

А.Ю. КРИВОРУЧКО,
В.А. АКСЕНЕНКО, А.Н. КВОЧКО,
Р.В. ПАВЛОВ

Кафедра акушерства и гинекологии
Ставропольской государственной
медицинской академии

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КУЛЬТУРОЙ ВОРСИН ХОРИОНА БОЛЬНЫХ ПОЗДНИМ ГЕСТОЗОМ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Для установления роли цитокинов в патогенезе позднего гестоза изучена продукция ИЛ1 β , ИЛ4, ИЛ6 и TNF α культурой ворсин хориона здоровых и больных поздним гестозом женщин при воздействии гипоксии. Полученные результаты свидетельствуют о наличии выраженных изменений продукции цитокинов ворсинами хориона под действием гипоксии, связанных со степенью тяжести позднего гестоза. Это позволяет считать плаценту при позднем гестозе источником повреждающих эндотелий факторов – цитокинов.

Неясность этиологии, отсутствие единого взгляда на патогенез, непредсказуемость клинического течения – основные причины того, что поздний гестоз (ПГ) был и остается наиболее тяжелым осложнением беременности. Даже в развитых странах гестозом страдают до 7% беременных, и заболеваемость, несмотря на все успехи современного акушерства, не имеет тенденции к снижению.

Для объяснения причины развития ПГ было предложено большое количество различных теорий, зачастую противоречивых. После многочисленных исследований остались всего четыре: теория плацентарной ишемии, теория токсического воздействия липопротеинов очень низкой плотности, теория иммунной дезадаптации и теория генетической предрасположенности [5].

Наиболее доказанной считается теория плацентарной ишемии [3, 8]. Согласно основным ее положениям, важную роль играет нарушение плацентарного кровообращения. По современным данным, патология спиральных артерий матки, развившаяся в результате нарушения плацентации, приводит к локальной ишемии ворсинчатого хориона плаценты [6, 9], что сопровождается выработкой в этом участке медиаторов, вызывающих повреждение эндотелия, клинически проявляющееся гипертензией, протеинурией и отеками [4]. Среди веществ, способных реализовать синдром генерализованной эндотелиальной дисфункции, в последнее время все больший интерес привлекают цитокины, например, такие, как интерлей-

кин 1 β (ИЛ1 β) и туморнекротический фактор α (TNF α). Их выработка *in vitro* синцитиотрофобластом и другими клетками хориальных ворсин, взятых из плацент здоровых родильниц, усиливается в состоянии гипоксии [2]. Цитокинпродуцирующая функция хориона в состоянии гипоксии как *in vitro*, так и *in vivo* определяется исходным состоянием активируемых клеток, которое, в свою очередь, отражает условия их существования в организме матери, степень реализации и резервы задействованных механизмов ответа на гипоксию. В таком случае продукция цитокинов в количественном отношении связана со степенью тяжести гестоза и зависит от того, в каком состоянии находилась плацента к моменту родов.

Для выяснения роли цитокинового обмена в патогенезе ПГ мы поставили перед собой задачу изучить, как в ответ на гипоксию меняется продукция культурой ворсин хориона указанных выше цитокинов, а также интерлейкина-4 (ИЛ4) и интерлейкина-6 (ИЛ6), взятых из плацент родильниц с ПГ различной степени тяжести.

Методы исследования

С целью исключения сочетанных форм ПГ на основании клинического обследования нами были выбраны 20 здоровых родильниц, 20 родильниц с легкой и 20 с тяжелой формой позднего гестоза. Общими критериями отбора служили: возраст от 18 до 30 лет, предстоящие первые срочные роды, отсутствие фоновой экстрагенитальной и гинекологи-



Содержание цитокинов в ворсинах хориона на момент родоразрешения

Цитокин	Здоровые, $M \pm t$ ($n=20$)	Больные ПГ	
		Легкая форма, $M \pm t$ ($n=20$)	Тяжелые формы, $M \pm t$ ($n=20$)
ИЛВ, пкг/г ткани	819 ± 13	$612 \pm 23^{***}$	$484 \pm 22^{***} \#\#$
ИЛ4, пкг/г ткани	1953 ± 84	$2438 \pm 144^{**}$	$1687 \pm 65^{***} \#$
ИЛ6, пкг/г ткани	1585 ± 48	$732 \pm 31^{***}$	$1298 \pm 70^{***} \#\#$
ТНФа, пкг/г ткани	4914 ± 129	$6586 \pm 150^{***}$	$3369 \pm 149^{***} \#\#$

Статистическая значимость различий с данными группы здоровых обозначена:

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Статистическая значимость различий с данными группы больных легкой формой ПГ обозначена:

– $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ и ### – $p < 0,001$.

