

©Д. Г. Коньков

## АНАЛІЗ РОЛІ ПЛАЦЕНТАРНИХ ЦИТОКІНІВ В ЕТІОПАТОГЕНЕЗІ ПРЕЕКЛАМПСІЇ

*Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова*

АНАЛІЗ РОЛІ ПЛАЦЕНТАРНИХ ЦИТОКІНІВ В ЕТІОПАТОГЕНЕЗІ ПРЕЕКЛАМПСІЇ. Преєклампсія (ПЕ), є однією з провідних причин материнських і перинатальних захворюваності та смертності. Хоча основна причина преєклампсії досі не відома, ішемічного-гіпоксичні порушення в плаценті, як вважають, відіграють центральну роль в патогенезі цього синдрому. Метою нашого дослідження, була, оцінити і порівняти рівні плацентарних цитокінів при фізіологічній вагітності і при ПЕ. В нашому проспективному дослідженні, ми обстежили 12 здорових вагітних жінок і 28 жінок з ПЕ. Середній гестаційний вік на момент включення в дослідження, становив 37–39 тижнів. Концентрації цитокінів ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8 і ФНП- $\alpha$  були виміряні в плацентарній тканині. Концентрація ІЛ-8 була значно вище, концентрації ІЛ-4 та ІЛ-6 були значно нижче, в плацентарній тканині, у жінок з ПЕ в порівнянні з обстежуваними з фізіологічною вагітністю. Проте рівень плацентарного ФНП- $\alpha$  істотно не відрізнявся між цими двома групами. Результати нашого дослідження показали, що ПЕ, вірогідно пов'язана з плацентарним цитокіновим дисбалансом. Прозапальна реакція, яка виникала, можливо пов'язана з розвитком гестаційної ендотеліопатії.

АНАЛИЗ РОЛИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ЦИТОКИНОВ В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ. Преэклампсия (ПЭ), является одной из ведущих причин материнских и перинатальных заболеваемости и смертности. Хотя основная причина преэклампсии до сих пор не ясна, ишемическо-гипоксические нарушения в плаценте, как полагают, играют центральную роль в патогенезе этого синдрома. Целью нашего исследования, была, оценить и сравнить уровни плацентарных цитокинов при физиологической беременности и при ПЭ. Мы обследовали, в нашем проспективном исследовании, 12 здоровых беременных женщин и 28 женщин с ПЭ. Средний гестационный возраст на момент включения в исследование, составлял 37–39 недель. Концентрации цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  были измерены в плацентарной ткани. Концентрация ИЛ-8 была значительно выше, концентрации ИЛ-4 и ИЛ-6 были значительно ниже, в плацентарной ткани, у женщин с ПЭ по сравнению с обследуемыми с физиологической беременностью. Однако уровень плацентарного ФНО- $\alpha$  существенно не отличался между этими двумя группами. Результаты нашего исследования показали, что ПЭ связана с плацентарным цитокиновым дисбалансом. Возникающая провоспалительная реакция, возможно связана с развитием гестационной эндотелиопатии.

THE ANALYSIS OF THE ROLE OF PLACENTAL CYTOKINES IN THE ETIOPATHOGENESIS OF PREECLAMPSIA. Preeclampsia (PE), a leading cause of maternal and fetal mortality and morbidity, is a potentially devastating disorder. Although the underlying cause of preeclampsia is still not clear, the placenta ischemia/hypoxia is thought to be centrally involved in the pathogenesis of this syndrome. Our aim was to evaluate and compare the levels of placental cytokines in normal and PE pregnancies. We studied 12 healthy pregnant women, 28 PE women in our prospective study. Their average gestational age at entry was 37–39 weeks. The levels of IL-4, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in placental tissue were measured. The concentration of IL-8 was significantly higher, and concentrations of IL-4, IL-6 were significantly lower in placenta among PE pregnant women as compared with normotensive pregnant women. But TNF- $\alpha$  level in the placenta did not differ significantly between the two groups. Our data suggest that PE pregnancy is associated with cytokine imbalances in placenta. This enhanced inflammatory reaction seems to be related with development of gestational endotheliopathy.

