

На правах рукописи

АЙЕНИ ДАНИЕЛЬ ОЛУСОЛА

**ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ В ГЕНЕЗЕ РАННИХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва

2012

Работа выполнена на кафедре акушерства и гинекологии с курсом перинатологии ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель -

профессор кафедры акушерства и гинекологии
с курсом перинатологии ГОУ ВПО РУДН
д.м.н., профессор

И. М. Ордянец

Официальные оппоненты:

– профессор кафедры акушерства и гинекологии
педиатрического факультета ГОУ ВПО РГМУ,
д.м.н., профессор

Л. М. Каппушева

– профессор кафедры семейной медицины
Первого МГМУ им.И.М.Сеченова
д.м.н., профессор

К.Г. Серебренникова

Ведущая организация:

ГОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2012 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.212.203.01. в ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (117333, г.Москва, ул. Фотиевой, д.6).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.м.н., профессор

И.М.Ордянец

ВВЕДЕНИЕ.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.

Проблема ранних репродуктивных потерь определяется их стабильной и достаточно высокой частотой в РФ - каждая пятая желанная беременность прерывается до срока, при этом около 80% репродуктивных потерь приходится на первый триместр [Серов В.Н., 2008; Савельева Г.М., 2007; Радзинский В.Е., 2010]. Фактически, частота самопроизвольных абортс значительно выше, т. к. в ее число входит также большое количество ранних, субклинически протекающих выкидышей. Это подтверждают данные американских авторов - 50% женщин теряют беременность еще до того как узнают об этом [Porter T.F., 2005; Rai R., 2006; Yang C.J., 2006; Puschek E.E., 2007].

У 45-88,6% женщин в первые недели гестации самопроизвольному прерыванию беременности предшествует гибель эмбриона [Подзолкова Н.М., 2009]. На конгрессе FIGO в Куала-Лумпуре (2006) был поставлен знак равенства между несостоявшимся выкидышем и хроническим аутоиммунным эндометритом, который встречается у 75% женщин с ранними репродуктивными потерями.

В настоящее время установлено, что для реализации процессов имплантации, роста и развития эмбриона необходимо создание в эндометрии матери состояния иммунной супрессии, что ведет к формированию защитного барьера и предотвращает отторжение наполовину чужеродного плода [Суханова Л.П., 2008; Гусева Е.В., 2008]. По данным В.М. Сидельниковой и соавт. (2008), у женщин, страдающих привычным невынашиванием, вне беременности диагноз хронического эндометрита гистологически верифицирован у 73,1%, у 86,7% выявлена персистенция условно-патогенных микроорганизмов в эндометрии, что, безусловно, может служить причиной активации иммунопатологических процессов. При этом патогенетическими механизмами структурно-функциональных изменений эндометрия при хроническом эндометрите являются нарушения иммунореактивности организма [Стрижова Т.В., 2012], тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза, связанных с гиперкоагуляцией, изменением гетерогенности циркулирующей популяции тромбоцитов, гиперфункцией тромбоцитов (повышение активности) [Макаева Д.А., 2011], дисбаланс в системе цитокинового статуса, связанный со снижением противовоспалительных и увеличением провоспалительных цитокинов, а также продукции специфического (АМГФ) белка, снижающих имплантационный потенциал эндометрия и препятствующих успешному развитию беременности [Бойко Е.Л., 2006; Демитрова В.И., 2006; Дондуп О.М., 2009].

Данные литературы убедительно свидетельствуют, что морфофункциональной основой эндометрита при спонтанном аборте и неразвивающейся беременности является комбинация двух

патогенетических механизмов: хронического продуктивного воспаления (париетальный и базальный децидуит) с местными нарушениями гемостаза в париетальном эндометрии и d.basalis (расслаивающиеся кровоизлияния, тромбоз, ретроплацентарная гематома), несмотря на адекватную децидуализацию эндометрия и достаточную перестройку спиральных артерий в маточно-плацентарные [Милованов А.П., 2004; Заякин В.А., 2004; Побединская О.С., 2011].

В последние годы при обсуждении генеза большинства акушерских осложнений особое внимание уделяют повреждению периферической сосудистой системы. Возникающая гипоперфузия тканей вследствие вазоконстрикции, гиповолемии, нарушений реологических свойств крови и гиперкоагуляции с развитием ДВС-синдрома неизбежно приводит к ишемическим повреждениям в тканях различных органов с формированием полиорганной недостаточности [Кулаков В.И., Мурашко Л.Е., 2004]. Ведущее место в этом процессе принадлежит функциональному состоянию эндотелия сосудов, который является одним из главных факторов регуляции сосудистого тонуса, иммунных реакций организма, состояния микроциркуляции и всех ее составляющих [Блощинская И. А., 2003].

Известно, что эндотелий обладает уникальной способностью реагировать на различные гуморальные изменения окружающей среды продукцией сосудосуживающих и сосудорасширяющих факторов, баланс которых и определяет тонус гладких мышечных клеток, являясь весьма важным в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления [Гомазков О.А., 2010]. Среди многочисленных факторов эндотелиального происхождения признанными маркерами эндотелиальной дисфункции являются оксид азота (NO) и ангиотензин превращающий фермент. Кроме того, в последние годы большое значение в развитии эндотелиальной дисфункции придается эндотелинам, способным как непосредственно, так и опосредованно через генерацию оксида азота и образование ангиотензина II влиять на изменение сосудистого тонуса [Бова А.А., Трисветова Е.Л., 2005]. В доступной нам литературе не удалось найти исчерпывающих сообщений о детальном изучении дисфункции эндотелия и его влиянии на тромбоцитарное звено гемостаза при ранних репродуктивных потерях, что послужило основанием для детального изучения их роли в прогнозировании осложненного течения первого триместра беременности.

Таким образом, несмотря на многочисленность работ, посвященных изучению проблемы ранних репродуктивных потерь, частота их по-прежнему высока. Выявление новых звеньев патогенеза, в частности взаимосвязи функционального состояния эндотелия спиральных артерий со структурно-функциональными изменениями эндометрия с одной стороны и тромбоцитарным звеном гемостаза с другой стороны, являются резервами снижения репродуктивных потерь, перинатальной

заболеваемости и смертности, особенно у женщин с потерями беременности в анамнезе.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: улучшить своевременную диагностику ранних репродуктивных потерей на основании прогнозирования изменений метаболитов дисфункции эндотелия.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- изучить содержание маркеров дисфункции эндотелия (ЭТ-1, оксида азота, Е-селектина) в периферической крови женщин с ранними репродуктивными потерями;
- выявить связь маркеров дисфункции эндотелия со структурными особенностями тромбоцитов и изменениями показателей плазменного звена гемостаза;
- определить роль изменений маркеров дисфункции эндотелия в нарушениях маточно-плацентарного кровотока и оценить их значение маркеров дисфункции эндотелия в патогенезе морфофункциональных изменений хориона у женщин с ранними репродуктивными потерями;
- разработать критерии прогнозирования ранних репродуктивных потерь на основании анализа полученных данных.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Расширены представления о патогенезе ранних репродуктивных потерь. Впервые изучено содержание маркеров дисфункции эндотелия (ЭТ-1, оксида азота, Е-селектин) в периферической крови женщин с ранними репродуктивными потерями. Показано, что основными признаками дисфункции эндотелия сосудов является снижение уровней оксида азота и Е-селектина и увеличение ЭТ-1.