ческой патологии, отсутствие осложнений беременности, не связанных с ПГ.

Здоровыми считались женщины, не имеющие любых клинических и лабораторных признаков ПГ, других осложнений беременности, родов и раннего послеродового периода.

Диагноз легкой формы ПГ ставился при наличии у беременной отеков, не исчезающих после 12-часового отдыха в горизонтальном положении; протеинурии 0,033-1,0% в разовой пробе мочи; повышения систолического и диастолического АД после 20 недель беременности более чем на 15% по сравнению с исходным до беременности. Описанная клиническая картина соответствует нефропатии I.

Тяжелые формы ПГ, соответствующие нефропатии III и преэклампсии, диагностировались при присоединении к клинике легкой формы хотя бы одного из следующих признаков: устойчивого повышения систолического АД более 160 мм. рт. ст. или диастолического более 110 мм. рт. ст.; массивной протеинурии более 5% за 24 часа; олигурии менее 500 мл/сут; неврологической симптоматики в виде головной боли, боли в эпигастральной области, нарушений зрения; синдрома задержки развития плода.

Роды у всех женщин из групп здоровых и больных легкой фор-

мой ПГ закончились через естественные родовые пути рождением живых доношенных детей массой от 3000 до 4600 г. В группе больных тяжелыми формами ПГ 11 женщин были родоразрешены путем операции кесарева сечения, у 8 детей была диагностирована внутриутробная гипотрофия I-II степени.

Объектом исследования служила родившаяся плацента. Для подготовки образцов и моделирования воздействия гипоксии мы использовали модифицированную нами методику, описанную D.F. Benyo, T.M. Miles и K.P. Conrad (1997). После удаления створчатых ворсин, децидуальной и амниотической оболочек хориальную ткань измельчали на кусочки массой 5-10 мг и промывали тремя сменами раствора Хенкса. После этого навеску измельченной ткани массой 500 мг гомогенизировали в фарфоровой ступке, из гомогената цитокины экстрагировали забуференным фосфатным буфером физиологическим раствором в соотношении 1:10 с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин. Для исследования отбиралась надосадочная жидкость. Условия гипоксии создавались путем инкубации в течение 24 часов в термостате, разогретом до 37 градусов, при непрерывном встряхивании навески измельченной ткани массой 500 мг в герметич-

но закрытой пластиковой пробирке, заполненной 3,5 мл среды 199 с добавлением 350 мкл инактивированной в течение 30 минут при 56 градусах сыворотки крови IV группы здоровых небеременных женщин и гентамицина в концентрации 60 мкг/мл. По завершении инкубации после промывания в 3-х сменах раствора Хенкса была произведена экстракция цитокинов по описанной выше методике.

В подготовленных образцах определялась концентрация ИЛ1В, ИЛ4, ИЛ6 и ТНФа методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами производства ТОО "Протеиновый контур", г. Санкт-Петербург. Результаты считывались планшетным фотометром iEMS Reader MF производства фирмы Labsystems. Полученные данные обрабатывались с помощью двустороннего критерия Стьюдента в программе Primer of Biostatistics 4.03 для Windows'95 на IBM-совместимом компьютере. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Уровень ИЛ1В с высокой степенью достоверности различался во всех трех группах (табл. 1). Наименьшее количество цитокина отмечено у больных тяжелыми формами ПГ – от 342 до 606 пкг/г ткани; наибольшее – у здоровых женщин (741-887 пкг/г ткани). У

Содержание цитокинов в ворсинах хориона после воздействия гипоксии

Цитокин	Здоровые, $M \pm m$ ($n=20$)	Больные ПГ	
		Легкая форма, $M \pm m$ ($n=20$)	Тяжелые формы, $M \pm m$ ($n=20$)
ИЛ β , пкг/г ткани	2010 $\pm$ 183	1150 $\pm$ 81***	281 $\pm$ 11***###
ИЛ4, пкг/г ткани	5333 $\pm$ 241	10410 $\pm$ 264***	16149 $\pm$ 231*###
ИЛ6, пкг/г ткани	6298 $\pm$ 225	5614 $\pm$ 219*	10250 $\pm$ 177***###
ТНФ α , пкг/г ткани	6623 $\pm$ 94	4657 $\pm$ 96***	1549 $\pm$ 79***###

Статистическая значимость различий с данными группы здоровых обозначена:

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$.

