

УДК 618.36-008.64+(611.814.1:616-008.62)613.24

РОЛЬ NF-κB И ЦИТОКИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ЖЕНЩИН С ОЖИРЕНИЕМ НА ФОНЕ ДИСФУНКЦИИ ГИПОТАЛАМУСА**И.В.Жуковец, С.С.Целуйко***Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95***РЕЗЮМЕ**

Изучена роль транскрипционного ядерного фактора-карра В (NF-κB) и цитокинов в формировании плацентарной недостаточности у 64 беременных с ожирением на фоне дисфункции гипоталамуса (основная группа). Группу контроля составили 30 условно здоровых беременных. Уровень TNF-α, IL-1β и IL-10 определяли в гомогенате плаценты (38-40 недель). Во всех случаях проведено морфологическое исследование плаценты электронно-микроскопическими и общегистологическими методами. У беременных основной группы в сравнении с контролем выявлено увеличение TNF-α до 68,7±0,79 пг/мл (p=0,007) и IL-1β до 93,7±0,92 пг/мл (p=0,021) в гомогенате плаценты, снижение IL-10 до 19,7±1,02 пг/мл (p=0,000), на фоне повышения активности NF-κB в 1,2 раза (p=0,007), что сопровождалось нарушением созревания ворсинчатого хориона, инволютивно-дистрофическими изменениями структур хориона, микроциркуляторными нарушениями. Полученные результаты свидетельствуют, что развитие плацентарной недостаточности у женщин с ожирением на фоне дисфункции гипоталамуса ассоциированы с иммунными изменениями, обусловленными активацией NF-κB с последующим выбросом цитокинов, имеющих влияние на процессы ангиогенеза, коагуляции и апоптоза на уровне плаценты, с формированием первичной, а при срыве компенсаторных процессов – хронической плацентарной недостаточности.

Ключевые слова: дисфункция гипоталамуса, ожирение, NF-κB, цитокины.

SUMMARY**ROLE OF NF-κB AND CYTOKINES IN THE FORMATION OF PLACENTAL INSUFFICIENCY IN OBESE WOMEN WITH HYPOTHALAMIC DYSFUNCTION****I.V.Zhukovets, S.S.Tseluyko***Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The role of nuclear factor kappa B (NF-κB) and cytokines in the formation of placental insufficiency in 64 pregnant women with obesity and hypothalamic dysfunction (the main group) was studied. 30 relatively healthy women made the control group. The level of TNF-α, IL-1β and IL-10 were defined in the homogenate of placenta (38-40 weeks). In all cases the morphological study of placenta was done with elec-

tronic-microscopic and histological methods. The pregnant women of the main group in comparison with the control one were revealed to have the increase of TNF-α till 68.7±0.79 pg/mL (p=0.007) and of IL-1β till 93.7±0.92 pg/mL (p=0.021) in the homogenate of placenta, the reduction of IL-10 till 19.7±1.02 pg/ml (p=0.000), against 1.2 times increase in the activity of NF-κB factor (p=0.007), which was accompanied by a violation of maturation of chorionic villi, involutive and degenerative changes in the structure of the chorion, microcirculatory disturbances. The obtained results indicate that the development of placental insufficiency in obese women with hypothalamic dysfunction are associated with immune changes caused by the activation of NF-κB followed by the release of cytokines which influence the processes of angiogenesis, coagulation and apoptosis in placenta, with the formation of the primary and under the failure of compensatory processes chronic placental insufficiency.

Key words: hypothalamic dysfunction, obesity, NF-κB, cytokines.

По данным мета-анализа за 2014 год, более 1,4 млрд взрослых людей во всем мире имеют избыточный вес, 500 млн – ожирение, в России страдает ожирением 25% населения и 30% имеет избыточную массу тела [7]. Данная проблема сопряжена с дисфункцией гипоталамуса (ДГ) и нарушениями в центрах энергетического обмена [4, 9].

Женщины с ожирением на фоне ДГ составляют группу высокого акушерского и перинатального риска. Беременность при ожирении сопровождается многократным увеличением риска развития гестационного сахарного диабета, преэклампсии и плацентарной недостаточности (ПН) [4, 6].

Несмотря на освещенность проблемы, формирование ПН у беременных с ожирением на фоне ДГ остается недостаточно изученным, данные работы единичны и основаны лишь на морфологическом исследовании плаценты. Вместе с тем патогенетические механизмы, связанные с ожирением, могут иметь значение в формировании ПН.