Предикторами микротромбозов в формирующемся межворсинчатом пространстве при ранних репродуктивных потерях являются изменения уровней маркеров дисфункции эндотелия (оксида азота, Е-селектина и ЭТ-1) в сочетании с гетерогенностью циркулирующей популяции тромбоцитов (повышение содержания активированных клеток, увеличение их размерных параметров), что усугубляет становление адекватного маточно-плацентарного кровотока.

Определены наиболее значимые корреляционные связи между морфофункциональными изменениями эндотелия спиральных артерий, маркерами его функционального состояния и нарушениями тромбоцитарного звена гемостаза.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

На основании выявленных корреляционных связей между морфофункциональными особенностями тромбоцитов периферической

крови, уровнем маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭТ-1, оксида азота, Е-селектин) и морфологическими особенностями эндотелия спиральных артерий разработан алгоритм реабилитационных мероприятий у женщин с ранними репродуктивными потерями, позволяющий планировать следующую беременность с минимальным риском неблагоприятного исхода. Этими критериями могут служить: снижение уровней оксида азота, Е-селектина и увеличение ЭТ-1; нарушения в системе гемостаза, связанные с развитием гиперкоагуляции и изменением гетерогенности циркулирующей популяции тромбоцитов, а также нарушения маточно-плацентарного кровотока.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ, ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ И ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Данные наших исследований могут быть использованы в родовспомогательных учреждениях, в перинатальных центрах и центрах планирования семьи, а также при обучении студентов медицинских вузов. Материалы диссертации включены в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов по предмету «акушерство и гинекология» (VI курс лечебного факультета). Основные результаты работы внедрены в практику врачей гинекологического отделения ГКБ №64 г. Москвы.

Клинические исследования, анализ и интерпретация данных проведены автором самостоятельно.

По теме диссертации опубликованы 6 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения диссертации доложены: на Российском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2010), на Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2010), 21st International Congress on Thrombosis (Milan, 2010), на Международном конгрессе «Ранние сроки беременности» (Москва, 2011).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Сочетание гемокоагуляционных расстройств с выраженным тромбообразованием, распространенной воспалительно-клеточной лейкоцитарной инфильтрации, формирования абсцессов с участками колликвационных некрозов и распространенных коагуляционных некрозов обуславливает направленность процессов как гибели плодного мешка с формированием неразвивающейся беременности, так и развития самопроизвольных выкидышей при отторжении инфицированного эндометрия и освобождения полости матки от погибшего продукта зачатия.

2. Патогенетическими механизмами структурно-функциональных изменений плацентарного ложа матки являются: дисфункция эндотелия сосудов (снижение уровней оксида азота, Е-селектина и увеличение ЭТ-1); тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза, связанных с гиперкоагуляцией, изменением гетерогенности циркулирующей популяции тромбоцитов, гиперфункцией тромбоцитов (повышение активности) на фоне сочетанных гемокоагуляционных расстройств с выраженным тромбообразованием и распространенной воспалительноклеточной лейкоцитарной инфильтрацией стромы, снижающих имплантационный потенциал эндометрия и препятствующих успешному развитию беременности.
3. Показатели эндотелиальной дисфункции (снижение уровней оксида азота, Е-селектина и увеличение ЭТ-1), витальной компьютерной фазовой морфометрии тромбоцитов периферической крови [снижение числа тромбоцитов «покоя» (до 30,4%), увеличение содержания клеток с низким (до 45,4%) и высоким (до 18,9%) уровнем активации, увеличение диаметра ($3,4 \pm 0,1$), площади ($7,2 \pm 0,2$), периметра ($10,9 \pm 0,2$) и объема ($2,6 \pm 0,1$) клеток] в сочетании с доплерометрическими показателями кровотока в маточных, спиральных и радиальных артериях, подтвержденные морфологическими особенностями плацентарного ложа матки, могут служить прогностическими критериями повторных репродуктивных потерь и объясняют низкую эффективность предгравидарной подготовки.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 102 таблиц 11 и 9 рисунков. Указатель литературы включает 192 работу, из них 105 - на русском и 87 на других языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Настоящее исследование выполнено в 2009-2012гг. в ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» на кафедре акушерства и гинекологии с курсом перинатологии (заведующий кафедрой - д.м.н., профессор В.Е. Радзинский).

Всего были обследованы 139 беременных в первом триместре, из них: 27 – с неосложненной беременностью в сроки 6-12 нед. (I группа), 30 – с угрозой самопроизвольного аборта (II группа), 42 – со спонтанным абортом (III группа) и 40 – с неразвивающейся беременностью (IV группа).

Критерии включения в основные группы: возраст 18-45 лет; наличие абортов и репродуктивных потерь в анамнезе; отсутствие гинекологических и экстрагенитальных заболеваний в острой и подострой стадиях.

Критерии исключения: пациентки с антифосфолипидным синдромом.

Программа исследования включала:

- клиническо-статистический анализ (139 исследований);
- определение маркеров дисфункции эндотелия (эндотелина-1, оксида азота, E-селектин) в периферической крови (96 исследований);
- цитоморфометрию клеток крови (139 исследований);
- доплерометрическое исследование маточно-плацентарного кровотока (139 исследований);
- морфологическое исследование области плацентарного ложа матки (41 исследование);
- математическую обработку полученных результатов.

Клиническую оценку состояния обследованных женщин проводили с помощью разработанной статистической карты. Из анамнеза анализировали жалобы, возраст в момент обследования, экстрагенитальные заболевания, перенесенные гинекологические заболевания и оперативные вмешательства. Изучали характер менструальной (возраст менархе, особенности менструального цикла и его нарушения) и репродуктивной функции (число беременностей, их течение, исход). При клиническом обследовании проводили общий осмотр, оценку состояния сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, мочевыделительной и пищеварительной систем, состояния молочных желез.