Статистическая значимость различий с данными группы больных легкой формой ПГ обозначена:

– $p < 0,001$.

больных легкой формой ПГ содержание ИЛ β колебалось от 482 до 683 пкг/г ткани.

Количество ТНФ α в ворсинах хориона также было различным во всех трех группах с высокой степенью достоверности (табл.1). Высокий уровень цитокина отмечен в группе больных легкой формой ПГ (от 5892 до 6968 пкг/г ткани). Наименьшее содержание было у больных тяжелыми формами – 2656-4426 пкг/г ткани. У здоровых беременных количество ТНФ α колебалось от 4091 до 5608 пкг/г ткани.

Концентрация ИЛ4 достоверно различалась во всех трех группах обследованных (табл. 1). Наибольшее количество отмечено у больных легкой формой ПГ – 1702-3206 пкг/г ткани; наименьшее – у больных тяжелой формой (1302-2153 пкг/г ткани). Среди здоровых пациенток уровень цитокина колебался от 1307 до 2271 пкг/г ткани.

Уровень ИЛ6 с высокой степенью достоверности различался во всех трех группах (табл. 1). Минимальное количество отмечено у больных легкой формой ПГ (от 501 до 862 пкг/г ткани). Максимальное содержание цитокина было у здоровых женщин (1294-1893 пкг/г ткани). В группе больных тяжелыми формами ПГ концентрация составляла от 834 до 1708 пкг/г ткани.

Наибольшее количество ИЛ β

после воздействия гипоксии (табл. 2) определялось в ворсинах хориона плацент здоровых женщин (от 1297 до 3389 пкг/г ткани); наименьшее – у больных тяжелыми формами ПГ (221-351 пкг/г ткани). У больных легкой формой ПГ содержание ИЛ β составляло от 827 до 1798 пкг/г ткани.

Максимальная концентрация ИЛ4 после воздействия гипоксии (табл. 2) отмечена у больных легкой формой ПГ – от 8861 до 12406 пкг/г ткани. Минимальным количеством было у здоровых женщин (4188-6689 пкг/г ткани). У больных тяжелыми формами ПГ содержание ИЛ4 было не намного больше, чем у здоровых беременных, – от 4944 до 7713 пкг/г ткани.

Самым большим уровень ИЛ6 после воздействия гипоксии был у больных тяжелыми формами ПГ (8943-11134 пкг/г ткани). Наименьшая концентрация цитокина отмечена у больных легкой формой ПГ – от 4062 до 6706 пкг/г ткани. У здоровых женщин ИЛ6 содержался в количестве от 5242 до 8006 пкг/г ткани.

Уровень ТНФ α после воздействия гипоксии был наибольшим у здоровых женщин – от 6103 до 7071 пкг/г ткани, наименьшим – у больных тяжелыми формами ПГ (1057-2003 пкг/г ткани). В ворсинах хориона больных легкой формой ПГ содержание цитоки-

на составило от 4112 до 5206 пкг/г ткани.

Таким образом, воздействие гипоксии привело к значительным изменениям содержания цитокинов в ворсинах хориона по сравнению с неинкубированной тканью.

Количество ИЛ β в группе здоровых и больных легкой формой ПГ возросло, причем у здоровых величина различия была достоверно больше. В группе больных тяжелыми формами ПГ его концентрация, наоборот, снизилась.

Содержание ИЛ4 в несколько раз возросло во всех трех группах. При этом в группе больных легкой формой ПГ количество цитокина возросло более чем в 4 раза.

Концентрация ИЛ6 также увеличилась во всех трех группах, особенно у больных ПГ. Разница между нативной и инкубированной в условиях гипоксии тканью у больных тяжелыми формами ПГ составила больше чем 8 раз.

Уровень ТНФ α у здоровых под действием гипоксии увеличился, а у больных ПГ снизился, причем в большей степени у больных тяжелыми формами ПГ.

