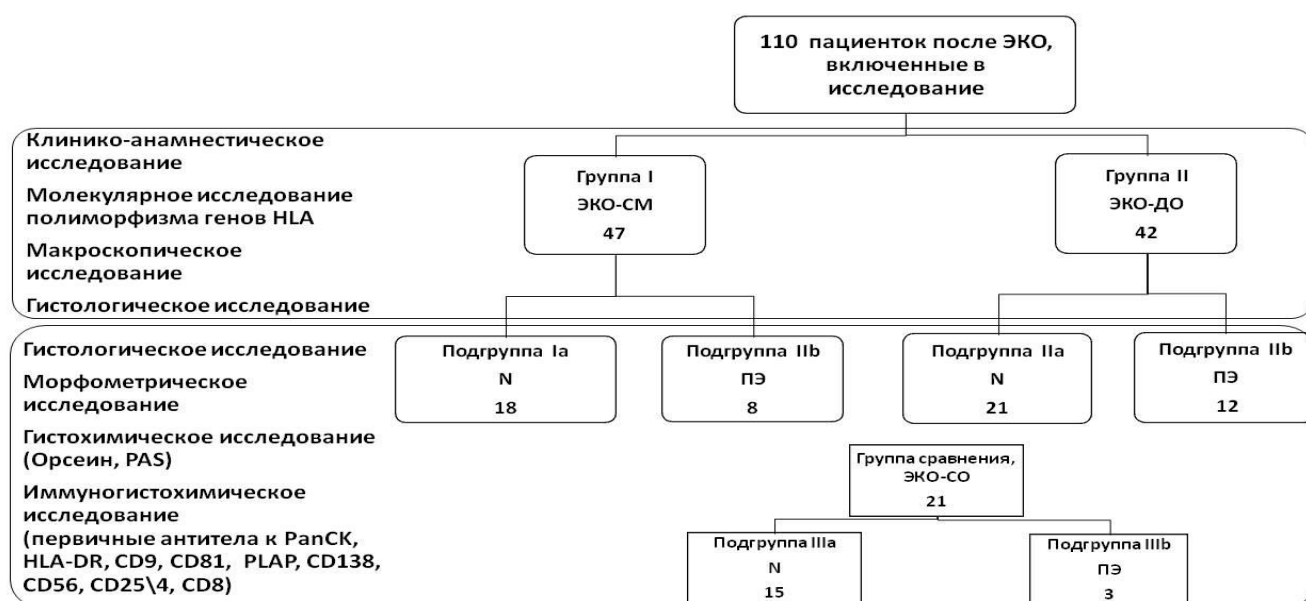


Рисунок 1. Дизайн ретроспективного и проспективного исследования случай-контроль

Возраст пациенток группы I колебался от 21 до 35 лет, возраст женщин группы II колебался от 26 лет до 58, женщин в группе III от 22 до 46 лет. Первородящих женщин в группе II было 20 (64,5%), а в группе III - 12 (75,0%). Все суррогатные матери были повторнородящими (в соответствии с приказом Минздрава России от 30.08.2012 № 107н). Средний гестационный возраст был несколько ниже в группе II (36,5 против 37,1 и 37,2 недель гестации соответственно). Для выявления структурных особенностей плацент у женщин с развитием преэклампсии были выделены 6 подгрупп. Подгруппы были сформированы по признаку наличия или отсутствия клинических проявлений преэклампсии умеренной и тяжелой степени. В подгруппу Ia вошло 18 пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО-СМ и характеризовалась физиологическим течением, в подгруппу Ib вошли 8 пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО-СМ и была осложнена ПЭ умеренной или тяжелой степени. В подгруппу IIa вошла 21 пациентка, беременность которых наступила в результате ЭКО-ДО и характеризовалась физиологическим течением, в подгруппу IIb вошли 12 пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО-ДО и была осложнена ПЭ умеренной или тяжелой степени. В группу сравнения IIIa вошло 15 пациенток, беременность которых наступила в результате ЭКО-СО и характеризовалась физиологическим течением, в группу сравнения IIIb вошло 3 пациентки, беременность которых наступила в результате ЭКО-СО и была осложнена ПЭ умеренной или тяжелой степени. Клинико-анамнестический анализ наступивших беременностей сопровождался изучением аллельных полиморфизмов генов трех генов класса HLA II (DQA1, DQB1, DRB1) у женщин-реципиентов ооцитов и их детей. ДНК выделялась из ЭДТА-стабилизированной

венозной крови при помощи наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Использовались наборы реагентов HLA-ДНК-ТЕХ для типирования генов главного комплекса гистосовместимости человека (HLA) II класса (DQA1, DQB1 и DRB1) (ДНК-технология, Россия). Типирование проводилось при помощи детектирующего амплификатора ДТ96 (ДНК-технология, Россия) согласно протоколу производителя, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для исследования полиморфизмов генов системы HLA, полученные результаты обрабатывались с использованием пакета статистической программы «SPSS Statistics for Windows» (США). Для оценки достоверности различий непрерывных данных сравнивались средние арифметические с использованием t-теста или теста Вилкоксона (в зависимости от распределения данных). Зависимые данные оценивались с помощью коэффициента корреляции. Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$ (99.5%)

Морфологические и иммуногистохимические исследования проводились на кафедре патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет)» (заведующая кафедрой, д.м.н. член-корр. РАЕН, проф. Коган Е.А.) и в Централизованном патологоанатомическом отделении Клинического центра ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет)» (заведующая к.м.н. Парамонова Н.Б.). Макроскопическое исследование проводилось на фиксированных последах и биоптатах плацентарного ложа, последовательно проводились осмотр и макроскопическое описание пуповины, плодных оболочек и плацентарного диска, раздельное от других компонентов взвешивание плацентарного диска, определение плацентарно-плодного коэффициента (ППК, масса плаценты: масса плода). В случаях ретроспективного исследования изучались протоколы макроскопического описания.

Для гистологического исследования материал фиксировался в 10 % нейтральном формалине с фосфатным буфером, обрабатывался в аппарате гистологической проводки тканей фирмы «Pool Scientific Instruments» (Швейцария) и заливался в парафин. Готовилось не менее 45 серийных парафиновых срезов толщиной 4 мкм, которые фиксировали на предметные полилизинные стекла (Mainzel Glaser, Polylysine, Германия) и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 12 часов. Далее срезы депарафинировали и регидратировали. Препараты от каждого случая окрашивали гематоксилином и эозином, орсеином, проводилась PAS-реакция.

