



Исследование взаимосвязи состава микровезикул крови беременных с последующими плацента-ассоциированными осложнениями

А.Г. Микаелян ✉, М.В. Марей, Ю.С. Булатова, Н.К. Тетруашвили, М.Ю. Высоких

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: выявить взаимосвязь между содержанием сигнальных белковых последовательностей митохондриального происхождения в микровезикулах крови беременных и последующим развитием синдрома задержки роста плода (СЗРП), маловесного плода, преэклампсии (ПЭ) или нормальными массо-ростовыми показателями плодов и новорожденных.

Дизайн: проспективное сравнительное исследование.

Материалы и методы. Исследована микровезикулярная фракция плазмы крови женщин с наличием плацента-ассоциированных осложнений в исходе предыдущих беременностей как у группы риска повторного их развития ($n = 96$). Основная группа была разделена на 4 подгруппы: в подгруппу IA входили 32 пациентки, беременность которых осложнилась СЗРП, подгруппа IB состояла из 20 пациенток, у которых к манифестации СЗРП присоединилась ПЭ, в подгруппу IV вошли 24 беременные, у которых родились маловесные к сроку гестации дети, подгруппу ID составили 20 беременных с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе и аномальными показателями доплерометрии, масса и рост детей которых после рождения не отличались от нормативных значений. Контрольную группу составили 20 женщин с физиологическим течением беременности. Микровезикулярная фракция периферической крови пациенток получена методом дифференциального ультрацентрифугирования плазмы. Определение содержания белка внешней мембраны митохондрий (VDAC1), активатора транскрипции и репликации митохондриальной ДНК (TFAM), белка слияния внешних мембран митохондрий (MFN2), а также белка TAZ, отвечающего за ремоделирование кардиолипина при его окислительном повреждении, проводилось методом вестерн-блот анализа с помощью панели моноклональных антител.

Результаты. В микровезикулах плазмы крови пациенток с последующим развитием плацента-ассоциированных осложнений происходило снижение содержания ряда митохондриальных белков (транспортного мембранного белка VDAC1, митохондриального фактора транскрипции TFAM, белков слияния митохондрий MFN2, OPA1). Уровни этих белков и определяют успешность передачи сигнала в рамках межклеточной коммуникации об адекватной функциональной активности митохондрий, их целостности и нормального биогенеза.

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать заключение о наличии нарушений митохондриального биогенеза у беременных с формирующимися плацента-ассоциированными осложнениями, что, вероятно, вносит серьезный вклад в их развитие.

Ключевые слова: синдром задержки роста плода, микровезикулы, привычный выкидыш, плацентарная недостаточность, преэклампсия, митохондрии, беременность.

Вклад авторов: Микаелян А.Г., Марей М.В., Булатова Ю.С., Тетруашвили Н.К., Высоких М.Ю. — разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, статистический анализ полученных данных, написание текста рукописи, утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Источник финансирования: работа поддержана финансированием государственного задания «Разработка системы прогнозирования осложнений и исходов беременностей у женщин с привычным выкидышем» № 16-A21.

Для цитирования: Микаелян А.Г., Марей М.В., Булатова Ю.С., Тетруашвили Н.К., Высоких М.Ю. Исследование взаимосвязи состава микровезикул крови беременных с последующими плацента-ассоциированными осложнениями. Доктор.Ру. 2022; 21(5): 6–12. DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-5-6-12



The Study of the Relationship Between Blood Microvesicle Structure in Pregnant Women with Subsequent Placenta-Associated Complications

A.G. Mikayelyan ✉, M.V. Marey, Yu.S. Bulatova, N.K. Tetrushvili, M.Yu. Vysokikh

FSBI "National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov" Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 4 Academician Oparin Str., Moscow, Russian Federation 117997

ABSTRACT

Study Objective: To find the relationship between the levels of mitochondrial signal protein sequences in blood microvesicles of pregnant women and subsequent development of foetal growth retardation syndrome (FGRS), low birth-weight baby, preeclampsia (PE) or fetuses and newborns with normal weight and height.

Study Design: Prospective comparative study.