**Ключові слова:** гестаційна ендотеліопатія, преєклампсія, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- $\alpha$ , плацента.

**Ключевые слова:** гестационная эндотелиопатия, преэклампсия, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , плацента.

**Key words:** gestational endotheliopathy, preeclampsia, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , placenta.

**ВСТУП.** Преєклампсія (ПЕ) являє собою клінічно-маніфестовану форму гестаційної патології і пов'язана з материнськими симптомами гіпертонії, протеїнурії починаючи з 20 тижнів вагітності. Незважаючи на досягнення сучасної медицини, преєклампсія є однією з провідних причин материнської і перинатальної смертності. Питома вага преєклампсії в структурі ускладнень вагітності коливається від 10,1 % до 20,0 %, а серед причин материнської смертності становить 21,3 %. У структурі причин материнської смертності преєклампсія вагітних протягом останніх десяти років займає в основному 3–4 місце. Преєклампсія збільшує ризик небажаного результату вагітності не тільки для матері, але і для плода. Перинатальна смертність для даної патології коливається в межах від 10 до 30 %, перинатальна захворюваність – від 463 до 780 ‰. Передчасні пологи при ПЕ спостерігаються в 25–41 %, частота оперативного розродження становить 40 %. Перинатальна захворюваність і смертність при преєклампсії обумовлені недоношеністю (30,0 %), хроніч-

ною гіпоксією (40,0 %), внутрішньоутробною затримкою росту плода (30,0 %) [1].

В даний час точна причина преєклампсії досі невідома. Хоча, доведено, що порушення гестаційної конверсії спіральних артерій у першому триместрі вагітності призводять до зниження гемодинамічного забезпечення вагітності і сприяють вивільненню в материнський кровоплин певних субстанцій, які викликають подальше пошкодження ендотеліальних клітин (первинне або вторинне). Серед таких субстанцій, які здатні реалізовувати гестаційну ендотеліопатію, особливо в останній час, більшу цікавість приділяють цитокінам (фактори росту (ФР), інтерлейкіни (ІЛ) та хемокіни (ХК)) [1]. Припускають, що їх джерелом стають ворсини хоріона, де цитокіни регулюють міжклітинні взаємодії трофобласта в ході проліферації і диференціювання [2, 3], проте результати досліджень у цьому напрямку неоднозначні і суперечливі [4, 5].

Rolfo A. et al. [2013] дослідили, що прозапальні цитокіни (фактор некрозу пухлини – альфа (ФНП- $\alpha$ ))

та інші), в надлишку, продукуються плацентою у відповідь на місцеву ішемію/гіпоксію, що сприяло до подальшої ендотеліальної активації і дисфункції, яка призводила до клінічно-маніфестованої гестаційної патології – прееклампсії [6].

Однією з останніх концепцій, яка пояснює зміни регуляторних механізмів при вагітності, є гіпотеза про переключення імунної відповіді, що опосередкована Т-хелперами 1-го порядку ( $Th_1$ ) на імунну відповідь, що опосередкована Т-хелперами 2-го порядку ( $Th_2$ ), так звана « $Th_1/Th_2$  парадигма вагітності». Центральне місце в цій концепції також відводиться цитокінам. Так,  $Th_2$  цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9) стимулюють інвазію трофобласта, а  $Th_1$  (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-12) тип цитокинів лімітує цей процес [7, 8].

Разом з тим, досі не проаналізовано механізми, які пов'язують особливості функціонування ендотеліальних клітин плаценти при її фізіологічному розвитку і при патологічному перебігу вагітності. Дотепер, недостатньо вивчений характер змін цитокинової мережі плаценти при її фізіологічному розвитку і при ПЕ. У літературі представлені розрізнені відомості про локалізацію ростових факторів у плаценті на ранніх і пізніх етапах фізіологічної вагітності. Комплексне порівняльне вивчення імунологічних механізмів регуляції, ролі гуморальних і клітинних факторів у контролі розвитку плаценти в нормі і при патології дозволять конкретизувати окремі ланки імунопатогенезу ПЕ.