Микроскопическому исследованию подвергалось 8 фрагментов каждого последа: 2 фрагмента пуповины, 2 ролла оболочек, 2 фрагмента базальной пластины с ворсинчатой частью и 2 фрагмента децидуальной пластины с ворсинами. Гистологические препараты подвергали обзорному морфологическому анализу: последовательно рассматривались оба среза пуповины, два ролла оболочек, два среза хориальной пластины с ворсинами, два среза базальной пластины с ворсинами. При исследовании биоптатов плацентарного ложа оценивались сосуды эндометриального и миометриального сегментов. При гистологическом описании указанных

выше структур особое внимание уделялось обнаружению изменений, относящихся к группе воспалительных\идиопатических поражений плаценты в соответствии с Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement (2016).

Иммуногистохимические реакции проводились на депарафинированных срезах толщиной 4 мкм, расположенных на стеклах, покрытых полилизинным слоем (Mainzel Glaser, Polylysine, Германия). Неокрашенные срезы от каждого случая обрабатывали с помощью стандартного метода иммуногистохимии с термической демаскировкой антигенов. Демаскировку проводили в водяной бане с микропроцессором Bio Optica (Милан). С целью блокировки эндогенной пероксидазы остывшие стекла для предотвращения их высыхания помещали во влажные камеры и инкубировали в течение 15 минут с 3 % раствором H_2O_2 , после чего срезы ополаскивали в фосфатном буфере (pH 7,0–7,6) и для блокирования неспецифических белковых взаимодействий инкубировали с Ultra-V-Block (LabVision, USA) во влажных камерах в течение 30 минут. По окончании инкубации наносили первичные моноклональные антитела (Таблица 1).

Таблица 1.

Панель первичных моноклональных антител, использованных в исследовании

	Использованные первичные антитела	клон	разведение	производитель
ИГХ исследование плацентарных площадок и плацент	HLA-DR	TAL.1B5	1:50	Dako
	PanCK	AE1/AE3	1:50	Dako
	CD56	123C3.D5	1:100	Cell Marque
	CD8	SP16	1:100	Cell Marque
	CD25	SP176	1:100	Cell Marque
	CD4	SP35	1:100	Cell Marque
	SMA	1A4	1:50	Dako
	PLAP	NB-10	1:200	Dako
	CD81	1D6	1:200	Dako
	CD9	MEM-61	1:200	Dako

Для выявления первичных антител использовали полимерную систему с вторичными антителами к антимышиным и антикроличьим иммуноглобулинам (Ig). Для визуализации места связывания антитела с антигеном использовали реакцию окисления субстрата 3,3-диаминобензидина (ДАБ) пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода (5-15 минут). Далее стекла ополаскивали в дистиллированной воде и подкрашивали ядра гематоксилином Майера в течение 2–3 минут. После этого стекла дегидратировали, срезы покрывали покровными стеклами с использованием синтетической среды. Для иммуногистохимических реакций ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре иммуногистохимии, но без добавления первичных антител.

Проводилась количественная (подсчет числа положительно окрашенных клеток в 5 полях зрения на увеличении 400) и полуколичественная оценка результатов реакций в баллах. Оценка в баллах проводилась в соответствии с предложенной Chong Jai Kim (2015): 0 баллов – отсутствие воспалительных изменений, 1 балл – единичные очаги поражения не в каждом препарате, 2 балла – 2 и более очага поражения в каждом препарате, 3 балла – множественные очаги\диффузное поражение в каждом препарате. Экспрессия HLA-DR оценивалась при выполнении световой микроскопии с 400-кратным увеличением путем подсчета положительно окрашенных клеток (цитоплазматическое окрашивание) в 5 полях зрения (по аналогии системы ИГХ оценки хронического эндометрита, Хохлов П.П., 2007). Экспрессия CD8, CD4\25, CD138, CD56 оценивалась количественным методом, подсчитывались окрашенные клетки (мембранное окрашивание) в 5 полях зрения при выполнении световой микроскопии с 400-кратным увеличением.

Для исследования маркеров экзосом на парафиновых срезах проводились иммунопероксидазные реакции с антителами к CD9, CD81, PLAP. Было получено диффузное цитоплазматическое окрашивание синцитиотрофобласта и единичных клеток вневорсинчатого цитотрофобласта. Для оценки диффузного окрашивания применялась морфометрическая программа ImageM. Проводилась микросъемка на увеличении x400 не менее 5 полей зрения от каждого образца с последующей цифровой обработкой и расчетом оптической плотности диффузно окрашенных структур. Для детекции экзосом проводилась электронная микроскопия фрагментов плацентарной ткани на просвечивающем электронном микроскопе Теснаі 12, Производитель – FEI, США; исследовалась область щеточной каймы синцитиотрофобласта ворсин. Статистическую обработку данных выполняли на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ «SPSS Statistics for Windows» (США). Все полученные количественные, анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Для оценки достоверности различий бинарных и категориальных данных использовался точный тест Фишера и χ -тест. Для определения значимости статистических различий количественных показателей в группе применялся тест Краскела-Уоллеса, при оценке полуколичественных показателей пользовались непараметрические методы – критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты клинико-анамнестического анализа наступивших беременностей, результаты молекулярного исследования

При оценке экстрагенитальных заболеваний у 10 (23,8%) женщин в группе II, у 3 (6,3%) суррогатных матерей и у 9 (17,1%) женщин в группе III были зарегистрированы хронические заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы (варикозная болезнь, пролапс митрального клапана, нейро-циркуляторная дистония), у 12 (28,5%), 2(4,2 %) и 7 (33,3%) соответственно со

стороны эндокринной системы (гипо- или гиперфункция щитовидной железы, нарушение жирового обмена), у 6 (14,2%), 2 (4,2%) и 5 (23,8%) соответственно со стороны мочевыделительной системы (хронический цистит, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь), у 3 (7,1%) в группе II и 1 (4,7%) в группе III со стороны гепатобилиарной системы (хронический холецистит, болезнь Жильбера), у 4 (9,5%), 1 (2,1%) и 2 (9,5%) женщин соответственно со стороны дыхательной системы (бронхиальная астма, хронический бронхит)

Несмотря на преобладание пациенток в группе II возрастной категории старше 40 лет, превышения частоты экстрагенитальных заболеваний у женщин этой группы по сравнению с группой III выявлено не было. Частота преэклампсии была значительно выше в группе II (28,5% против 17,1% и 14,2% соответственно; $p < 0,05$). Особое внимание привлекает высокая частота развития ПЭ в группе I, т.к. в эту группу входят молодые, здоровые женщины, имеющие в анамнезе одну беременность и роды благополучного течения. Для группы II была характерна высокая частота угрозы прерывания беременности во всех триместрах, и в 33,5% роды были преждевременными. Полученные данные можно объяснить высокой частотой плановых родоразрешений в группе II по поводу ПЭ. Однако для группы I также сохранялся достаточно высокий риск прерывания беременности, особенно в 3 триместре (49,6 против 14,2 для группы III), а преждевременные роды были зафиксированы в 21,6% случаев. Было проведено изучение аллельных полиморфизмов генов класса HLA II (DQA1, DQB1, DRB1) у пар: женщина, беременность у которой наступила после ЭКО-СМ и ЭКО-ДО – ребенок. В исследование вошли пары от пар мать-ребенок в количестве 45 пар, из них 27 после неосложненной ПЭ беременности из групп I и II, 18 пар после беременности с развитием ПЭ из групп I и II. В исследуемых группах был проведен сравнительный анализ частот встречаемости аллелей по DQA1, DQB1, DRB1 генам класса HLA II. Был проведен анализ влияния частоты совпадений или несовпадений по HLA-системе между матерью и плодом на течение беременности, в частности на развитие ПЭ. Как следует из данных, представленных в **Таблице 2**, при отсутствии HLA-совпадений число осложнений беременности было ниже. Однако, рост числа HLA-совпадений не оказывал влияния на количество осложнений.