Одним из ключевых факторов имеющим значение в развитии ожирения является транскрипционный ядерный фактор (NF-κB) [3]. NF-κB – белок, регулирующий транскрипцию генов, то есть активность синтеза новых белков в клетке, что является критической функцией в механизмах развития и функционирования [5]. NF-κB модулирует экспрессию более чем 150 генов, вовлеченных в процессы апоптоза, ангиогенеза, дифференцировки и пролиферации [5]. NF-κB стимулирует экспрессию провоспалительных цитокинов

(TNF- α , IL-6 и IL-1 β) в адипоцитах и макрофагах, которые ингибируют передачу инсулинового сигнала, вызывают инсулинорезистентность и ожирение [3, 5].

Исследования данного транскрипционного фактора, применительно к клиническим заболеваниям, сравнительно новы и противоречивы [3]. Учитывая регулируемую роль NF- κ B, участвующего в транскрипции генов синтеза цитокинов и апоптоза, можно полагать, что изменение его активности приводит к существенным сдвигам метаболических процессов в плаценте и формированию ПН.

Цель исследования – оценить роль NF- κ B и цитокинов в формировании ПН у беременных с ожирением на фоне ДГ наряду с морфологическим исследованием плаценты.

Материалы и методы исследования

Проведен анализ течения беременности и исхода родов у 72 беременных женщин с ожирением на фоне ДГ – основная группа. Группу контроля составили 30 условно здоровых беременных. В основной группе беременных в 8 случаях произошел самопроизвольный аборт при сроке 7-8 недель. В связи с этим, анализ течения беременности во втором и третьем триместрах в основной группе изучали у 64 беременных. Обследование беременных женщин проводилось на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения Амурской области «Амурская областная клиническая больница. Областной перинатальный центр» и Государственного автономного учреждения здравоохранения Амурской области «Городская клиническая больница. Городской родильный дом». Исследования проводили с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и правилами клинической практики в РФ, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ №266 от 19.06.2003 г., от всех здоровых и больных лиц было получено информированное согласие.

Для приготовления гомогената плаценту забирали в течение 10-15 мин после родов. Её поверхность со стороны базальной пластинки отмывали большим количеством физиологического раствора. Плодовая часть плаценты срезалась скальпелем пластинками площадью 2-3 см и толщиной не более 1 мм. Кусочки ткани помещали в 200 мл физиологического раствора, отмывали от клеток крови, перемешивая в течение 15 мин на магнитной мешалке. Для получения экстрактов отмывые кусочки плаценты слегка подсушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали, растирали пестиком в фарфоровой ступке и гомогенизировали до однородной массы. К полученному гомогенату добавляли физиологический раствор в объеме, равном изначальной массе ткани (на 1 г – 1 мл физиологического раствора). Взвесь помещали в пластиковые пробирки Falcon и подвергали замораживанию при -20°C в течение суток. Затем гомогенат размораживали и центрифугировали при 4000 g при температуре +4°C.

Надосадочную жидкость разливали мелкими аликвотами и хранили при -20°C до проведения иммуноферментного анализа (ИФА).

Уровень TNF- α , IL-1 β и IL-10 в гомогенате плаценты (38-40 недель) определяли с помощью наборов «Интерлейкин 1-ИФА-БЕСТ», «альфа-TNF-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), «Интерлейкин 10» (BenderMed Systems, США), активность NF- κ B – с помощью наборов «Cayman» (США).

Для микроскопического исследования использовали парафиновые среды плаценты, фиксированные в 10% растворе нейтрального формалина с последующей окраской гематоксилином и эозином, ШИК-реактивом по методу Мак-Мануса. Для получения полутонких и ультратонких срезов кусочки плаценты из нескольких зон фиксировали в 2,5% глютаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере по методике J.J.Coalson et al. (1986), с последующей дофиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB NOWA 8800 (Швеция). Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим по методу M.Sato, E.Shamoto (1973). Электронно-микроскопическое исследование и фотографирование проводили на электронном микроскопе Technai G2 Spirit Twin (Голландия). Микроскопирование и фотографирование препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином и ШИК-реактивом по методу Мак-Мануса, а также полутонких срезов, осуществляли на фотомикроскопе Microphot-FXA (NIKON, Япония). Обработку материала для растровой электронной микроскопии проводили по методу Ю.А.Ровенского (1979), просмотр препаратов осуществлялся на микроскопе S3400 (Япония).

Математическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel и пакета статистических программ Statistica 6.0. Для определения достоверности различий количественных показателей в группах использовался критерий Манна-Уитни и Стьюдента. Принимались во внимание уровни значимости (p) – 0,05; 0,01; 0,001. Исследование связи между количественными признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена (r): $r=0,7-1$ – сильная зависимость; $r=0,69-0,3$ – умеренная зависимость; $r>0,29$ – слабая зависимость. Точное вычисление значимости различных долей (процентов) проводилось по методу углового преобразования Фишера. Результат считался достоверным при $p(\phi)<0,05$; $<0,01$; $<0,001$. Для проведения сравнительного анализа эффективности диагностических показателей использовался Receiver Operator Characteristic анализ. Судить о качестве теста можно по экспертной шкале для значений площади под кривой (AUC), где 0,9-1 – отличное, 0,8-0,9 – очень хорошее, 0,7-0,8 – хорошее, 0,6-0,7 – среднее, менее 0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что индекс массы тела в основной группе был $32,44\pm 0,31$ кг/м², в контрольной – $21,8\pm 0,28$

кг/м² (p=0,000).

Частота осложнений настоящей беременности в основной группе составила 212,5%, что было выше, чем в контрольной в 4,3 раза (50,0%). В первом триместре беременность осложнилась самопроизвольным абортom у 8 (11,1%), угрожающим абортom у 28,1% женщин. В контрольной группе угрожающий аборт был у 10% (p_φ=0,02), самопроизвольного аборта не зафиксировано. Анемия диагностирована у каждой четвертой беременной основной группы, что было достоверно выше, чем в контрольной (25 и 10%, соответственно, p_φ=0,03). Преэклампсия установлена у 35,9% беременных основной группы, что было достоверно выше, чем в контрольной (3,3%, p_φ=0,006), из них у 21 (91,3%) – средней тяжести, у 2 (8,7%) – тяжелая. Внутритробная гипоксия плода и ПН выявлены у 40,6% беременных женщин основной группы, в контрольной – у 6,6% (p_φ=0,008). Предлежание плаценты в 3 триместре было у 14,1% беременных основной группы, в контрольной – у 3,3% (u_p=1,83, p_φ=0,03). Нужно отметить, что во втором триместре предлежание хориона диагностировано у 23 (35,9%) беременных основной группы. Замедление роста плода выявлено у 6,3% беременных в основной группе, в контрольной – не установлено. Гестационный сахарный диабет диагностирован у 3,1% беременных основной группы.

Уровень цитокинов в гомогенате плаценты у рожениц основной (n=64) и контрольной (n=30) групп отражен в таблице.

Таблица
Уровень цитокинов и активность NF-kB в гомогенате плаценты у рожениц в исследуемых группах

Показатели, пг/мл	Контрольная группа	Основная группа	p
TNF-α	65,74±0,74	68,7±0,79	0,007
IL-1β	90,76±0,81	93,7±0,92	0,021
IL-10	28,02±0,54	19,7±1,02	0,000
NF-kB	3,33±0,07	4,17±0,29	0,009

Согласно данным, представленным в таблице, у рожениц основной группы уровень TNF-α и IL-1β в гомогенате плаценты был достоверно выше (p=0,007 и p=0,021), IL-10 – достоверно ниже (p=0,000), чем в контрольной. При этом у IL-10 была наибольшая степень достоверности. В основной группе отношение TNF-α/IL-10 в гомогенате плаценты составило 4,72±0,5, в контрольной в 2 раза ниже – 2,39±0,07 (p=0,000).

Обнаруженные количественные изменения в спектре цитокинов на локальном уровне свидетельствуют о их влиянии на течение и исход беременности. На сегодняшний день доказано, что TNF-α и IL-1β активируют внутрисосудистую коагуляцию во вновь образовавшихся материнских сосудах под действием того же IL-1β, как ангиогенного фактора [1, 2], что нарушает кровоток на уровне плаценты. Кроме того,

TNF-α вызывает апоптоз трофобласта [8]. IL-10 принадлежит главная роль в подавлении избыточной продукции провоспалительных цитокинов [1] – он обладает мощным противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, соответственно, на фоне снижения IL-10 уровень провоспалительных цитокинов будет расти. В исследованиях *in vivo* показано, что снижение продукции IL-10 может уменьшать эффективность фетопротективных механизмов, направленных на защиту плода от деструктивных факторов материнского организма и приводить к нарушениям процессов имплантации [2, 8].