Materials and Methods. The microvesicular blood plasma fraction of women with placenta-associated complications in the outcome of previous pregnancies was studied as a risk group for their recurrence ($n = 96$). The study group was divided into 4 sub-groups: sub-group IA included 32 patients with pregnancies complicated with FGRS; sub-group IB comprised 20 patients with FGRS and PE; sub-group IC included 24 pregnant women, whose newborns were small for gestation age; sub-group ID was 20 pregnant women with a history of placenta-associated complications and abnormal Doppler velocimetry results, whose postnatal weight and height did not differ from normal values. The control group consisted of 20 women with a physiological course of pregnancy. The microvesicular fraction of the peripheral blood of the patients was obtained by differential plasma ultracentrifugation. Protein of the outer membrane of mitochondria (VDAC1), mitochondrial DNA

✉ Микаелян Асмик Гагиковна / Mikayelyan, A.G. — E-mail: mikaelyan_asmik@bk.ru

transcription and replication activator (TFAM), recombinant protein of the outer membrane of mitochondria (MFN2), and TAZ protein encoding cardiolipin modelling in oxidative damage were measured by western blot analysis using a monoclonal antibody panel.

Study Results. Plasma microvesicles in patients with subsequent placenta-associated complications demonstrated decreased levels of a number of mitochondrial proteins (VDAC1, TFAM, MFN2, OPA1). Levels of these proteins determine successful intercellular signaling on the adequate functional activity of mitochondria, their integrity and normal biogenesis.

Conclusion. The obtained results allow to make a conclusion about a pronounced violation of mitochondrial biogenesis in the body of women with intrauterine growth restriction, which probably makes a serious contribution to the development of pathology and its progression.

Keywords: foetal growth retardation syndrome, microvesicles, habitual abortion, placental insufficiency, preeclampsia, mitochondria, pregnancy.

Contributions: Mikayelyan A.G., Marey M.V., Bulatova Yu.S., Tetrushvili N.K., Vosokikh M.Yu. — developing of research design, obtaining data for analysis, reviewing publications on the topic of the article, statistical analysis of the obtained data, article writing, approval of the manuscript for publication.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have any conflict of interests.

Source of funding: The work was supported by State order “Development of a system for predicting complications and outcomes of pregnancies in women with recurrent pregnancy losses” No. 16-A21.

For citation: Mikayelyan A.G., Marey M.V., Bulatova Yu.S., Tetrushvili N.K., Vosokikh M.Yu. The Study of the Relationship Between Blood Microvesicle Structure in Pregnant Women with Subsequent Placenta-Associated Complications. Doctor.Ru. 2022; 21(5): 6–12. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-5-6-12

ВВЕДЕНИЕ

Понятие «плацента-ассоциированные осложнения» в акушерстве объединяет целый ряд состояний, в основе которых лежат нарушения имплантации и плацентации: задержка роста плода, ранняя преэклампсия (ПЭ), антенатальная гибель плода, неоднократные кровотечения из-за отслойки плаценты, некоторые случаи экстремально ранних и ранних преждевременных родов. Известно, что в большинстве случаев при неустановленной этиологии и нескорректированных нарушениях можно ожидать повторного развития вышеуказанных осложнений. Особенно это относится к женщинам с неоднократными ранними потерями и/или потерями плода во втором триместре беременности.

Синдром задержки роста плода (СЗРП) является одной из ведущих причин заболеваемости и перинатальной смертности. СЗРП определяется как замедление темпов роста плода, приводящее к отклонению его линейных размеров от нормальных значений для данного срока гестации и к массе плода при рождении ниже десятого процентиля для данного срока беременности.

На развитие СЗРП оказывают влияние факторы материнского, фетального или плацентарного происхождения. Наиболее значимые из них — возраст матери, интервал между беременностями, курение, наличие инфекций, нарушение обменной функции плаценты, тромбофилии высокого риска, некоторые экстрагенитальные заболевания, пороки развития плода, хромосомные нарушения [1].