Таким образом, было установлено, что увеличение числа несовпадений по системе HLA II не является фактором риска развития ПЭ.

Таблица 2

Количество HLA-совпадений между матерями и детьми в исследуемых группах

Количество HLA-совпадений	Всего (n=45)	Норма (n=27)	ПЭ (n=18)
0	22 (48,9%)	15 (55,5%)	7 (38,9%)
1	9 (20%)	4 (14,8%)	5 (27,7%)
2	5 (11,1%)	3 (11,1%)	2 (11,1%)
>2	9 (20%)	5 (18,5%)	4 (22,2%)

Морфологическая характеристика плацент и плацентарного ложа пациенток групп донации ооцитов и суррогатного материнства при развитии преэклампсии

При макроскопическом исследовании плацент группы I было отмечено увеличение средней массы плацент ($687,62 \pm 81,2$ г) по сравнению с группой II ($490,00 \pm 25,1$ г), а также увеличение среднего плацентарно-плодного коэффициента ($0,21 \pm 0,15$ против $0,18 \pm 0,02$). Возможна, такая органная реакция связана с компенсаторно-приспособительными реакциями, затрагивающими плаценты во втором триместре (Б.И. Глуховец, Н.Г. Глуховец, 2002г). При исследовании группы II средний вес плацент составил $536,12 \pm 39,5$, средний плацентарно-плодный коэффициент составил $0.34 \pm 0,6$.

При исследовании плацент в группе I наиболее значимые изменения были обнаружены для признаков иммунного и идиопатического поражения плаценты. Так, лимфоплазматический базальный децидуит был обнаружен в 72,3% , хронический хориоамнионит в 55,2%, перивиллезный фибриноид с лимфо-гистиоцитарными клетками в 44,6%, виллит неизвестной этиологии в 19,1% случаев и массивные отложения фибриноида в структурах плаценты в 31,9% . Полученные различия с группой сравнения были достоверны ($p < 0,05$). При гистологическом исследовании плаценты группы II было выявлено значительное количество материнских стромально-сосудистых поражений, что отражает высокую частоту развития гестационной артериальной гипертензии и преэклампсии в данной группе. Так замедленная дифференцировка ворсин встречалась в 50% случаев, ишемические инфаркты центральной области в 54,7%, признаки децидуальной артериопатии в 28,5% плацент. Среди признаков иммунного поражения плаценты высокая частота встречаемости была показана для лимфоплазматического базального децидуита (69,0%), хронического хориоамнионита (71,4%), перивиллезного фибриноида с ЛГИ (64,2%), виллита неизвестной этиологии (23,8%), массивных отложений фибриноида в маточно-плацентарной области (42,8%). В одном случае был обнаружен гистиоцитарный интервиллузит, представлявший собой выраженную инфильтрацию межворсинчатого пространства лимфоцитами и макрофагами без перехода на ворсины.

Таким образом, основным структурным отличием плацент в группах I и II группах стала высокая частота развития признаков иммунного поражения плаценты: лимфоплазматического базального децидуита, хронического хориоамнионита, перивиллезного фибриноида с лимфо-гистиоцитарными клетками, виллита неизвестной этиологии и массивных отложений фибриноида в структурах плаценты (Таблица 3).

Гистологическая характеристика плацент в группах ЭКО-СМ и ЭКО-ДО

	Группа I n=47	χ^2	P (F)	Группа II n=42	χ^2	P (F)	Группа III n=21
Материнские стромально-сосудистые поражения							
замедленная дифференцировка ворсин	10	1.380	0.31693	21*	9.895	0.00195	2
ускоренная дифференцировка ворсин	3	0.210	0.64067	8	0.951	0.47360	2
ишемические инфаркты (центр)	7	0.185	0.72719	23*	7.292	0.00796	4
Плодные стромально-сосудистые поражения							
грубые дефекты созревания	2	0.921	1.00000	5	2.716	0.15968	0
диссоциация котиледонов	19	2.964	0.10283	27*	11.463	0.00111	4
отложения фибрина в крупных фетоплацентарных сосудах	2	0.728	0.58187	9	1.377	0.30952	2
очаги аваскуляризированных ворсин или кариорексис	4	0.299	1.00000	15*	7.079	0.01208	1
Инфекционно-воспалительные поражения							
воспалительная реакция матери (хориоамнионит, субхорионит)	2	0.009	1.00000	3	0.133	1.00000	1
воспалительная реакция плода (фуникулит и васкулит ворсин)	0	2.271	0.30882	1	0.258	1.00000	1
Иммунные/идиопатические воспалительные поражения							
гистиоцитарный интервиллузит	0	0	0	1	0.508	1.00000	0
лимфоплазмочитарный базальный децидуит	34*	5.427	0.02939	29	4.012	0.05870	9
лимфоплазмочитарный париетальный децидуит	26*	6.426	0.01875	30*	9.621	0.00288	3
виллит неизвестной этиологии	9*	4.635	0.04826	10*	5.943	0.02343	1
перивиллезный фибриониод с ЛГИ	21*	8.015	0.00523	27*	16.900	0.00004	2
массивные отложения фибриноида в маточно- плацентарной области	15*	5.948	0.01475	18*	9.646	0.00148	1

* различия, статистически достоверные по сравнению с группой III

Для изучения гистологического строения плацент при развитии преэклампсии были сформированы подгруппы по признаку наличия или отсутствия клинических проявлений преэклампсии. Для балльной оценки были выбраны признаки иммунной альтерации последа. Было показано достоверное изменение указанных выше признаков для подгрупп с развитием ПЭ (Таблица 2). Для лимфоплазмочитарного децидуита разница составила $2,25 \pm 0,96$, $2,3 \pm 0,48$ против $1,54 \pm 0,66$, $1,67 \pm 0,78$ для групп Ib и IIb соответственно (в баллах, $p < 0,05$). Для хронического хориоамнионита полученная разница составила $2,1 \pm 0,58$, $2,6 \pm 0,53$ против $1,46 \pm 0,52$, $1,3 \pm 0,9$ для групп Ib и IIb соответственно (в баллах, $p < 0,05$). Для