Определение маркеров дисфункции эндотелия (эндотелина-1, оксида азота, E-селектин) в периферической крови осуществлялось с помощью иммуноферментного анализа. Анализ реакции Грисса - измерение окиси азота в биологических веществах, при этом концентрация нитрита, как правило, измеряется спектрофотометрическим и электрохимическим методами. Реакция Грисса была впервые описана в 1879 году. Из-за своей простоты, она была широко использована в анализе многочисленных биологических веществ, включая плазму (сыворотку), мочу, спинномозговую жидкость, слюну.

Методика проведения теста. Активность системы оксида азота (NO) оценивали по суммарному содержанию основных метаболитов NO (нитратов и нитритов) в сыворотке крови. Восстановление нитратов до нитритов в сыворотке проводили в реакторе-восстановителе Nitrate reductor

в присутствии 0,5 М раствора NH₄OH (pH 9,0) в качестве буфера. После восстановления сыворотки смешивали с равным объемом реактива Грисса, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре до изменения цвета. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. Затем по калибровочной кривой определяли концентрацию нитритов. Исследования проводили на базе лаборатории клинических биохимии Научного Центра здоровья детей.

Витальная компьютерная фазометрия биообъектов. Для прижизненной оценки морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови использовали метод компьютерной динамической лазерной фазометрии, представляющей совокупность способов пробоподготовки, компьютерной системы анализа изображений, алгоритмов измерений и идентификации фазовых портретов клеток, методов статистической обработки данных (Василенко И.А. и соавт., 1995-2010; Тычинский В.П. и соавт., 1995). Важно учитывать, что параметры фазового изображения содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках живой клетки, но и ее оптических свойствах, в частности, внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитообъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава, агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения клетки. Исследования проводили на базе отечественных компьютерных лазерных фазово-интерференционных микроскопов “Цитоскан” (МГИРЭА, Москва) и TomoLab (ВНИИОФИ, Москва) совместно с сотрудниками кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО ГКА.

Определение количества тромбоцитов. Подсчет количества циркулирующих тромбоцитов в цельной крови производили с использованием гематологического автоматизированного счетчика Cobas Micros 18 (Roche).

Определение протромбинового индекса. Протромбиновое время определяли методом Квика. В пробирку вносили 0.1 мл испытуемой плазмы крови, 0.1 мл суспензии тромбoplastина. Пробирку ставили в водяную баню при 37°C на 60 секунд. Затем приливали 0.1 мл 0.025 М хлорида кальция и включали секундомер. Отмечали время свертывания крови. Протромбиновый индекс вычисляли по формуле: $(A/B) \times 100$, где А – протромбиновое время плазмы крови, В – протромбиновое время исследуемого. Индекс выражали в процентах (%).

Определение количества фибриногена. Количество фибриногена определяли по Рутберг: к 1 мл плазмы крови добавляли 0.1 мл 5% раствора хлорида кальция и 0.1 мл раствора тромбина. Образовавшийся

сгусток переносили на обеззоленный бумажный фильтр и просушивали другим фильтром до сухого состояния. Взвешивали сухой фибрин на торсионных весах, умножали на экспериментально установленный коэффициент 22,2. Единицы измерения г/л.

Комплексное ультразвуковое и доплерометрическое исследования проводились на ультразвуковом диагностическом сканере ALOKA SSD-2000 с трансабдоминальным и трансвагинальным датчиком с центральной частотой 3,5 и 5,0 мГц. Исследование кровотока в маточных, спиральных и радиальных артериях в первом триместре беременности проводилось путем использования импульсной доплерометрии. Оценка периферического сопротивления проводилась путем вычисления индексов резистентности и пульсации. Расчет данных показателей осуществлялся ультразвуковым прибором автоматически.

Морфологическое исследование области плацентарного ложа матки. Гистологическое исследование материала, полученного в ходе инструментального удаления плодного яйца и выскабливания стенок полости матки при искусственном прерывании и неразвивающейся беременности, проводили путем изучения соскоба. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм депарафинизировали и окрашивали гематоксилин-эозином.

С целью повышения объективности оценки степени структурной гестационной трансформации эндометриальных сегментов спиральных артерий применялся разработанный нами морфологический индекс гестационной перестройки (МИГП), отражающий сумму пяти морфологических признаков гестационной перестройки, оцененных полуколичественным способом и выраженных в баллах:

1) просвет артерии: 0 баллов – не расширен или расширен незначительно, 1 балл – умеренно расширен, 2 балла – широкий, 3 балла – значительно расширен (мешковидный);

2) эндотелиальная выстилка: 0 баллов - сохранена на всем протяжении, 1 балл – сохранена на большей части интимы, 2 балла – сохранена на меньшей части интимы, 3 балла – отсутствует.

Морфологические исследования проводились на кафедре патологической анатомии в Российской академии постдипломного образования, д.м.н., профессором Ф.Г.Забозлаевым.

Полученные показатели обработаны методом вариационной **математической статистики**. Для создания базы данных и математической обработки результатов использовался персональный компьютер. В качестве основного программного обеспечения выбран пакет программ для статистической обработки данных Statistica 8,0 компании StatSoft (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный клинико-статистический анализ подтвердил сопоставимость групп по основным анализируемым показателям и показал, что основными факторами, предрасполагающими к невынашиванию ранней беременности являются: предшествующие медицинские и самопроизвольные аборты; хронические воспалительные заболевания матки и ее придатков, внутриматочные манипуляции.

Средний возраст обследованных женщин составил $28,6 \pm 2,1$ лет. Для исхода беременности в функциональной системе мать-плацента плод особую значимость имеет контакт ворсин плаценты с d.basalis или маточно-плацентарная область, поскольку структурное взаимоотношение фетоплацентарных тканей и клеток с маткой определяет успешность и полноту важнейших процессов имплантации.

При исследовании децидуально трансформированного эндометрия вне зоны имплантации плодного мешка выявлены признаки экссудативного воспаления в виде выраженного отека стромы, венозной гиперемии, распространенной лейкоцитарной экссудативной реакции с формированием абсцессов, а также очагов колликативного некроза с перифокальной лейкоцитарной инфильтрацией, обширные поля коагуляционного некроза.

Отек стромы эндометрия характеризовался значительной дисконкомплексацией децидуоцитов и особенно выражен при незавершенной децидуальной трансформации стромы, которая представлена рыхлой, отечной структурой с бледноокрашенными ретикулиновыми волокнами, среди которых определялись разрозненные предецидуальные и децидуальные клетки, умеренная диффузная лейкоцитарная инфильтрация. При стромальном отеке отмечалось выраженное венозное полнокровие с формированием диапедезных экстравазатов и лейкоцитарной миграцией, сладжирование эритроцитов с формированием тромбов в образованных венозных синусоидах (рис.1).