Имеет значение и акушерский анамнез матери. Так, известно, что у женщин с тремя и более выкидышами в анамнезе значимо выше риск развития СЗРП. Кроме того, при физиологической беременности рост и развитие плода протекают под строгим контролем иммунной системы матери, которая с прогрессированием беременности переключается с провоспалительного фенотипа (в первом триместре) на противовоспалительный (в начале второго триместра) [2]. Это позволяет материнскому организму не отторгать полуаллогенный плод, клетки которого содержат отцовские антигены.

В то же время в течение беременности между плодом и материнским организмом существует связь, обусловленная механизмами межклеточной коммуникации и регулирующая нормальное течение беременности. Межклеточная сигнализация состоит из трех основных частей: проксимального элемента (источника сигнальных молекул), транспортного элемента (микровезикулы, экзосомы) и дистального элемента (клеток, принимающих сигнал) [3, 4].

На сегодняшний день микровезикулы рассматриваются исследователями как ключевое звено в парадигме межклеточ-

ной коммуникации [4]. Микровезикулы продуцируются большинством типов клеток: представляя собой сферы, образованные липидным бислоем, они содержат набор белков и липидов, а также ДНК, мРНК и некодирующие РНК различных типов. Наличие микровезикул показано практически во всех жидкостях организма — в крови, лимфе, слюне, моче, амниотической жидкости, молоке и др. [5, 6]. Входящие в состав везикул молекулы характерны для типа секретирующих их клеток и полностью сохраняют соответствующую биологическую активность [7, 8]. Это делает секретируемые клетками везикулы объектом пристального внимания исследователей не только в качестве компонента нового типа межклеточного взаимодействия и регуляции, но и в качестве потенциальных биомаркеров, отражающих клеточные процессы, происходящие в организме, в том числе и при патологических состояниях [9, 10].

Характерной чертой микровезикул является их небольшой размер — от 100 до 1000 нм. Микровезикулы образуются посредством выпячивания плазматической мембраны и содержат в своем составе элементы цитозоля секретирующих их клеток, а также ферменты и транскрипционные факторы. Такой характер биогенеза микровезикул обуславливает тот факт, что молекулярный состав их содержимого и набор белков, встроенных в их мембраны, напрямую зависят от степени представленности этих молекул в цитоплазме и плазматической мембране клетки-донора на момент формирования микровезикулы [11, 12].

После достижения клетки-мишени и слияния с ней, опосредованного специальной системой рецепции, содержимое микровезикул может оказывать влияние на трансляционную активность клеток-мишеней, контролируя их метаболизм и такие важные для поддержания тканевого гомеостаза процессы, как пролиферация, апоптоз, ангиогенез и другие [13].

В ряде работ показано, что количество и состав микровезикул крови при той или иной патологии весьма специфичны. Некоторые авторы продемонстрировали, что уровень циркулирующих в материнском кровотоке микровезикул увеличивается со сроком гестации. Таким образом, характеристика состава микровезикул важна для понимания механизмов межклеточной коммуникации в системе «мать — плод» и вышеописанных процессов в плаценте, обеспечивающих ее функциональную состоятельность.

Ранее нами обнаружено, что изменение уровней митохондриальных белков в плазме крови беременных свидетельствует о наличии вариантов взаимодействия провоспалительных факторов митохондриального происхождения (ПФМП) в патогенезе привычного выкидыша и экстремально ранних преждевременных родов [14, 15]. Установлено

развитие избыточной воспалительной реакции, препятствующей нормальной инвазии трофобласта и вызывающей осложнения беременности [16, 17].

В связи с этим **цель нашего исследования** — выявление взаимосвязи между содержанием сигнальных белковых последовательностей митохондриального происхождения в микровезикулах крови беременных и последующим развитием СЗРП, маловесного плода, ПЭ или нормальными массо-ростовыми показателями плодов и новорожденных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективном сравнительном исследовании основную группу составили беременные женщины (начиная со срока 24 недели) с измененными данными доплерометрии (снижением показателей фето-плацентарного и/или маточно-плацентарного кровотока) и/или уменьшением фетометрических показателей при УЗИ. У всех пациенток основной группы в анамнезе отмечены плацента-ассоциированные осложнения в течение предыдущих беременностей — СЗРП, ПЭ, антенатальная гибель плода, преждевременные роды, обусловленные дистрессом плода.