Мета роботи. Оцінити діагностичну значимість плацентарних цитокинів при прееклампсії.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Дослідження проведені на базі клінічних підрозділів кафедри акушерства і гінекології №1 Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. У проспективне дослідження були включені 28 вагітних з помірно прееклампсією. Контрольну групу склали 12 здорових жінок з фізіологічною вагітністю. Причому, загальними критеріями зарахування у дослідження були: вік 20–32 роки, перші термінові пологи, відсутність фонові екстрагенітальної та гінекологічної патології, відсутність ускладнень вагітності, що не були пов'язані з ПЕ. Вагітність вважалась фізіологічною, коли жінки не мали клінічних і лабораторних ознак ПЕ, інших ускладнень вагітності, пологів та післяпологового періоду. Пологи у всіх жінок контрольної групи та 22 (78,6 %) завершилися терміновими пологами в 38–40 тижнів. 6 вагітних з ПЕ (21,4 %), були розроджені шляхом операції цісарського розтину.

Об'єктом дослідження були обрані гомогенати плацент пацієнток зазначених вище груп. У гомогенатах плаценти, взятих при дотриманні холодового режиму визначали концентрацію цитокинів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8) методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів реагентів “Accucyte Human IL-8 EIA Kit”, “Accucyte Human IL-6 EIA Kit”, “Accucyte Human IL-4 EIA Kit” (Cytimmune Sciences Inc., США), “Biotrak TNF human ELISA system” (Amersham Pharmacia Biotech, Великобританія). Результати вираховувались на аналізаторі “StatFax 303 Plus” (США). Для підготовки екстракту гомогенату плаценти ми використовували методику Benyo D. F., et al. [1997]. Після видалення створових ворсин, децидуальної та амніотичної оболонки пла-

центарну тканину подрібнювали на кусочки вагою 5–10 мг та промивали трьома змінами розчину Хенкса. Після чого, отриману подрібнену плацентарну тканину вагою 500 мг гомогенізували в порцеляновій ступці. З гомогенату цитокіни екстрагували забуференим фосфатним буфером фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10. В подальшому центрифугували на протязі 10 хвилин при 3000 обертів/хвилину. Для дослідження брали надосадову рідину [8].

Дане дослідження було проведено відповідно до принципів, виражених в Гельсінкської декларації. Всі пацієнти підписали інформовану згоду для відбору зразків плаценти і подальшого аналізу.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою ліцензійного пакету програм Statistica (версія 5.1. Фірми StatSoft. Inc). Для оцінки статистичної значущості відмінностей між порівнюваними групами використовували критерій Стьюдента (t-критерій). Достовірними вважалися відмінності при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Як показали результати проведеного нами дослідження, показники цитокинів в гомогенаті плаценти при помірній прееклампсії мали статистично вірогідну відмінність у порівнянні з аналогічними, при фізіологічній вагітності.

Так, показники плацентарного цитокіну ІЛ-4, у вагітних з помірно ПЕ становили в середньому  $252,4 \pm 23,6$  пг/г, тоді, як у жінок з фізіологічним перебігом вагітності вміст ІЛ-4 у гомогенаті плаценти був  $1129,6 \pm 139,5$  пг/г ( $p < 0,05$ ). Подібна динаміка показників ІЛ-4 в плацентарній тканині, може свідчити про можливе пригнічення диференціювання  $Th_0$  в  $Th_2$  – функціонального фенотипу, якому притаманний ефект протекторного супроводження гестаційного процесу [9]. Також, зазначені зміни ймовірно вказують на зниження синтезу імуноглобулінів класів Е і G4, що активуються ІЛ-4.