перивиллезного фибриноида с ЛГИ полученная разница составила $2,75 \pm 0,5$, $1,8 \pm 0,79$ против $1,38 \pm 0,51$, $0,75 \pm 0,75$ для групп для групп Ib и IIb соответственно (в баллах, $p < 0,05$). Для виллита неизвестной этиологии полученная разница составила $1,25 \pm 0,89$, $1,0 \pm 0,95$ против $0,17 \pm 0,51$, $0,19 \pm 0,34$ для групп для групп Ib и IIb соответственно (в баллах, $p < 0,05$). Для массивных отложений фибриноида в маточно-плацентарной области полученная разница составила $2,6 \pm 0,55$, $2,8 \pm 0,92$ против $1,62 \pm 0,5$, $1,76 \pm 0,65$ для групп для групп Ib и IIb соответственно (в баллах, $p < 0,05$). При сравнении подгрупп с развитием ПЭ, было показано, что при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности выраженность лимфоплазматического децидуита и виллита неизвестной этиологии достоверно выше по сравнению с подгруппой IIIb. Так, для лимфоплазматического децидуита разница составила $2,25 \pm 0,96$, $2,3 \pm 0,48$ против $1,6 \pm 0,55$ (в баллах, $p < 0,05$), для виллита неизвестной этиологии $1,25 \pm 0,89$, $1,0 \pm 0,95$ против $0,33 \pm 0,58$ для подгрупп Ib, IIb, IIIb соответственно.

При исследовании биоптатов плацентарного ложа была проведена оценка выраженности воспалительных инфильтратов в периваскулярных областях, а также изучена степень ремоделирования спиральных и радиальных артерий артерий. Данные о ремоделировании артерий плацентарного ложа представлены в Таблице 4.

Таблица 4.

Гистологическая характеристика плацентарных площадок в группах ЭКО-СМ и ЭКО-ДО

Характеристика	Без преэклампсии			Преэклампсия		
	Ia n=18	IIa n=21	IIIa n=15	Ib n=8	IIb n=12	IIIb n=3
Периваскулярная инфильтрация	$1,15 \pm 0,69$	$1,31 \pm 2,46$	$0,5 \pm 0,47$	$2,56 \pm 1,2^*$	$2,78 \pm 0,54^*$	$2,34 \pm 0,32$
Полное ремоделирование спиральных артерий (%)	23,00	11,00	57,00	12,00	10,00	8,00
Частичное ремоделирование спиральных артерий (%)	46,00	57,00	38,00	21,00	17,00	11,00
Отсутствие ремоделирования (%)	31,00	32,00	5,00	61,00	73,00	81,00

*Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппами без ПЭ, $p < 0,05$.

Также отмечалась очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация периваскулярных областей. Повышенное количество клеток хронического воспаления вокруг сосудов плацентарной площадки ассоциировано с формированием материнской мальперфузии за счет неполной гестационной перестройки спиральных и радиальных артерий. Инфильтраты состояли преимущественно из лимфоцитов с примесью макрофагов и плазматических клеток. Для подгрупп с развитием ПЭ инфильтрация была достоверно более выраженной, чем в подгруппах без ПЭ $2,56 \pm 1,2$, $2,78 \pm 0,54$ против $1,15 \pm 0,69$, $1,31 \pm 2,46$ (в баллах $p < 0,05$). Для подгрупп с развитием ПЭ выраженность инфильтратов была сопоставима во всех трех подгруппах.

Основные изменения, обнаруженные при комплексном морфологическом исследовании плацент при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности в маточно-плацентарной области, относятся к иммунным/идиопатическим воспалительным поражениям. Было показано, что аллогенный цитотрофобласт, хотя и не отторгается, испытывает на себе более агрессивный иммунный ответ материнского организма. Развитие лимфоплазматического децидуита и хронического хориоамнионита в исследуемых подгруппах в литературе описываются как проявление реакций отторжения полуаллогенного плода (Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, Erlebacher A., 2012). Также в эту группу реакций входят массивные отложения фибриноида матричного типа с лимфогистиоцитарной инфильтрацией, что отражает иммунное повреждение структур плаценты. Инвазия аллогенного цитотрофобласта сопряжена с иммунологическими трудностями в становлении толерантности, что проявляется поверхностной имплантацией, децидуальной артериопатией, нарушением ремоделирования спиральных артерий и развитием очагов хронического воспаления в периваскулярных областях плацентарного ложа. Признаки нарушения ремоделирования артерий наблюдались как в группах с развитием ПЭ, так и в группах условно здоровых женщин. Однако, признаки материнской мальперфузии (следствие изменения кровотока по спиральным и радиальным артериям) являлись ведущими изменениями в группе ЭКО-ДО. Нарушение перфузии плацент этой группы привело к более частому развитию СЗРП и рождению плодов в нижних центильных интервалах ($2972,0 \pm 526,2$ в группе ЭКО-ДО против $3416,4 \pm 393,8$ в группе ЭКО-СМ и $3284,5 \pm 366,7$ в группе сравнения). Полученные данные подтверждают современные представления о том, что развитие ПЭ не имеет жесткой ассоциации со степенью ремоделирования спиральных артерий (Pijnenborg et al., 2006).

Таким образом, резюмируя результаты проведенного комплексного гистологического исследования, можно заключить, что аллогенная беременность протекает в условиях иммунологической напряженности между матерью и плодом. Структурной особенностью плацент и плацентарных площадок на фоне аллогенной беременности при развитии ПЭ стала достоверно высокая частота развития иммунных воспалительных поражений на материнско-плодном интерфэйсе: концентрация иммунных клеток и фибриноида вокруг ворсин (СТБ - материнская кровь), в децидуальной ткани (децидуа, ВВТ - гравидарный эндометрий), вокруг маточных сосудов (инвазивный трофобласт - миометрий, сосудистые структуры матери). Данные признаки обнаруживались как в группах с условно нормальным течением беременности, так и при развитии ПЭ, однако в случаях с ПЭ активность иммуно-воспалительных процессов была достоверно выше.