Активность NF-kB в плаценте у рожениц основной (n=64) и контрольной (n=18) групп отражена в таблице. Согласно приведенным данным, активность NF-kB в плаценте у рожениц основной группы была выше в 1,2 раза, в сравнении с контрольной (p=0,009). При определении корреляции между NF-kB и цитокинами в аспирате из полости матки выявлена сильная корреляция во всех случаях – между NF-kB и TNF-α (r=0,76; p<0,001), NF-kB и IL-1β (r=0,77; p<0,001) и между NF-kB и IL-10 (r=0,79; p<0,001), что определяло компенсаторную воспалительную реакцию на уровне плаценты при доношенной беременности и являлось основным патогенетическим механизмом формирования ПН. Цитокины, регулируемые NF-kB, представляют собой систему, нарушения в которой могут привести к срыву саморегуляции, снижению иммунотолерантности, нарушению процессов ангиогенеза и апоптоза, что приобретает особое значение в развитии и функционировании плаценты.

При проведении анализа эффективности показателя NF-kB в гомогенате хориона для данного заболевания, получили площадь под кривой AUC NF-kB = 0,82 (чувствительность – 86%, специфичность – 82%), что говорило об очень хорошей клинической значимости NF-kB в гомогенате плаценты (рис. 1).

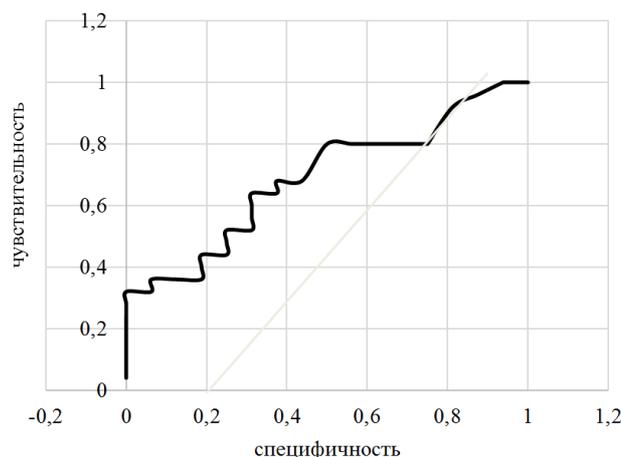


Рис. 1. ROC-кривая NF-kB в гомогенате плаценты.

Полученные данные позволяют заключить, что NF-kB принимает непосредственное участие в процессах имплантации, а его высокий уровень ассоциируется с угрожающим самопроизвольным абортom и формированием ПН.

При морфологическом исследовании зрелой пла-

центры от женщин с ожирением на фоне ДГ (n=64) выявлены нарушения архитектоники ворсинчатого дерева, которые выражались в неравномерном распределении и утолщении створчатых и промежуточных ворсин, умеренном уменьшении числа терминальных ворсин (рис. 2). Строма промежуточных и терминальных ворсин развита умеренно. В промежуточных ворсинах она более плотная, тогда как в терминальных – более рыхлая. На периферии имелись уплотненные участки соединительнотканых волокнистых структур, расположенные вокруг сосудов. Также встречались очаги фиброза и отека (рис. 2).

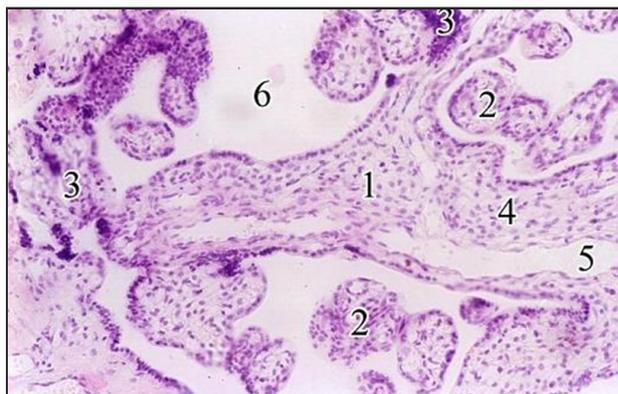


Рис. 2. Зрелая плацента женщины основной группы, беременность 38-39 недель. 1 – промежуточная ворсинка, 2 – терминальная ворсинка, 3 – синцитиальные узелки, 4 – строма ворсинки, 5 – кровеносный сосуд, 6 – межворсинчатое пространство. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: 300.

В промежуточных ворсинах просвет артериальных сосудов сужен. В их стенке обнаруживалось значительное число гладких миоцитов, вены имели широкий просвет. Большое число сосудов было полнокровным (рис. 2) располагалось в периферической зоне ворсинок.