При дослідженні цитокіну ІЛ-6, впадала в очі динаміка, подібна до ІЛ-4, а саме, у вагітних жінок з нормальним перебігом гестаційного процесу, рівень ІЛ-6 в плацентарній тканині сягав  $317,3 \pm 42,1$  пг/г., проти  $124,8 \pm 20,9$  пг/г ( $p < 0,05$ ), у хворих на помірну прееклампсію. Хотілося б зазначити, що такі зміни балансу ІЛ-6, в плаценті, можуть свідчити про порушення регуляції пост-транскрипційного механізму [10]. Водночас ІЛ-6 може ускладнювати реалізацію ефекторних реакцій імунної системи матері по відношенню до плоду. Так, у жінок зі звичним невиношуванням вагітності ІЛ-6, будучи за своїми ефектам типовим прозапальним цитокіном, стимулюючи ангіогенез, активуючи коагуляційні реакції, одночасно інгібує продукцію ІЛ-1, ФНП, проявляє, тим самим протизапальну дію (обмежує продукцію прозапальних цитокинів в плаценті).

Аналізуючи показники ФНП- $\alpha$ , ми не знайшли статистично вірогідної відмінності між групами в дослідженні, рівень вказаного цитокіну, в плаценті у здорових жінок становив  $467,1 \pm 42,2$  пг/г, а у вагітних з помірно ПЕ –  $506,7 \pm 25,5$  пг/г, відповідно. ФНП- $\alpha$ , є поліпептидом, основними продуцентами якого під час вагітності виступає плацента. Встановлено, що ФНП- $\alpha$  індукує експресію антигенів головного комплексу

гістосумісності, молекул адгезії, стимулює продукцію прозапальних інтерлейкінів в ендотелії. Водночас, ФНП- $\alpha$  є найважливішим регулятором судинного тону, коагуляційного потенціалу крові, викликає розвиток явищ тромбозу, патологічної вазодилатації, порушення регіонарного кровотоку. Отримані нами результати можуть вказувати на те, що ФНП- $\alpha$  в плаценті не є ключовим цитокином який би заважав адекватній інвазії трофобласта в міометрій в прееклампсії [11].

Нарешті, при дослідженні іншого прозапального плацентарного цитокину, було встановлено, що при клінічній маніфестації гестаційної патології – помірної ПЕ, вміст ІЛ-8 сягав  $71,2 \pm 7,5$  пг/г проти  $40,1 \pm 4,6$  пг/г – у жінок з фізіологічною вагітністю ( $p < 0,05$ ). Підвищення вмісту ІЛ-8 в гомогенаті плаценти, на нашу думку, насамперед може прояснити одну з ланок етіопатогенезу ПЕ, а саме – маніфестацію гестаційної ендотеліопатії. Відомо, що вказаний інтерлейкін стимулює міграцію ендотеліальних клітин та модулює реорганізацію цитоскелету в цих клітинах (поява стресових волокон, індукція актинових філаментів, утворення щитоподібних філоподій, підвищення проникності) [12, 13]. У результаті відбувається посилення функції адгезії лімфоцитів і моноцитів периферичної крові до ендотелію судин, що в підсумку може призводити до порушення мікроциркуляції як в тканині плаценти, так і в ділянці матково-плацентарного ложа. Тому, зростання ІЛ-8 в тканині плаценти, можна розглядати, як один з причинних факторів розвитку ендотеліаль-

ної дисфункції (первинної або вторинної) під час вагітності.

Таким чином, проведене дослідження, дало змогу встановити, що зміни цитокинового балансу при прееклампсії, підтверджують реалізацію первинної адаптивної відповіді тканини плаценти. Підвищення рівня ІЛ-8 ( $p < 0,05$ ), ФНП-6 ( $p > 0,05$ ) і зниження вмісту ІЛ-4 ( $p < 0,05$ ), ІЛ-6 ( $p < 0,05$ ) спрямоване на перебудову міжклітинних взаємовідносин, викликає підвищення проникності ендотелію та стимулює подальший розвиток гестаційної ендотеліопатії, як тригерного компонента в імунопатогенезі прееклампсії.