Обсуждение

Исследованный нами процесс изменения продукции цитокинов в ответ на гипоксию является одним из звеньев реакции ворсинчатого хориона на это патологичес-

кое состояние. Одной из первых реакций тканей и клеток млекопитающих на воздействие гипоксии является выработка эритропоэтина – цитокина с выраженным действием на стволовые клетки костного мозга, таким образом увеличивающего эритропоэз. Установлено, что с участком гена, инициирующим транскрипцию эритропоэтина в ответ на гипоксию, практически идентичную последовательность кодонов в цепи ДНК имеют участки генов некоторых цитокинов, таких, например, как ТНФ α и ИЛ1. Они, наряду с эритропоэтином, включены в список веществ, экспрессия генов которых регулируется парциальным давлением кислорода [2, 4].

Описанные показатели цитокинового обмена в ворсинах хориона после воздействия гипоксии демонстрируют наличие нескольких фаз в изменении продукции цитокинов под влиянием этого патологического фактора.

Первая фаза изменений наблюдается при воздействии гипоксии на ткань здорового хориона и отмечается при инкубации в условиях гипоксии ворсин хориона здоровых женщин. В этот период возрастала продукция всех описанных цитокинов по сравнению с интактной тканью.

Вторая фаза имеет место при более длительном воздействии гипоксии и обнаруживается при инкубации в состоянии гипоксии ворсин хориона больных легкой формой ПГ. Продукция ИЛ1 β и ТНФ α уменьшается под воздействием увеличившегося синтеза ИЛ4 [4]. Количество ИЛ6 существенно не изменяется.

Во время третьей фазы в результате нарастающего воздействия гипоксии, как это было продемонстрировано у больных тяжелыми формами ПГ, содержание ИЛ1 β и ТНФ α резко уменьшается, ограничивающая роль ИЛ4 ослабевает, уступая место ИЛ6, количество которого в эту фазу резко возрастает [1].

Эти изменения цитокинового

обмена подтверждают реализацию первичного ответа ткани на воздействие гипоксии при участии ИЛ1 β и ТНФ α , а также наличие ограничивающего воздействия таких цитокинов, как ИЛ4 и ИЛ6, на продукцию своих предшественников и доминирование этих цитокинов при адаптационных процессах в ходе длительного воздействия патологического фактора – гипоксии.

Вывод

Повышение количества одних цитокинов и снижение синтеза других в синцитиотрофобласте хориальных ворсин направлено на перестройку межклеточных взаимоотношений, которая должна подготовить ворсины хориона к работе в условиях пониженного содержания кислорода, а также повысить проницаемость плацентарного барьера с целью адекватного снабжения плода.

Постоянный контакт ворсин хориона с кровью матери позволяет цитокинам легко попадать в системный кровоток и оказывать воздействие на эндотелий сосудов матери, вызывающий повышение их проницаемости и синдром генерализованной эндотелиальной дисфункции – основной эффект ПГ.

Литература

1. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. – 1997. – №5. – С. 7-14.
2. Benyo D.F., Miles T.M., Conrad K.P. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997. – Vol.82, № 5. – P. 1582-1588.
3. Brown M.A. The physiology of preeclampsia [Review] // Clin. Exp. Pharm. Phys. – 1995. – Vol.22, № 11. – P. 781-791.
4. Conrad K.P., Benyo D.F. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia // Am. J. Reprod. Immunol. – 1997. – Vol.37, № 3. – P. 240-249.

5. Dekker G.A., Sibai B.M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – Vol.179, № 5. – P. 1379-1385.
6. DiFederico E., Genbacev O., Fisher S.J. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall // Am. J. Pathol. – 1999. – Vol.155, № 1. – P. 293-301.
7. Goodwin V.J., Sato T.A., Mitchell M.D., Keelan J.A. Anti-inflammatory effects of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor-beta in human placental cells in vitro // Am. J. Reprod. Immunol. – 1998. – Vol.40, № 5. – P. 319-325.
8. Ness R.B., Roberts J.M. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1996. – Vol.175, № 5. – P. 1365-1370.
9. Ramin K.D. The prevention and management of eclampsia // Obstet. Gynecol. Clin. – 1999. – Vol.26, №3. – P. 489-503.