Выраженная серозная лейкоцитарная инфильтрация распространялась преимущественно на компактный слой гравидарного эндометрия (рис.2). Однако при явлениях неполноценной децидуальной его трансформации и пониженной плотности расположения предецидуальных клеток лейкоциты проникали в более глубокие слои эндометрия, появляясь в просветах кистозно трансформированных желез (рис.3). В структуре лейкоцитарного экссудата преобладали нейтрофильные полинуклеарные лейкоциты, также в составе экссудата определялись лимфоциты и моноциты. Инфильтрируя стенки эндометриальных сегментов спиральных артерий, лимфо-лейкоцитарный экссудат препятствовал процессу их гестационной трансформации, нарушая механизм физиологической внутрисосудистой

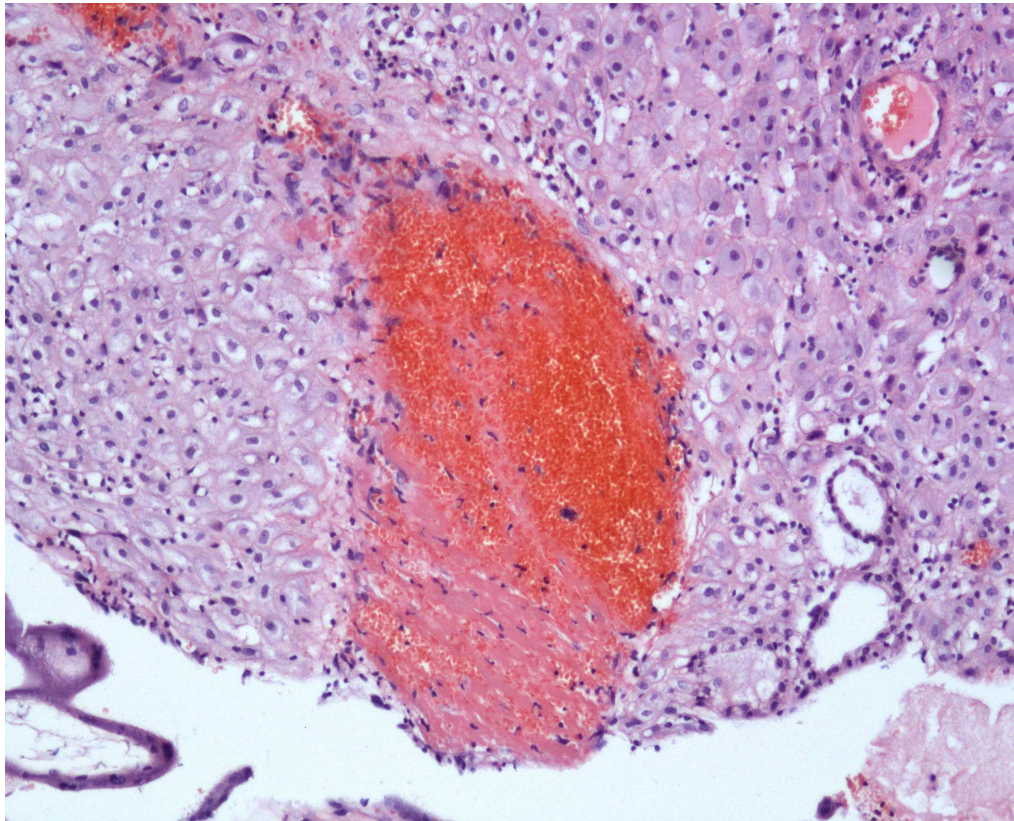


Рис.1 Тромбоз эктазированной венозного синусоида гравидарного эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином. х 150.

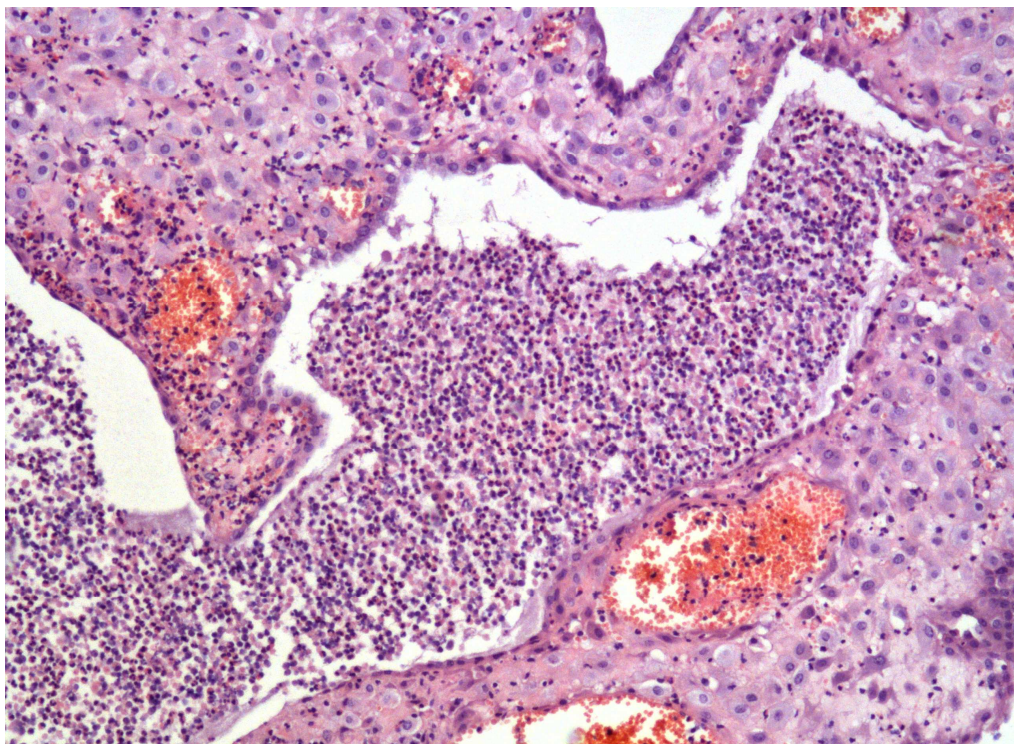


Рис. 2 Очаги коагуляционного некроза в гравидарном эндометрии Окраска гематоксилином и эозином. х 40.