Синцитиотрофобласт однослойный. Его толщина в ядерной зоне увеличивалась до $9,2 \pm 0,03$ усл. ед. (в контрольной группе – $5,6 \pm 0,05$ усл. ед., $p < 0,05$), а в безъядерной (синцитиокапиллярной) зоне – до $2,5 \pm 0,02$ усл. ед. (в контрольной группе – $1,8 \pm 0,03$ усл. ед., $p < 0,05$). Ядра крупные. Хроматин представлен глыбками конденсированного гетерохроматина различного размера (рис. 2, 3). Ядра в синцитиотрофобласте расположены неравномерно. Часто встречались синцитиоядерные узелки, образованные гиперхромными ядрами, что способствовало образованию межворсинчатых ядерных «мостиков», увеличивающих плотность межворсинчатого пространства.

В некоторых случаях встречались объединения терминальных ворсинок в единый конгломерат между собой и с промежуточной ворсинкой (рис. 3). В результате снижался доступ материнской крови к ворсинкам хориона. На нарушение обменных процессов в плаценте также указывало повышенное количество ШИК-положительных гранул в стенке кровеносных сосудов, в базальной мембране и по ходу волокон в соединительной ткани (рис. 3).

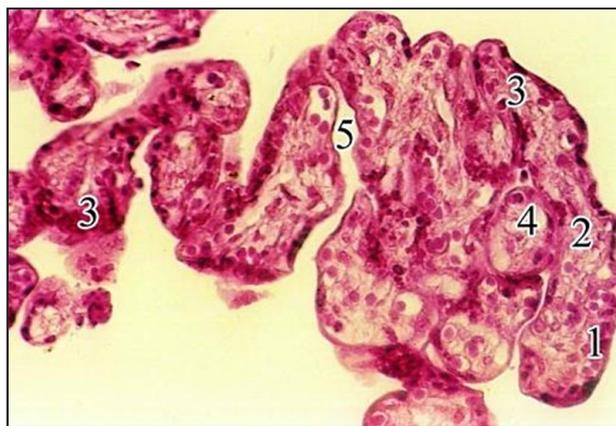


Рис. 3. Зрелая плацента женщины основной группы, беременность 38-39 недель. 1 – синцитиотрофобласт, 2 – строма ворсинки, 3 – ШИК – положительные гранулы, 4 – кровеносный капилляр, 5 – межворсинчатое пространство. Окраска: ШИК-реакция по Мак-Манусу. Увеличение: 600.

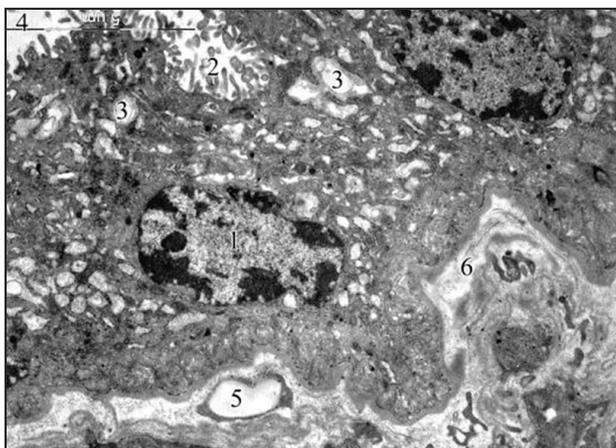


Рис. 4. Зрелая плацента женщины основной группы, беременность 38-39 недель. 1 – ядро синцитиотрофобласта, 2 – микроворсинки, 3 – вакуоли, 4 – межворсинчатое пространство, 5 – кровеносный сосуд, 6 – базальная мембрана. Электронная микроскопия. Увеличение: 13500.

При электронно-микроскопическом исследовании были отмечены изменения в ультраструктуре синцитиотрофобласта и базальной пластины. Обнаруживалась умеренная вакуолизация цитозоля синцитиотрофобласта. Ядра обычной овальной формы, имели неровные контуры. Гетерохроматин был расположен в виде глыбок по периферии ядра. В базальной части обнаруживались интердигитации. Базальная мембрана неравномерная по толщине, прерывистая, с очаговым накоплением основного вещества (рис. 4).

Следовательно, структурные особенности плацент у женщин с ожирением на фоне ДГ имеют остаточные проявления компенсированной первичной ПН, которая в дальнейшем при срыве механизмов компенсации приводит к развитию хронического процесса.