Иммуногистохимическая характеристика плацент и плацентарных площадок женщин ЭКО-СМ и ЭКО-ДО при ПЭ

Иммуногистохимическое исследование плацент было направлено на исследование маркеров HLA-DR+ дендритных клеток, Т-лимфоцитов (CD8), Т-регуляторных клеток (CD4\25), uNK-клеток (CD56), плазматических клеток (CD138), отражающих процессы становления

иммунологической толерантности на границе тканей системы мать-плод в структурах плаценты при развитии ПЭ (по данным специализированной литературы). В плацентах HLA-DR определялся в децидуальной ткани, а также в строме ворсин. По данным литературы (Sutton L. et al., 1983) дендритные клетки ворсин имеют плодовое происхождение. HLA-DR положительные клетки ворсин определялись как многоотростчатые клетки с крупным просветленным ядром, с диффузным коричневым цитоплазматическим окрашиванием. Маркер CD8 в тканях плаценты проявляет коричневое диффузное цитоплазматическое окрашивание Т-клеток материнского и плодового происхождения. В децидуальной ткани Т-клетки располагались диффузно, без видимых очагов скопления, тогда как в ворсинах отмечалась очаговая инфильтрация CD8 клетками, что позволяет говорить о развитии очагового виллита неизвестной этиологии (VUE). Маркер CD138 высокоспецифично окрашивает плазматические клетки децидуальной ткани, дает коричневое мембранное окрашивание клеток. Маркер CD56 окрашивает маточные NK-клетки. В нашем исследовании оценивалось количество децидуальных uNK-клеток, которые специфично окрашиваются антителами к CD56 и дают положительное коричневое мембранное окрашивание. При исследовании количества Treg-клеток в децидуальной ткани использовались антитела к CD4\CD25, ко-экспрессия которых выявляет регуляторные клетки.

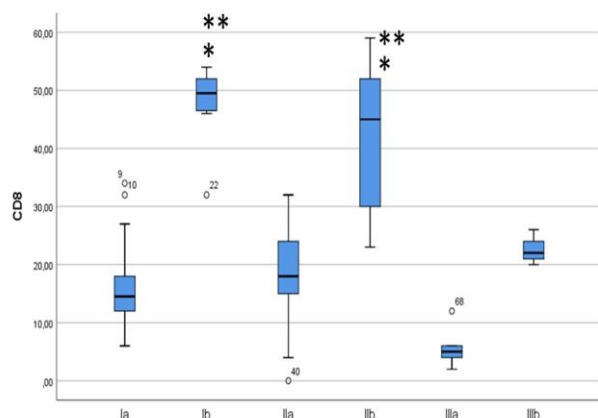
Наше исследование подтвердило данные литературы о значительном скоплении клеток лимфомакрофагального ряда в этих областях при ЭКО-ДО, и установили идентичное распределение для группы ЭКО-СМ. При исследовании структур плацент, в частности decidua basalis, было показано, что при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности происходит накопление иммунокомпетентных клеток, в частности плазматических клеток, CD8+Т-лимфоцитов, HLA-DR+ дендритных клеток, CD56+ uNK-клеток, уменьшение количества CD25\4+ Treg по сравнению с группой контроля (подгруппы без развития ПЭ). Также необходимо отметить, что при развитии ПЭ клеточный состав во всех трех подгруппах приобретал схожий характер, и заключался в увеличении активности иммуно-воспалительных инфильтратов и повреждении плацентарного барьера, что проявлялось формированием очагового виллита с CD8+ Т-лимфоцитарной инфильтрацией, увеличением HLA-DR+дендритных клеток плодового происхождения в строме ворсин. При этом в плацентах при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности по сравнению с плацентами при развитии ПЭ на фоне беременности с собственными ооцитами отмечалась тенденция к дальнейшему увеличению количества иммунных клеток в местах контакта материнских и плодовых тканей, различия в количестве плазматических клеток (Гистограмма 1) и CD8+ Т-лимфоцитов (Гистограмма 2) были статистически достоверными.

Гистограмма 1

CD8⁺ Т-лимфоциты в deciduas basalis в группах ЭКО-СМ, ЭКО-ДО, ЭКО-СО (клеток/5 полей зрения, тест Краскела-Уоллеса, * p<0,05)

*Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппами без ПЭ, p<0,05.

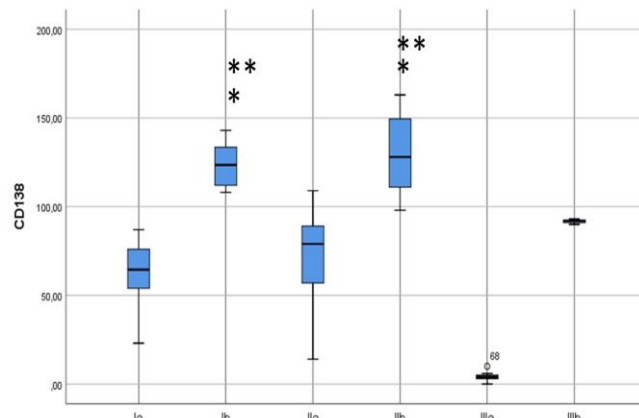
**Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппой IIIb, p<0,05

**Гистограмма 2**

CD138⁺ плазматические клетки в deciduas basalis в группах ЭКО-СМ, ЭКО-ДО, ЭКО-СО (клеток/5 полей зрения, тест Краскела-Уоллеса, * p<0,05) *Различия,

статистически достоверные по сравнению с подгруппами без ПЭ, p<0,05. **Различия,

статистически достоверные по сравнению с подгруппой IIIb, p<0,05.

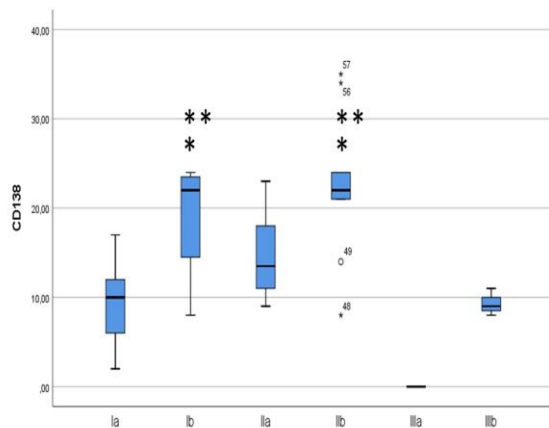


Исследование очагов хронического воспаления в периваскулярных областях радиальных артерий показало достоверное увеличение числа плазматических клеток, маточных НК-клеток, CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с подгруппами без развития ПЭ. Наличие инфильтратов не имело жесткой корреляции с развитием ПЭ, инфильтраты были обнаружены также в подгруппах Ia и IIa. При сравнении состава инфильтратов в подгруппах с развитием ПЭ было показано, что при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности инфильтраты плацентарного ложа отличаются достоверным увеличением количества многоядерных гигантских клеток цитотрофобласта, плазматических клеток (Гистограмма 3), CD8⁺Т-лимфоцитов (Гистограмма 4) по сравнению с группой IIIb (клеток/5 полей зрения, тест Краскела-Уоллеса, p<0,05).