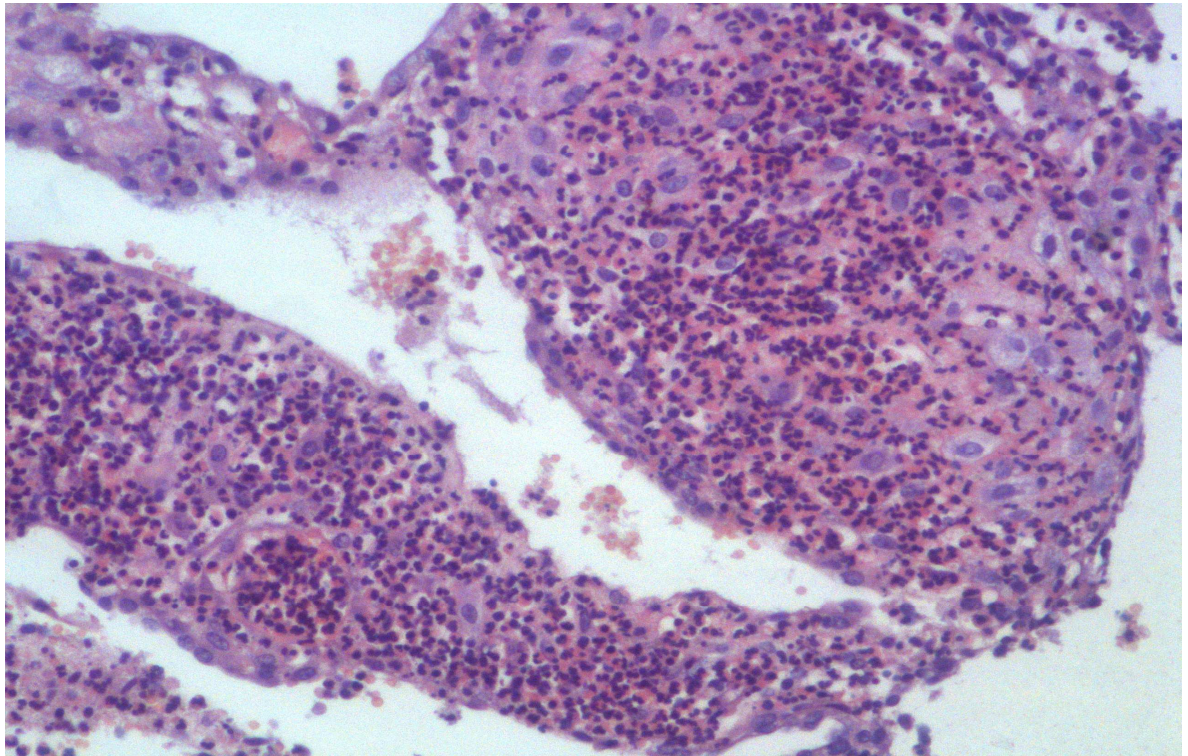


Рис 3 Выраженная серозная лейкоцитарная инфильтрация преимущественно в компактном слое гравидарного эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином. х 150.

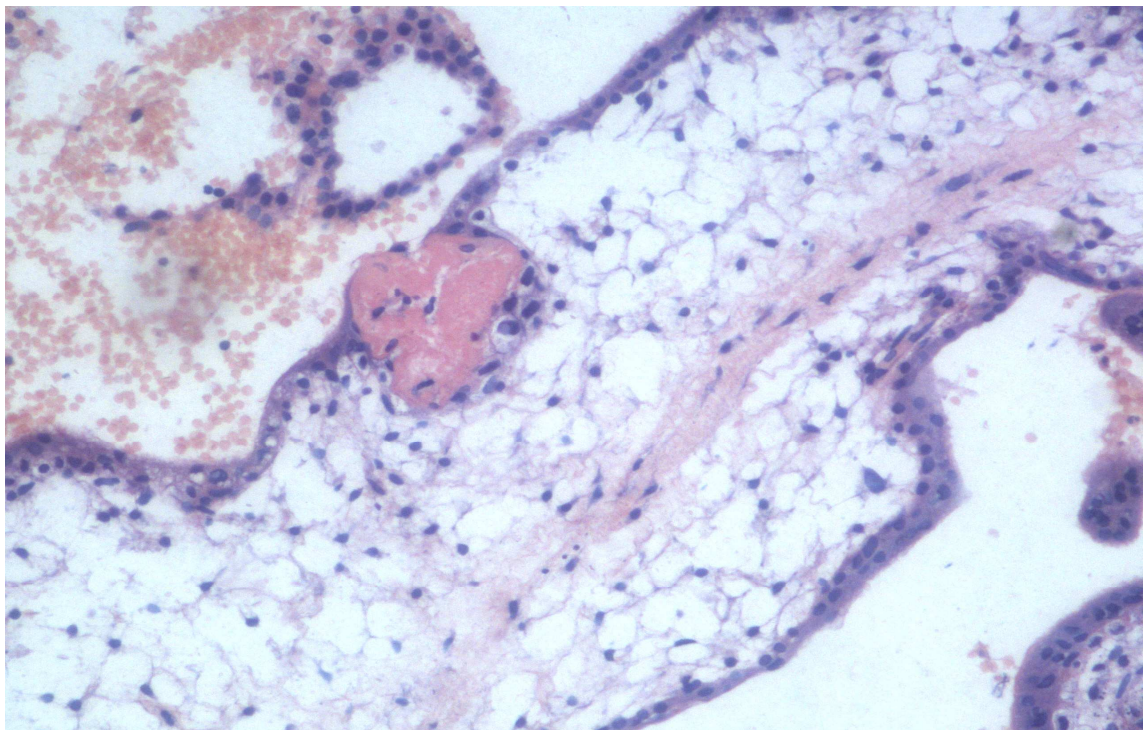


Рис 4 Сладжирование эритроцитов и тромбоз формирующегося межворсинчатого пространства в области ворсинчатого дерева. Окраска гематоксилином и эозином. х 150.

цитотрофобластической инвазии, а также существенно влиял на эндотелий усугубляя процессы тромбообразования.

Параллельные процессы тромбообразования наблюдались и в формирующемся межворсинчатом пространстве и в сосудах ворсинчатого дерева (рис.4). На фоне выраженной лейкоцитарной инфильтрации нередко определялись очаги колликвационного некроза, что проявлялось полным разрушением децидуальной оболочек с мелкоглыбчатым распадом клеточных ядер и формированием тканевого детрита, окруженного лейкоцитарным валом с распадом полинуклеарных лейкоцитов. Можно предположить, что формирование данных абсцессов гравидарного эндометрия обусловлено выраженным тромбозом венных синусоидов.