Критериями исключения из основной группы были ранняя ПЭ на момент исследования, тяжелые экстрагенитальные заболевания, системные заболевания соединительной ткани, резус-сенситизация.

Группу контроля (группу «норма») составили 20 беременных с неотягощенным акушерским анамнезом, физиологическим течением беременности и нормальными показателями ультразвуковой фетометрии и доплерометрии в сроке 24 недели беременности.

У женщин обеих групп проводились заборы периферической крови с интервалом 4 недели до момента родоразрешения.

Согласно критериям включения и исключения, в основную группу отобраны 96 беременных. Ввиду различий клинико-патогенетических осложнений, течения и исходов беременности после родоразрешения основная группа была разделена на 4 подгруппы: в подгруппу IA входили 32 пациентки, беременность которых осложнилась СЗРП, подгруппа IB состояла из 20 пациенток, у которых к манифестации СЗРП присоединилась ПЭ, в подгруппу IB вошли 24 беременные, у которых родились маловесные к сроку гестации дети, подгруппу IG составили 20 беременных с плацента-ассоциированными осложнениями в анамнезе и аномальными показателями доплерометрии, масса и рост детей которых после рождения не отличались от нормативных значений. Итого в исследовании приняли участие 116 пациенток — 96 женщин основной группы и 20 женщин группы контроля.

Наблюдение и родоразрешение пациенток проводились в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в 2019–2022 гг. Все беременные основной группы получали

терапию низкомолекулярными гепаринами подкожно в профилактической дозе и ацетилсалициловую кислоту при установленном высоком риске ПЭ по результату комбинированного скрининга первого триместра.

Образцы плазмы крови собирали на базе в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в соответствии с рекомендациями и требованиями этического комитета. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на забор биологического материала.

Микровезикулы выделяли из плазмы крови методом дифференциального центрифугирования: кровь центрифугировали при 2000 g в течение 15 мин при температуре +4°C для осаждения клеток и клеточного дебриса на центрифуге ELM1 (Эстония), супернатант центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин при температуре +4°C на центрифуге Optima L7 (Beckman Coulter, США).

Получившийся осадок, содержащий фракцию микровезикул, дважды промывали переосаждением при тех же условиях в фосфатно-солевом буфере. В пробе измеряли концентрацию белка методом с бичинхоиновой кислотой в соответствии с рекомендациями производителя (Pierce, США). Методом вестерн-блот при помощи первичных моноклональных антител и вторичных антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, и детекции хемилюминесценции на приборе ChemiDoc (Bio-Rad, США) в микровезикулярной фракции плазмы пациенток с СЗРП и женщин с физиологической беременностью на сроках 25, 29, 33 и 37 недель проведен сравнительный анализ относительного содержания следующих белков: белка внешней мембраны митохондрий (VDAC1), активатора транскрипции и репликации митохондриальной ДНК (TFAM), белка слияния внешних мембран митохондрий (MFN2), а также белка TAZ, отвечающего за ремоделирование кардиолипина при его окислительном повреждении.

Нормирование сигнала проводили на общее содержание белка в пробе, полученные данные обработаны при помощи программ Statistics for Windows v8.0 и Prism 8.0 (Graph Pad, США). Данные представляли в виде среднего со стандартной ошибкой среднего. Статистически значимыми различия считали при значении $p < 0,05$ в соответствии с многомерным обобщенным критерием Краскелла — Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение беременности нами проанализированы показатели пренатального скрининга, осложнения по триместрам, фетометрические, доплерометрические параметры, клиническое состояние беременных и родильниц, состояние новорожденных.

Осложнения ранних сроков беременности приведены в *таблице 1*.