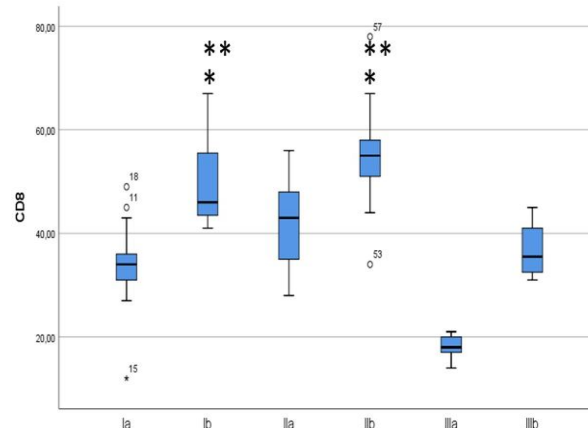
Таким образом, обнаруженные нами ИГХ изменения в децидуальной ткани и в структурах плацентарного ложа в группах ЭКО-СМ и ЭКО-ДО при развитии ПЭ показали уменьшение количества иммунных клеток, участвующих в формировании толерантности и увеличение клеток отвечающих за процессы «отторжения трансплантата». Вероятно, такой эффект развивается вследствие гиперстимуляции аллогенным плодом иммунной системы матери. Вызывает большой интерес, что ИГХ картина осложненных ПЭ беременностей ЭКО-ДО и ЭКО-СМ имеет сходство с беременностями с развитием ПЭ в группе сравнения (IIIb). Достоверные отличия были показаны только для плазматических клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов (в децидуальной ткани и периваскулярных инфильтратах плацентарного ложа) для подгрупп аллогенной беременности с развитием ПЭ по сравнению подгруппой беременностей с собственными ооцитами с развитием ПЭ.

Гистограмма 3

Экспрессия CD138 в периваскулярных областях плацентарного ложа в группах ЭКО-СМ, ЭКО-ДО, ЭКО-СО (клеток/5 полей зрения, тест Краскела-Уоллеса)*Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппами без ПЭ, $p < 0,05$. **Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппой IIIb, $p < 0,05$.

**Гистограмма 4**

Экспрессия CD8 в периваскулярных областях плацентарного ложа в группах ЭКО-СМ, ЭКО-ДО, ЭКО-СО (клеток/5 полей зрения, тест Краскела-Уоллеса) *Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппами без ПЭ, $p < 0,05$. **Различия, статистически достоверные по сравнению с подгруппой IIIb, $p < 0,05$.



*Характеристика экосомальной активности синцитиотрофобласта плаценты и
вневорсинчатого цитотрофобласта плацентарного ложа у пациенток в группах донации
ооцитов и сурrogатного материнства при развитии ПЭ*

В настоящее время не существует унифицированной процедуры детекции экзосом на гистологических срезах. Для этой цели нами была предложена иммуногистохимическая панель, позволяющая определить в клетки основные компоненты экзосом. К таким маркерам относятся тетраспанины CD9 и CD81, являющиеся обязательными белками мембран экзосом. Для детекции экзосом плацентарного происхождения используется маркер PLAP. С помощью PLAP в последние годы выделяют экзосомы (везикулы размером до 100 нм) плацентарного происхождения. Таким образом, обнаружение положительной корреляции между увеличением PLAP и увеличением содержания компонентов экзосом (CD9, CD81) может указывать на усиленное образование экзосом в клетках синцитиотрофобласта.

В нашем исследовании была установлена экспрессия PLAP в виде коричневого диффузного цитоплазматического окрашивания клеток для синцитиотрофобласта ворсин, париетального цитотрофобласта, а также для отдельных клеток вневорсинчатого цитотрофобласта плацентарного ложа. В клетках синцитиотрофобласта окрашивание было сконцентрировано на апоикальном полюсе клеток и в области щеточной каймы. С использованием морфометрической программы

Image12.1 была рассчитана оптическая плотность окрашивания для синцитиотрофобласта ворсин хориона, клеток париетального цитотрофобласта, клеток вневорсинчатого цитотрофобласта плацентарного ложа. Была показано достоверное уменьшение оптической плотности PLAP в синцитиотрофобласте в группах Ib, IIb и IIIb ($0,62 \pm 0,03$ против $0,33 \pm 0,01$ для подгрупп Ia и Ib, $0,71 \pm 0,02$ против $0,29 \pm 0,03$ для подгрупп IIa и IIb, $0,76 \pm 0,02$ против $0,35 \pm 0,01$ для подгрупп IIIa и IIIb), что согласуется с данными литературы (тест Краскела-Уоллеса, $p < 0,05$). При этом достоверной разницы между случаями при развитии ранней и поздней ПЭ обнаружено не было. Данные полученные для париетального цитотрофобласта и вневорсинчатого цитотрофобласта плацентарного ложа были статистически недостоверны (тест Краскела-Уоллеса, $p > 0,05$). В нашем исследовании маркер экзосомальных мембран тетраспанин CD81 определялся в виде коричневого диффузного цитоплазматического окрашивания клеток трофобласта с некоторой концентрацией в области цитолеммы. В ворсинах маркер определялся в клетках синцитиотрофобласта, в плацентарном ложе и в клетках вневорсинчатого цитотрофобласта маркер не определялся. Маркер экзосомальных мембран CD9 определялся в виде коричневого диффузного цитоплазматического окрашивания клеток трофобласта с некоторой концентрацией в области цитолеммы. В ворсинах маркер определялся в клетках синцитиотрофобласта, в плацентарном ложе в клетках вневорсинчатого цитотрофобласта маркер не определялся. Было показано достоверное уменьшение оптической плотности CD9 в подгруппах с развитием ПЭ. Оптическая плотность для группы I составила $0,19 \pm 0,03$ против $0,9 \pm 0,03$, для группы II $0,16 \pm 0,02$ против $0,10 \pm 0,05$, и для группы сравнения $0,17 \pm 0,02$ против $0,8 \pm 0,03$ (тест Краскела-Уоллеса, $p < 0,05$). Таким образом, при исследовании компонентов плацентарных экзосом нами было обнаружено, что значимая экспрессия и статистически достоверные изменения характерны только для синцитиотрофобласта ворсин. Было показано достоверное (тест Краскела-Уоллеса, $p < 0,05$) уменьшение оптической плотности компонентов экзосом плацентарного происхождения как в группах исследования, так и в группе сравнения при развитии ПЭ, что говорит о возможном участии плацентарных экзосом в патогенез ПЭ (Гистограмма 5).