Заключение

Развитию ПН у женщин с ожирением на фоне ДГ приводят иммунные изменения – активация NF-kB с

последующим выбросом цитокинов, имеющих влияние на процессы ангиогенеза, коагуляции и апоптоза на уровне хориона и плаценты, с формированием первичной, а при срыве компенсаторных процессов – хронической ПН. Структурные нарушения плаценты, вызванные прогрессированием ПН, связаны с нарушением созревания ворсинчатого хориона (наличие ворсин разных размеров, различной степени зрелости и васкуляризации), инволютивно-дистрофическими изменениями структур хориона (увеличение количества фибриноида, фиброз стромы ворсин, сужение межворсинчатого пространства, деструкция и вакуолизация микроворсинок и органелл трофобласта ворсин), микроциркуляторными нарушениями (снижение показателя васкуляризации ворсин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевская И.А. Механизмы и закономерности развития нарушений морфофункционального состояния плаценты и кислородтранспортной функции периферической крови рожениц и крови пуповины при обострении герпес-вирусной инфекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Иркутск, 2011. 50 с.
2. Бурменская О.В. Молекулярно-генетические маркеры иммунного ответа при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2014. 34 с.
3. Гунько В.О., Погорелова Т.В., Линде В.А. Участие фактора NF- κ B и его регуляторных белков в развитии осложнений беременности // Проблемы репродукции. 2013. Т.19, №2. С.88–91.
4. Жуковец И.В., Целуйко С.С. Особенности формирования хориона у женщин с дисфункцией гипоталамуса // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.47. С.91–97.
5. Кайдашев И.П. Активация ядерного фактора κ B как молекулярной основы патогенеза метаболического синдрома // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 2013. №3. С. 65–72.
6. Макаров И.О., Боровкова Е.И., Казаков Р.Д. Характер метаболических изменений у беременных с ожирением // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2013. №3. С.38–41.

7. Подзолкова Н.М., Колода Ю.А., Подзолков А.В. Терапия бесплодия у пациенток с ожирением: современный взгляд на проблему // Проблемы репродукции. 2012. Т.18, №3. С.37–40.

8. Haider S., Knöfler M. Human Tumour Necrosis Factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium // Placenta. 2009. Vol.30. №2. P.111–123.

9. Brain Innate Immunity Regulates Hypothalamic Arcuate Neuronal Activity and Feeding Behavior / W.L.Reis [et al.] // Endocrinology. 2015. Vol.156, №4. P.1303–1315.

REFERENCES

1. Andrievskaya I.A. Mechanisms and patterns of violations of morphofunctional state of the placenta and the oxygen-function peripheral blood of pregnant women and umbilical cord blood during acute herpes virus infection: abstract of thesis...PhD of biological sciences. Irkutsk; 2011 (in russian).

2. Burmenskaya O.V. Molecular genetic markers of the immune response in inflammatory diseases of the female reproductive system: abstract of thesis...PhD of biological sciences. Moscow; 2014 (in russian).

3. Gun'ko V.O., Pogorelov T.V., Linde V.A. *Problemy reproduksii* 2013; 19(2):88–91.

4. Zhukovets I.V., Tseluyko S.S. Chorion formation peculiarities in women with hypothalamus dysfunction. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2013; 47: 91–97 (in russian).

5. Kaidashev I.P. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya* 2013; 3:65–72.

6. Makarov I.O., Borovkov E.I., Kazakov R.D. *Rossiyskiy vestnik akushera -ginekologa* 2013; 3:38–41.

7. Podzolkova N.M., Koloda Yu.A., Podzolkov A.V. *Problemy reproduksii* 2012; 18(3):37–40.

8. Haider S., Knöfler M. Human Tumour Necrosis Factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009; 30(2):111–123.

9. Reis W.L., Yi C.X., Gao Y., Tschöp M.H., Stern J.E. Brain Innate Immunity Regulates Hypothalamic Arcuate Neuronal Activity and Feeding Behavior. *Endocrinology* 2015; 156(4):18–49. 1303–1315.

Поступила 07.04.2015

Контактная информация

Ирина Валентиновна Жуковец,

кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии,

Амурская государственная медицинская академия,

675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.

E-mail: zhukovec040875@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Irina V. Zhukovets,

MD, PhD, Associate Professor of Department of Obstetrics and Gynecology,

Amur State Medical Academy,

95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: zhukovec040875@mail.ru