Таблица 1 / Table 1

Осложнения ранних сроков беременности у пациенток исследуемых групп, n (%)
Early pregnancy complications in study groups, n (%)

Осложнение беременности	Подгруппа IA (n = 32)	Подгруппа IB (n = 20)	Подгруппа IB (n = 24)	Подгруппа IG (n = 20)
Угрожающий выкидыш (кровотечение):				
• до 12 нед;	13 (40,6)	4 (20,0)	6 (25,0)	10 (50,0)
• 12–21 нед	3 (9,4)	0	5 (20,8)	0
Острая респираторная вирусная инфекция в I триместре	6 (18,8)	6 (30,0)	7 (29,2)	0
Рвота беременных	10 (31,3)	6 (30,0)	5 (20,8)	6 (30,0)
Истмико-цервикальная недостаточность	9 (28,1)	4 (20,0)	5 (20,8)	4 (20,0)

Как следует из представленных данных, в подгруппе с СЗРП чаще, чем в при СЗРП + ПЭ, отмечались кровотечения в первом и начале второго триместра беременности. В целом угрожающий выкидыш первого триместра был частым осложнением во всех подгруппах основной группы.

ОРВИ в первом триместре перенесли всего около 20% пациенток, что также могло быть одним из факторов воспалительных изменений и плацентарной недостаточности. В частоте таких осложнений, как рвота беременных и истмико-цервикальная недостаточность, не зафиксированы значимые различия между подгруппами.

По результатам комбинированного скрининга первого триместра, высокий риск СЗРП и ПЭ зафиксирован у 13 (40,6%) женщин подгруппы IA, 8 (40%) из подгруппы IB, 5 (20,8%) из подгруппы IB и 10 (50%) из подгруппы IG. Из представленных данных следует, что более чем у половины женщин с последующим развитием СЗРП и ПЭ не был выявлен высокий риск этих состояний в ходе скрининга первого триместра, тогда как у женщин с последующим рождением ребенка нормальной массы на фоне проводимой антикоагулянтной и антиагрегантной терапии в 50% случаев такой риск был установлен в 12 недель беременности.

Полученные данные указывают на недостаточную чувствительность скрининга первого триместра и диктуют необходимость дальнейших исследований для поиска информативных предикторов акушерских осложнений.

Первые проявления нарушения кровотока в маточных артериях зафиксированы у всех женщин исследуемых подгрупп в сроке 24 недели беременности (критерий включения

в основную группу), при этом в сочетании с нарушением кровотока в артерии пуповины — у 20 (62,5%) подгруппе в IA, у 4 (20,0%) в подгруппе IB, в остальных подгруппах фето-плацентарный кровоток во втором триместре не был нарушен.

Маловодие обнаружено в подгруппе IA у 10 (31,3%) беременных, в подгруппе IB — у 14 (70%), в подгруппе IB — у 4 (20,0%), в подгруппе IG маловодие отсутствовало.

Ранняя форма СЗРП в подгруппе IA установлена у 22 (68,7%) женщин, при этом самое раннее проявление, по результатам УЗИ, отмечено в 21 неделю беременности. Поздняя форма СЗРП выявлена у 10 (31,3%) женщин, а позднее проявление СЗРП наблюдалось в сроке 35 недель, кроме того, отмечалась манифестация СЗРП в подгруппе IB на сроке 33 недели.

Содержание митохондриальных белков в микровезикулах крови, полученное методом вестерн-блот, проанализировано в динамике беременности у пациенток исследуемых групп начиная со срока 24 недели с интервалом 4 недели до родоразрешения.

На первом этапе в микровезикулах плазмы в зависимости от срока гестации в группах менялся уровень митохондриального белка VDAC1, что говорит об общем изменении содержания фрагментов митохондрий в экскретируемых мембранных частицах (табл. 2). Далее для выравнивания содержания митохондриальных белков полученные данные по уровню VDAC1 в микровезикулах использовали в качестве нормировочного параметра для белков митохондриального биогенеза и TAZ.

Данные по концентрациям в микровезикулах крови белков OPA1 и DRP1, отвечающих за митохондриальный биогенез, представлены в таблицах 3, 4.