Гистограмма 5

Оптическая плотность PLAP, CD81, CD9 в синцитиотрофобласте в исследуемых группах

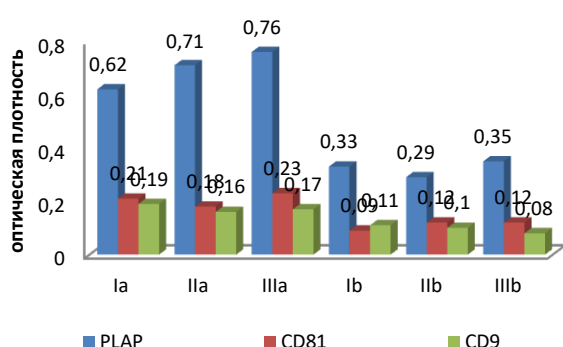
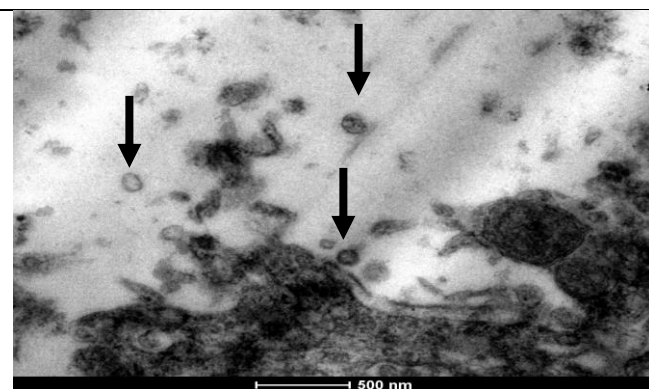


Рисунок 1

Трансмиссионная электронная микроскопия синцитиотрофобласта в области щеточный каймы (стрелками – вакуоли диаметром 50-93нм)



Трансмиссионная электронная микроскопия. При исследовании компонентов экзосом в клетках, для визуализации экзосом после их экзоцитоза в межворсинчатое пространство была проведена электронная микроскопия области щеточной каймы синцитиотрофобласта. Микрочастицы были обнаружены непосредственно в области щеточной каймы и представляли собой оптически полые везикулы размерами от 50 до 93 нм (Рисунок 1). Указанные размеры частиц, а также ко-экспрессия тетраспанинов CD9, CD81 позволяет отнести обнаруженные везикулы к классу малых экзосом, выполняющих транспортную функцию и реализующих межклеточное взаимодействие (Steven Ting-Yu Chuo, 2018). Таким образом, данные электронной трансмиссионной микроскопии подтверждают наличие секреторной активности синцитиотрофобласта, для более точной верификации секретом целесообразно проведение электронного иммуногистохимического исследования с использованием экзосомальных маркеров. Наше исследование продемонстрировало уменьшение оптической плотности маркеров плацентарных экзосом в подгруппах с развитием ПЭ. Возможно, именно изначально сниженная способность трофобласта к синтезу и выведению экзосом лежит в основе одного из патогенетических путей развития ПЭ, относящихся к группе плодовых факторов риска. Особо ценным является стереотипное уменьшение экзосомальной активности во всех подгруппах с развитием ПЭ, как при аллогенной беременности, так и при беременности с собственными ооцитами. Данное направление кажется весьма перспективным, т. к. секреция экзосом отмечена уже на стадии бластоцисты. В исследовании Vyas, P., Balakier, H., & Librach, C.L. (2019) показано, что секреция экзосом отсутствует у зрелых ооцитов метафазы II и начинается сразу же после оплодотворения. Возможность прогнозировать сложности в становлении иммунологической толерантности для трофобласта со сниженной секрецией экзосом позволяет на ранних сроках проводить неинвазивную селекцию эмбрионов для программ экстракорпорального оплодотворения.

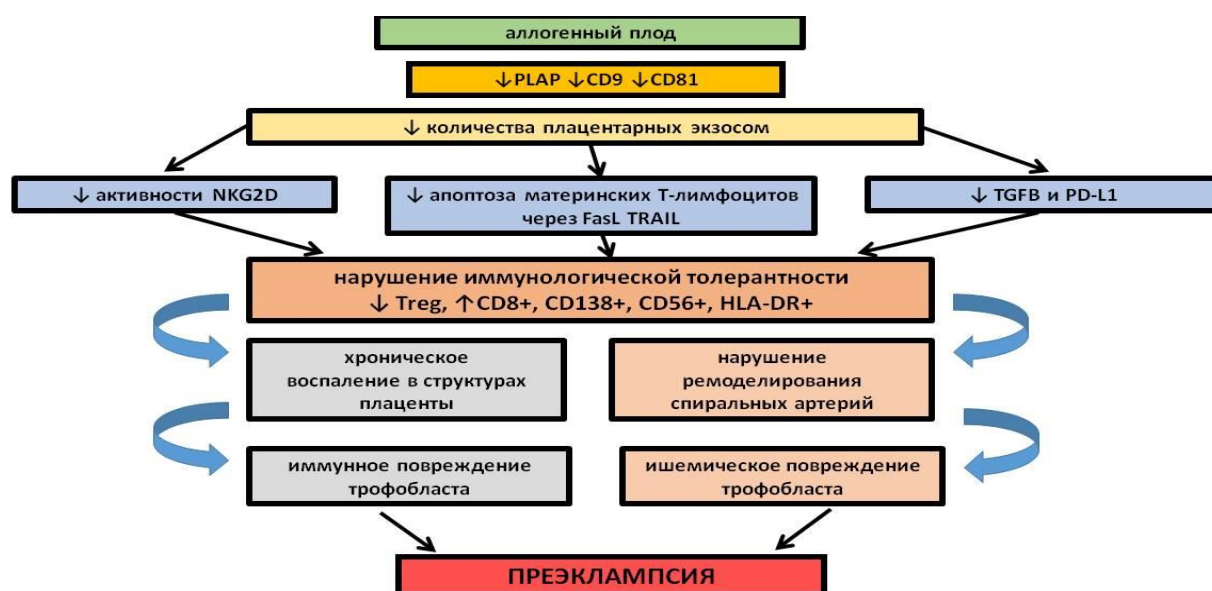


Рисунок 2. Схема патогенеза преэклампсии на фоне аллогенной беременности, базирующаяся на изменении экзосомальной активности трофобласта на основе полученных результатов и имеющихся данных литературы

Таким образом, изначально низкая секреторная активность синцитиотрофобласта или снижение ее к концу гестации приводит к уменьшению секреции плацентарных PLAP+ экзосом. По данным современной специализированной литературы снижение секреции экзосом приводит к подавлению апоптоза материнских Т-лимфоцитов, реализуемого через внешний фактор - Fas-лиганд (FasL) и TRAIL, увеличению цитотоксичности NK-клеток путем ингибирования NKG2D рецептора, уменьшение активации Т-регуляторных клеток при снижении количества экзосом, несущих TGFB и PD-L1 (Lundholm M, Schroder M, Nagaeva O, et al., 2014; Stenqvist AC, Nagaeva O., et al., 2013) (Рисунок 2). В результате нарушается иммунологическая привелегированность маточно-плацентарной области, формируются признаки иммунной альтерации структур плаценты и плацентарного ложа в виде очагов хронического иммунного воспаления и повреждения синцитиотрофобласта иммунного генеза. Нарушение ремоделирования спиральных артерий формирует фон для ишемического повреждения синцитиотрофобласта. В результате формируется значительное повреждение синцитиотрофобласта и выделение в кровотоки матери провоспалительных и антиангиогенных веществ, что формирует фон для развития преэклампсии.