Детальное изучение функционального состояния эндотелия спиральных артерий показало, что у большинства женщин с ранними репродуктивными потерями на момент обследования было обнаружено снижение компоненты оксид азота (NO) в сыворотки крови. Результаты исследований анализа реакции Грисса суммированы в табл.1. Из представленных данных следует, что при угрозе прерывания беременности отмечается тенденция к снижению уровня NO по сравнению с аналогичным показателем при неосложненной беременности. Что касается пациенток с неразвивающейся беременностью, то NO был снижен в 2,5 раза по сравнению с аналогичным показателем у женщин с неосложненной беременностью. Аналогичные изменения отмечены и при изучении маркера E-селектин: при угрозе прерывания беременности E-селектин в 1,5 раза ниже, в при неразвивающейся беременности – в два раза ниже, чем при неосложненной беременности. При изучении ЭТ-1 выявлено увеличение данного маркера у пациенток с неразвивающейся беременностью в среднем в пять раз по сравнению с другими группами обследованных женщин.

Таблица 1

Содержание в сыворотке крови беременных маркеров дисфункции эндотелия при поступлении

Группы	п	ЭТ-1, фмоль/мл	NO ($\mu\text{mol/L}$)	E-селектин, нг/мл
I. Неосложненная беременность	24	0,43	18.7 ± 6.9	$39,87 \pm 2,1$
II. Угрожающий аборт	30	0,51	14.3 ± 7.6	$28,3 \pm 2,6$
III. Самопроизвольный аборт	22	0,64	15.7 ± 9.1	$21,5 \pm 2,4$
IV. Неразвивающаяся беременность	20	2,68*	$8.5 \pm 3.4^*$	$19,48 \pm 3,2^*$

*- достоверность различий по сравнению с группой «неосложненная беременность» ($p < 0,05$)

Снижение показателей концентрации NO которое является основным стимулятором образования цГМФ, ведёт к снижению количество цГМФ, что увеличивает содержание кальция в тромбоцитах и гладких мышцах. Ионы кальция - обязательные участники всех фаз гемостаза и сокращения мышц. Снижение показателей NO у женщин с ранними репродуктивными потерями можно объяснить вазоконстрикцией маточным сосудов и активацией агрегации тромбоцитов.

Согласно современным представлениям, тромбоциты играют ведущую роль в запуске процесса тромбообразования. Проведенные исследования показали, что при угрозе, самопроизвольном прерывании и неразвивающейся беременности зарегистрировано достоверное снижение количества тромбоцитов по отношению к показателям при угрозе, неразвивающейся беременности и самопроизвольном прерывании ($207,2 \pm 13,4 \times 10^9$ /л.; $226,3 \pm 17,3 \times 10^9$ /л.; $213,6 \pm 16,2 \times 10^9$ /л., соответственно). У большинства женщин с ранними репродуктивными потерями на момент обследования были обнаружены нарушения в системе гемостаза, свидетельствующие об увеличении потенциала свертывания крови (гиперкоагуляции). Данные гемостазиологических исследований суммированы в табл.2.

Таблица 2

Результаты гемостазиологических исследований периферической крови беременных ($M \pm \delta$)

Группы	N	Плазменное звено			Тромбоцитарное звено
		АЧТВ, сек (30-40)	Фибриноген, г/л (2-4)	Протромбиновый индекс, % (90-105)	Агрегация тромбоцитов (АДФ),% (30-50)
Неосложненная беременность	27	$32,7 \pm 2,7$	$2,7 \pm 1,5$	$94,4 \pm 3,1$	$33,3 \pm 5,8$
Угроза выкидыша	30	$28,6 \pm 2,3^*$	$4,2 \pm 0,2^*$	$97,1 \pm 3,1$	$37,3 \pm 6,9$
Самопроизвольный выкидыш	42	$30,1 \pm 1,2$	$4,1 \pm 1,7^*$	$89,8 \pm 7,1^*$	$42,5 \pm 7,1^*$
Неразвивающаяся беременность	40	$27,1 \pm 2,2^*$	$3,9 \pm 2,1^*$	$85,7 \pm 6,2^*$	$31,7 \pm 5,3$

*- достоверность различий по сравнению с группой «неосложненная беременность» ($p < 0,05$)

Показателем активации внутреннего пути свертывания служит уменьшение величины АЧТВ. У пациенток с неразвивающейся беременностью выявлено снижение показателей АЧТВ в 1,2 раза. При угрозе прерывания беременности отмечается тенденция к увеличению уровня фибриногена по сравнению с аналогичным показателем при неосложненной беременности. В группе со спонтанным абортom и неразвивающейся беременностью количество фибриногена превышает показатели при неосложненной беременности в 1,5 раза. Протромбиновый

индекс, характеризующий внешний путь свертывания, при неосложненной беременности составил $94,4 \pm 3,1\%$ и достоверно уменьшался в группе со спонтанным абортom и неразвивающейся беременностью в 1,2 раза. Анализ агрегационной активности клеток, стимулированных АДФ, выявил достоверное увеличение агрегации тромбоцитов при спонтанном аборте по сравнению с такими же показателями при Неосложненной беременности.

Активация тромбоцитов приводит к изменению их формы из дисков в сферы - активированные клетки, с повышенной способностью к адгезии, образованию агрегатов и секреции биологически активных соединений, непосредственно участвующих или влияющих на гемостаз [Репина М. А., 2008; Шитикова А.С., 2008]. Использованный нами в работе метод компьютерной морфометрии живых тромбоцитов является практически единственной возможностью оценить в режиме реального времени изменения структуры и функции этих клеток. Ретроспективный анализ литературы и полученная нами база данных фазово-интерференционных изображений клеток позволили выделить и идентифицировать 4 морфологических типа живых тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации. Основой для дискриминации структурно измененных клеток служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина.

В условиях физиологической нормы [Василенко И.А., 2009; Гаспарян С.А., 2009] подавляющее большинство тромбоцитов было представлено плоскими, округлыми клетками с гладкой или складчатой поверхностью — «гладкие» и «рифленые» дискоциты, соответствующие I типу. Ко II морфологическому типу тромбоцитов были отнесены клетки округлой или неправильной формы с гладкой или складчатой поверхностью и 1–3 короткими (меньше диаметра клетки) отростками-псевдоподиями, являющимися выростами поверхностной мембраны – «эхиноциты» 1 класса. Клетки, имеющие около 2-5 длинных (больше диаметра клетки) отростков - «антенн», представляли III тип и отличались большим многообразием форм: от плоских дисков до клеток неправильной причудливой формы – «эхиноциты» 2 класса. Тромбоциты неправильной формы с неровной бугристой поверхностью, большим количеством отростков различной длины и многочисленными вакуолями были отнесены к IV морфологическому типу - дегенеративно-измененным клеткам.