Таблица 2 / Table 2

Относительное содержание белка VDAC1 в микровезикулах крови беременных, у. е.
Relative VDAC1 levels in blood microvesicles of pregnant women, conventional units

Срок беременности (нед)	Подгруппа IA (n = 32)	Подгруппа IB (n = 20)	Подгруппа IB (n = 24)	Подгруппа IG (n = 20)	Контрольная группа
24–27	0,47 ± 0,29	0,93 ± 0,57	0,36 ± 0,17	1,50 ± 0,69	0,74 ± 0,56
28–32	0,60 ± 0,23	0,15 ± 0,04	0,29 ± 0,19	1,14 ± 0,46	0,73 ± 0,29
33–36	0,75 ± 0,33	0,63 ± 0,05	0,25 ± 0,17	0,60 ± 0,26	1,06 ± 0,48
37	0,56 ± 0,12	–	0,22 ± 0,11	0,37 ± 0,14	1,30 ± 0,04

Примечание. Здесь и в таблицах 3–5: в подгруппе синдрома задержки роста плода и преэклампсии, как правило, родоразрешение проведено в сроке до 37 недель из-за ухудшения состояния беременной и плода.

Here and Tables 3–5: in groups of foetal growth retardation syndrome and preeclampsia, delivery was mostly before week 37 due to poor condition of the mother and foetus.

Таблица 3 / Table 3

Относительное содержание белка OPA1 в микровезикулах плазмы крови беременных, у. е.
Relative OPA1 levels in blood microvesicles of pregnant women, conventional units

Срок беременности (нед)	Подгруппа IA (n = 32)	Подгруппа IB (n = 20)	Подгруппа IB (n = 24)	Подгруппа IG (n = 20)	Контрольная группа
24–27	1,29 ± 0,81	2,28 ± 0,72	3,52 ± 0,89	6,64 ± 2,59	0,62 ± 0,30
28–32	2,28 ± 0,70	2,03 ± 0,36	4,07 ± 1,42	4,20 ± 2,09	0,89 ± 0,29
33–36	2,85 ± 0,75	1,71 ± 0,99	1,18 ± 0,34	3,33 ± 0,25	0,48 ± 0,18
37	13,62 ± 5,04*, **	–	6,79 ± 3,23	3,67 ± 1,88	1,31 ± 0,33

* Отличие от показателя в 24–27 недель статистически значимо: $p < 0,05$ (критерий Краскелла — Уоллиса).

** Отличие от показателя контрольной группы в 37 недель статистически значимо: $p = 0,0078$ (критерий Краскелла — Уоллиса).

* Difference from week 24–27 values is statistically significant: $p < 0.05$ (Kruskall-Wallis test).

** Difference from controls on week 37 is statistically significant: $p = 0.0078$ (Kruskall-Wallis test).

Относительное содержание белка DRP1 в микровезикулах плазмы крови беременных, у. е.
Relative DRP1 levels in blood microvesicles of pregnant women, conventional units

Срок беременности (нед)	Подгруппа IA (n = 32)	Подгруппа IB (n = 20)	Подгруппа IB (n = 24)	Подгруппа IG (n = 20)	Контрольная группа
24–27	0,078 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,77 ± 0,24	0,05 ± 0,01
28–32	0,10 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,10	0,03 ± 0,01
33–36	0,07 ± 0,02	1,26 ± 0,85	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,13	0,07 ± 0,03
37	0,10 ± 0,02	–	0,26 ± 0,08	0,19 ± 0,08	0,02 ± 0,005

Примечательным является тот факт, что содержание белка OPA1 только в группе СЗРП значимо увеличилось к 37 неделе (рис. 1).

На рисунке 2 наглядно прослеживается изменение уровня белка OPA1 на сроке 37 недель во всех исследуемых подгруппах и при неосложненной беременности. В сроке 37 недель в подгруппе СЗРП концентрация белка OPA1 была значимо выше, чем при физиологической беременности ($p = 0,0078$). Ожидаемым являлся тот факт, что в подгруппе, в которой на фоне СЗРП развилась ПЭ, как правило, родоразрешение проведено в сроке до 37 недель ввиду ухудшения состояния беременной и плода. У женщин, у которых родились дети с малой и нормальной массой, значимые отличия от нормы отсутствовали.