ВЫВОДЫ

1. Исследование полиморфизма генов HLA II (DQA1, DQB1, DRB1) в парах мать-реципиент ооцитов - ребенок показало, что увеличение числа несовпадений по системе HLA II не ассоциировано с увеличением частоты развития ПЭ.
2. При развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности в плаценте наблюдаются достоверно более выраженные по сравнению с группой контроля массивные отложения фибриноида в межворсинчатом пространстве и базальной пластинке, образование перивиллезного фибриноида с лимфогистиоцитарной инфильтрацией, формирование хронического базального децидуита, хронического хориоамнионита, очагового виллита.
3. При развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности плацентарное ложе характеризуется достоверным усилением лимфогистиоплазмацитарной инфильтрации в периваскулярной области, увеличением количества МГК вневорсинчатого цитотрофобласта и нарушением ремоделирования спиральных и радиальных артерий по сравнению с контролем
4. Воспалительные инфильтраты в плаценте при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности характеризуются накоплением CD138+ плазматических клеток, CD8+Т-лимфоцитов, HLA-DR+дендритных клеток и CD56+ uNK-клеток, уменьшении количества CD25⁺/4⁺Treg клеток в участках контакта материнских и плодовых тканей, что может расцениваться как нарушение иммунологической толерантности в системе мать-

плод,

5. Воспалительные инфильтраты в плацентарном ложе при развитии ПЭ на фоне аллогенной беременности характеризуются накоплением CD8+T-лимфоцитов, CD56+ NK-клеток, CD138+ плазматических клеток, HLA-DR+дендритных клеток в периваскулярных областях радиальных артерий миометриального сегмента и строме плацентарного ложа.
6. Развитие ПЭ в группах аллогенной беременности и в группе беременностей с собственными ооцитами сопровождается уменьшением экзосомальной активности синцитиотрофобласта ворсин, что подтверждается снижением содержания количества PLAP+, CD9+, CD81+ экзосом в клетках синцитиотрофобласта.
7. Плацента и плацентарное ложе на фоне аллогенной беременности при развитии ПЭ отличаются от плаценты и плацентарного ложа при развитии ПЭ на фоне беременности после ЭКО с собственными ооцитами тенденцией к дальнейшему увеличению количества иммунных клеток в местах контакта материнских и плодовых тканей, при этом различия в количестве плазматических клеток и CD8+ T-лимфоцитов становятся статистически достоверными.
8. Важным механизмом патогенеза ПЭ является снижение экзосомальной активности синцитиотрофобласта, приводящее к нарушению иммунологической толерантности в системе мать-плод, что является стереотипным процессом как для аллогенной беременности, так и для беременности после ЭКО с собственными ооцитами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Соболева В.В., Трифонова Н.С., **Руденко Е.Е.**, Демура Т.А., Коган Е.А., Жарков Н.В., Жукова Э.В., Александров Л.С., Ищенко А.И.. Беременность после экстракорпорального оплодотворения с использованием аллогенных ооцитов у пациентки с синдромом потери плода и сочетанной формой тромбофилии // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. -Т.17,- выпуск 4,- М.-: 2018,- с. 134-140.
2. **Rudenko E.**, Demura T., Kogan E.,Trifonova N. Structural basis of complications in pregnancy using the donor egg in surrogate maternity // Virchows Archiv. XXXI International Congress of the IAP and 30th Congress of the ESP. 2018.P. S1–S340. P.40
3. Трифонова Н.С., **Руденко Е.Е.**, Демура Т.А., Коган Е.А., Жарков Н.В., Жукова Э.В., Александров Л.С., Ищенко А.И.. HELLP-синдром после экстракорпорального оплодотворения с использованием донорской яйцеклетки// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. -Т.17,- выпуск 3,- М.-: 2018,- с. 87-91.
4. **Руденко Е.Е.**, Трифонова Н.С. Демура Т.А., Коган Е.А., Жарков Н.В., Жукова Э.В., Александров Л.С.. Роль плацентарных экзосом в развитии осложнений беременности//

Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. -Т.17,- выпуск 2.,- М.: - 2018,- с. 89-96.

5. Трифонова Н.С., **Руденко Е.Е.**, Демура Т.А., Коган Е.А., Жарков Н.В., Жукова Э.В., Александров Л.С., Ищенко А.И.. Развитие сепсиса у беременной после экстракорпорального оплодотворения по программе «Суррогатное материнство» // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. -Т.17,- выпуск 5.,- М.: - 2018,- с. 85-89.
6. Evgeniya A. Kogan, **Ekaterina E. Rudenko**, Tatiana A. Demura, Nikolay V. Zharkov, Natalia S. Trifonova, Elvira V. Zhukova, Leonid S. Aleksandrov, Sofia N. Bayanova. **Structural, immunohistochemical and molecular features of placentas and placental sites after in vitro fertilization with donor eggs (surrogate motherhood)**// European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology -238 -2019 p.68–72.
7. Коган Е.А., Руденко Е.Е., Демура Т.А., Жарков Н.В., Трифонова Н.С., Баянова С.Н. **Патоморфологические особенности плацент и плацентарных площадок после экстракорпорального оплодотворения с применением донорской яйцеклетки**//Архив Патологии, т. 82, выпуск 1., - М.: - 2020, - с.23-29
8. Н.С.Трифопова, Г.Д.Каминский, А.В. Балацкий, Л.С.Александров, Э.В.Жукова, Е.А.Коган, Т.А. Демура, **Е.Е.Руденко**, А.И.Ищенко, Н.В.Жарков. Новые возможности прогнозирования гипертензивных осложнений у беременных после ЭКО с применением донорской яйцеклетки // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. -Т.18,- выпуск 3.,- М.: - 2019,- с.64-70.
9. **Rudenko E.**, Demura T., Kogan E.,Trifonova N. The study of polymorphism of HLA genes as a predictor of the development of hypertensive complications of pregnancy// Virchows Archiv. XXXI International Congress of the IAP and 30th Congress of the ESP. 2019.P. S1–S449. P.61
10. **Rudenko E.**, Demura T., Kogan E.,Trifonova N. Features of PLAP expression in placental structures during allogenic pregnancy (surrogate maternity, oocyte donation) on the background of pre-eclampsia, as an indicator of exosomal trophoblast activity// Virchows Archiv. XXXI International Congress of the IAP and 30th Congress of the ESP. 2018.P. S1–S449. P.61
11. **Руденко Е.Е.**, Коган Е.А., Демура Т.А., Трифоновой Н.С., Жаркова Н.В. **Особенности экспрессии HLA-DR в плаценте при развитии ПЭ на фоне экстракорпорального оплодотворения с применением донорской яйцеклетки**// Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. т. 82, выпуск 1., - М.: - 2020, - с.7-11