В наших исследованиях у женщин с физиологическим течением беременности 56% тромбоцитов представлены клетками «покоя», 28% - тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество клеток с длинными отростками - «антеннами» составляет 11%(III тип), а дегенеративно-измененных (IV тип) - всего 5%. У беременных с угрозой прерывания беременности на сроке гестации 8-12 недель процент тромбоцитов «покоя» составил 57%; около 26% клеток представлены эхиноцитами с короткими отростками (II тип); практически 12% относятся

к III типу, а число дегенеративно-измененных клеток составили 5%. Для популяции тромбоцитов в условиях неразвивающейся беременности характерна следующая морфологическая картина: значительное уменьшение в циркуляции тромбоцитов «покоя» (до 45%) и высокое содержание активированных клеток (32% - тромбоцитов II типа; 14% - III типа) увеличение дегенеративно-измененных тромбоцитов IV типа до 9%), а в популяции тромбоцитов в условиях самопроизвольного прерывания беременности выявлено значительное уменьшение в циркуляции тромбоцитов «покоя» (до 46%) и высокое содержание активированных клеток (30% - тромбоцитов II типа; 15% - III типа) и также высокое содержание дегенеративно-измененных тромбоцитов IV типа до 9%).

Таким образом, у пациенток с невынашиванием ранней беременности на фоне резкого снижения числа тромбоцитов покоя (45%), увеличено содержание клеток с низким (32%) и высоким уровне активации (15%) при значительном, практически двукратном повышении процента дегенеративных тромбоцитов (9%). По-видимому, такое состояние можно квалифицировать как состояние напряжения с признаками декомпенсации. В табл.3 суммированы средние в популяции размерные показатели тромбоцитов периферической крови. Обращает внимание увеличение средних по популяции значений диаметра (на 10% и более), периметра (на 8,5%) и площади (на 11%) циркулирующих тромбоцитов у женщин с физиологической беременностью.

Таблица 3

Размерные параметры тромбоцитов периферической крови (M±m)

Группы	n	Диаметр (D), мкм	Периметр (P), мкм	Высота (H), мкм	Площадь (S), мкм ²	Объем (V), мкм ³
Неосложненная беременность	26	2,9 ± 0,8*	8,4 ± 3,7	1,17 ± 0,4*	5,1 ± 1,2*	1,7 ± 0,2*
Угроза выкидыша	35	3,2 ± 1,2*	8,9 ± 3,4*	1,0 ± 0,4*	5,6 ± 1,8*	1,5 ± 0,7
Самопроизвольный выкидыш	17	3,9±0,1*	8,9±3,7 *	1,2±0,4	5,1±3,8 *	1,7±1,3
Неразвивающаяся беременность	47	3,45±1,2*	9,7±4,7 *	1,0±0,4 *	7,09 ±3,0*	2,46±1,8*

*- достоверность различий по сравнению с группой «физиологическая беременность» (p<0,05)

Является очевидным, что по сравнению с клетками женщин с физиологическим течением беременности, тромбоциты женщин с угрозой прерывания беременности достоверно отличаются большими значениями диаметра и площади (на 12 и 11%, соответственно), в то время как высота, периметр и объем клеток снижаются (на 17, 6 и 6%, соответственно).

Вероятнее всего, это связано с появлением в кровеносном русле большего числа активированных тромбоцитов с характерным рельефом поверхности и наличием отростков-псевдоподий. При неразвивающейся беременности максимальные средние значения диаметра, периметра, площади и объема тромбоцитов увеличиваются на 19,2%; 15,9%; 39,1% и 44,4%, соответственно.

Полученные результаты демонстрируют, что в I триместре неосложненной беременности наблюдались вполне определенные адаптивные изменения системы гемостаза, заключающиеся в повышении коагуляционной способности крови; в изменении основных размерных параметров клеток (увеличении диаметра, периметра, площади и объема, но снижении их фазовой высоты); повышении уровня активационного статуса тромбоцитов. При самопроизвольном прерывании беременности происходят выраженные нарушения тромбоцитарного звена гемостаза, которые проявлялись как в изменении морфологии клеток, так и в изменении их функциональной активности. При этом следует отметить, что у пациенток с неразвивающейся беременностью нарушения в системе гемостаза, как плазменного, так и тромбоцитарного звеньев носили более выраженный характер.

Полученные результаты имеют важное значение поскольку точное знание адаптивных изменений системы гемостаза при невынашивании ранней беременности позволяет проводить более успешную диагностику возможных гемостазиологических осложнений в акушерстве, дифференцировать физиологическую гиперкоагуляцию и патологическую активацию гемостаза, проводить целенаправленную коррекцию выявленных дефектов.

В жизнедеятельности организма процесс тромбообразования может иметь как положительное, так и отрицательное значение. Известно, что именно тромбоциты играют важную роль в механизмах гемостаза, особенно в реализации первичного гемостаза. Наиболее выраженные нарушения гемостаза выявлены у пациенток с самопроизвольным прерыванием и неразвивающейся беременностью.

Использование эндотелии сосудов и выделяемые вещества и их влияние на тромбоцитарного звена гемостаза, в практическом акушерстве является целесообразным и оправданным, поскольку позволяет в рамках одного метода оперативно, выявить уровень функциональной полноценности циркулирующих клеток и охарактеризовать возможные изменения показателей тромбоцитов в традиционных функциональных тромбоцитарных тестах.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что сочетание гемокоагуляционных расстройств с выраженным тромбообразованием, распространенной воспалительноклеточной лейкоцитарной инфильтрации, формирования абсцессов с участками колликвационных некрозов и

распространенных коагуляционных некрозов, обуславливает признаки эндотелиальной дисфункции сосудов (снижение уровней оксида азота, E-селектина и увеличение ЭТ-1), нарушения в системе гемостаза: гетерогенность циркулирующей популяции тромбоцитов (снижение содержания тромбоцитов «покоя», повышение высоко активированных и дегенеративно-измененных форм), коррелирующие со снижением индекса пульсации в маточных, спиральных и радиальных артериях, начиная с 6-8 недели беременности, что объясняет направленность процессов как гибели плодного мешка с формированием неразвивающейся беременности, так и развития самопроизвольных выкидышей при отторжении инфицированного эндометрия.

ВЫВОДЫ.