**ВИСНОВКИ.** Проведене дослідження довело, що при прееклампсії відбувається порушення адаптивних процесів в плаценті, яке проявляється дисбалансом між про- та протизапальними плацентарними цитокинами.

Підвищення вмісту ІЛ-8, в плацентарній тканині, спричиняє додаткову токсичну дію на ендотелій та може розглядатися, як один з вірогідних маркерів маніфестації гестаційної ендотеліопатії.

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Впровадження результатів дослідження дозволяє визначити додаткові ланки етіопатогенезу перинатальної патології. Використання запропонованих, в нашій науковій праці, плацентарних цитокинів дозволять адекватно оцінити ефективність проведеної превентивної терапії доклінічних форм гестаційної ендотеліопатії.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Коньков Д. Г. Предиктори, профілактика, діагностика та лікування гіпертензивних розладів вагітності / Д. Г. Коньков з співавторами. // Локальний клінічний протокол з акушерської допомоги. Вінницька область. – 2012. – 96 с.
2. Expression of Inflammatory Cytokines in Placentas from Women with Preeclampsia / D. F. Benyo [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2001. – Vol. 86. – Iss. 6. – P. 2505–2512.
3. Inflammatory Disturbances in Preeclampsia: Relationship between Maternal and Umbilical Cord Blood / Cristina Catarino [et al.] // Journal of Pregnancy. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–10.
4. Maternal Inflammatory Response in Severe Preeclamptic and Preeclamptic Pregnancies / M. Bayram [et al.] // Journal of Clinical Gynecology and Obstetrics. – 2012. – Vol. 1. – № 2–3. – P. 40–45.
5. Архангельский С. М. Закономерности нарушений цитокинового статуса матери и плода при гестозе / С. М. Архангельский, Н. П. Чеснокова, Н. Н. Яхамова // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 10. – С. 12–16.
6. Pro-Inflammatory Profile of Preeclamptic Placental Mesenchymal Stromal Cells: New Insights into the Etiopathogenesis of Preeclampsia / A. Rolfo [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – Iss. 3. – P. 1–13.
7. Biomarkers of coagulation, inflammation, and angiogenesis are independently associated with preeclampsia / Roland Boij [et al.] // American Journal Of Reproductive Immunology. – 2012. – Vol. 68. – Iss. 3. – P. 258–270.
8. Полиморфизм генов цитокинов в тканях плаценты при невынашивании беременности / Машкина Е. В., Коваленко К. А., Фомина Н. В., Покудина И. О. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – Ч. 3. – С. 580–584.
9. Hypoxia, stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta / D. F. Benyo [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997. – Vol. 2. – № 5. – P. 1582–1588.
10. Дубосарская З. М. Клеточно-молекулярные диалоги в эндометрии и плаценте при физиологической и патологической беременности / З. М. Дубосарская // Жіночий лікар. – 2012. – № 3. – С. 34–38.
11. Interleukin-6 concentrations in the placenta and blood in normal pregnancies and preeclampsia / M. Hayashi, Y. Ueda, T. Ohkura, N. Inaba // Horm Metab Res. – 2005. Vol. 37. – Iss. 7. – P. 419–424.
12. Placental TNF- $\alpha$  Signaling in Illness-Induced Complications of Pregnancy / Pamela A. Carpentier [et al.] // Am J Pathol. – 2011. – Vol. 178. – Iss. 6. – P. 2802–2810.
13. Expression and significance of interleukin-8 and placenta growth factor in patients with preeclampsia / Wu XueQin [et al.] // Journal of Tropical Medicine. – 2009. – Vol. 9. – № 5. – P. 539–541.
14. Interleukin-8 Induces the Endothelial Cell Migration through the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase-Rac1/RhoA Pathway / Yi Lai [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2011. – Vol. 7. – Iss. 6. – P. 782–791.

Отримано 05.12.13