1. Особенности эндотелиальной дисфункции сосудов при ранних репродуктивных потерях являются: снижение уровней оксида азота (NO) в два раза, E-селектина – в полтора раза и увеличение ЭТ-1 в пять раз.
2. Установлены достоверные корреляционные связи между маркерами эндотелиальной дисфункции, морфометрическими параметрами циркулирующих тромбоцитов и показателями коагулограммы: снижение уровней оксида азота (NO) и E-селектина и увеличение ЭТ-1 коррелируют с увеличением периметра тромбоцитов более чем на 9%; снижением их фазовой высоты более чем на 17%; повышением количества активированных и дегенеративно-измененных форм в циркулирующем пуле клеток более 30% и 10%, соответственно, что является причиной снижения периферического сосудистого сопротивления в маточных, спиральных и радиальных артериях.
3. Эндотелиальная дисфункция, гетерогенность циркулирующей популяции тромбоцитов, варибельность средних морфометрических показателей тромбоцитов, а также их гиперфункция являются основными триггерами гемокоагуляционных расстройств с выраженным тромбообразованием, распространенной воспалительноклеточной лейкоцитарной инфильтрацией, формированием абсцессов с участками колликвационных и распространенных коагуляционных некрозов, ведущих к выключению важных структурных компонентов в зоне анатомического контакта ворсин хориона и эндометрия.
4. Высокая степень выраженности маркеров эндотелиальной дисфункции (снижение уровней оксида азота (NO) и E-селектина и

увеличение ЭТ-1), изменений показателей морфофункционального состояния тромбоцитов (снижение числа тромбоцитов покоя (до 45%), увеличение содержания клеток с низким (до 32%) и высоким уровнем активации (до 15%), повышение в два раза количества дегенеративных тромбоцитов; наличие крупных клеток, отличающихся большим диаметром, периметром и площадью, но низкой фазовой высотой) периферической крови, нарушений доплерометрических показателей кровотока в маточных, спиральных и радиальных артериях, является прогностически неблагоприятным критерием исхода беременности в ранние сроки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентки с экстрагенитальными и гинекологическими заболеваниями, имеющие искусственные и самопроизвольные аборты (включая неразвивающиеся беременности) в анамнезе составляют группу риска по повторным потерям беременности.
2. Всем пациенткам с ранними потерями беременности в анамнезе необходимо обследование, включающее:
 - гистологическое исследование эндометрия на 7-10 день менструального цикла;
 - определение маркеров эндотелиальной дисфункции (оксид азота, Е-селектин и ЭТ-1);
 - ультразвуковое исследование органов малого таза с доплерометрией сосудов матки на 5-9 и 22-24 день менструального цикла;
 - морфометрию тромбоцитов периферической крови в первую фазу менструального цикла.
3. При выявлении:
 - морфологических признаков хронического эндометрита: воспалительные инфильтраты вокруг желез и сосудов, наличие в инфильтратах плазматических клеток, очаговое фиброзирование стромы эндометрия, склеротические изменения стенок спиральных артерий;
 - снижении уровней оксида азота и Е-селектина и увеличении ЭТ-1;
 - ультразвуковых изменений структуры эндометрия: неоднородность эндометрия, появление гиперэхогенных включений в базальном слое эндометрия, увеличение в среднем в 1,5 раза показателей доплерометрии (PI и IR);
 - изменений морфофункциональных параметров тромбоцитов периферической крови: увеличение содержания клеток с низким и высоким уровнем активации, на фоне снижения числа тромбоцитов «покоя», а также увеличение показателей фазово-интерференционных портретов (периметра, площади, объема и диаметра)

необходимо назначение реабилитационных мероприятий.

4. Своевременные реабилитационные мероприятия позволяют планировать следующую беременность с минимальным риском неблагоприятного исхода.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Туре Пенго Эльвира Д.Ф., Айени Даниель Олусола, Коннон Ромео Небезопасный аборт в Африке//Журн. Мать и Дитя в Кузбассе. – 2011. - № 1.- С. 351-352.
2. Туре Пенго Эльвира Д.Ф., Айени Даниель Олусола. Проблемы родовспоможения в Кот Д'Ивуар //Акушерство и гинекология, - 2010.- №4. - с 43-47.
3. Ордянц И.М., Макаева Д.А., Олусола Д., Алиева Э.А., Гашенко А.А. Цитоморфометрическое прогнозирование невынашивания ранней беременности// Журн. Мать и Дитя в Кубассе.- 2012.- №1.- с. 83-87
4. Апресян С.В., Виноградская Ю.Б., Васина О.Н., Макаева Д.А., Буренкова И.А., Олусола Д. Характеристика морфофункционального состояния тромбоцитов при физиологической беременности и угрозе ее прерывания в I триместре//Материалы Всероссийской конференции с международным участием « Охрана репродуктивного здоровья - будущее России».- Белгород. -2010., с. 10-13
5. Айени Даниель Олусола., Туре Пенго Эльвира Д.Ф. Особенность эндотелиальной функции сосудов матки у женщин с ранними репродуктивными потерями//IV международная научная конференция «science 4 health» РУДН.-Москва - 2012., с.20
6. Айрапетов Д.Ю., Алиева Э.А., Гашенко А.А., Олусола Даниель. привычные ранние репродуктивные потери//IV международная научная конференция «science 4 health» РУДН.-Москва- 2012., с.19

ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ В ГЕНЕЗЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ

**Айени Даниель Олусола
(Россия)**

Работа посвящена выявлению факторов риска и определению прогностической значимости морфофункционального состояния эндотелия спиральных артерий и изменений интегральных морфометрических характеристик тромбоцитов у женщин с ранними репродуктивными потерями.

Основной причиной недостаточности инвазии внутрисосудистого цитотрофобласта являются: снижение уровней оксида азота (NO) и E-селектина и увеличение ЭТ-1, что коррелирует с увеличением периметра тромбоцитов; снижением их фазовой высоты и повышением количества дегенеративно-измененных форм в циркулирующем пуле клеток. Соответственно, это является причиной снижения периферического сосудистого сопротивления в маточных, спиральных и радиальных артериях.

Определение степени выраженности маркеров эндотелиальной дисфункции, изменений показателей морфофункционального состояния тромбоцитов, повышение количества дегенеративных тромбоцитов периферической крови, нарушение доплерометрических показателей кровотока в маточных, спиральных и радиальных артериях, могут служить прогностическими неблагоприятными критериями исхода беременности в ранние сроки.

Endothelial dysfunction in the genesis of early pregnancy losses

**Ayeni Daniel
(Russia)**

This research was devoted to the identification of risk factors, defining the prognostics importance of the morfo-functional states of the endothelium of spiral arteries and the integrated changes of the morphometric characteristics of platelets in women with early pregnancy.

The principal causes of intravascular cytotrophoblast invasion insufficiency are: reduction of NOs level and E-celektine level in serum samples and a rise in Endothelin-1 levels, which correlates with the changes of circulating population of platelets - depressed numbers of platelets at rest, rising of quantity of degenerated platelets which leads to a low vascular resistance in the uterine, spiral and radial arteries.

Definition of markers of endothelial dysfunctions, changes in parameters of the morpho-functional states of platelets, increase in the quantity of degenerated platelets and ultrasonic estimation of the blood flow in the uterine, spiral and radial arteries may serve as prognostic criteria to determine the end result of early pregnancy losses.