По результатам проведенных измерений и нормировки на содержание белка VDAC1, можно констатировать,

что уровни белка DRP1 в микровезикулярной фракции крови беременных исследуемых групп значимо не различались.

Можно предположить, что, в отличие от нормы, в группе СЗРП на разных сроках гестации, в том числе на сроке 37 недель, сигнал о слиянии митохондрий преобладает над сигналом о делении митохондриального ретикулума, что отражает необходимость компенсации энергодефицитного состояния, связанного с низким качеством митохондрий при плацентарной недостаточности.

Данные по содержанию белка TAZ, отвечающего за сохранность ключевого липида митохондрий кардиолипина, в микровезикулах крови беременных представлены в таблице 5.

Рис. 1. Относительное содержание белка OPA1 в микровезикулах плазмы крови беременных с синдромом задержки роста плода в период с 24 по 37 недель беременности. Данные представлены в виде среднего со стандартной ошибкой среднего.
* $P < 0,05$ (критерий Краскелла — Уоллиса)
Fig. 1. Relative OPA1 levels in blood microvesicles of pregnant women with foetal growth retardation syndrome on week 24 to 37 of gestation. The data are mean values with standard error of the mean.

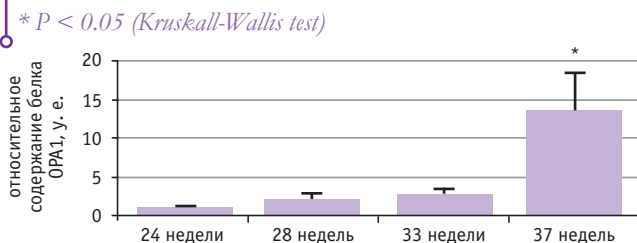
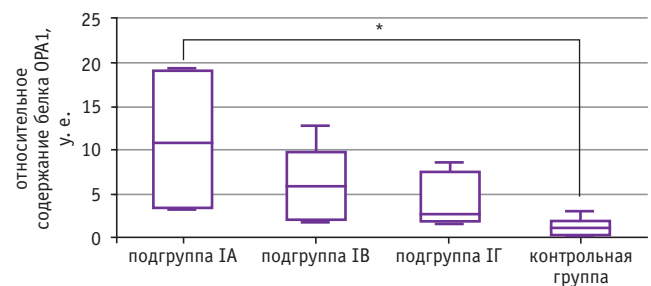


Рис. 2. Относительное содержание белка OPA1 в микровезикулах плазмы крови беременных с плацента-ассоциированными патологиями и в норме на 37 неделе гестации. Данные представлены в виде медиан с интерквартильным размахом.
* $P = 0,0078$ (критерий Краскелла — Уоллиса)
Fig. 2. Relative OPA1 levels in blood microvesicles of pregnant women with placenta associated pathologies and normal pregnancy on week 37 of gestation. The data are median values with interquartile range.
* $P = 0.0078$ (Kruskal-Wallis test)



Относительное содержание белка TAZ в микровезикулах пациенток с плацента-ассоциированными осложнениями и при неосложненной беременности, у. е.
Relative TAZ levels in blood microvesicles of pregnant women with placenta associated complications and normal pregnancy, conventional units

Срок беременности (нед)	Подгруппа IA (n = 32)	Подгруппа IB (n = 20)	Подгруппа IB (n = 24)	Подгруппа IG (n = 20)	Контрольная группа
24–27	0,39 ± 0,04	1,00 ± 0,31	0,63 ± 0,30	0,63 ± 0,12	0,24 ± 0,13
28–32	2,12 ± 0,61	1,52 ± 0,66	0,94 ± 0,36	1,79 ± 0,45	0,29 ± 0,09
33–36	0,96 ± 0,17	4,41 ± 2,05*	1,35 ± 0,43	0,90 ± 0,18	0,40 ± 0,12
37	1,10 ± 0,40	–	2,31 ± 0,54	1,35 ± 0,33	1,20 ± 0,18

* Отличия от подгрупп IA, IG и контрольной группы статистически значимы ($p < 0,05$).

* Differences from sub-groups IA, ID and controls are statistically significant ($p < 0.05$).

Анализ полученных данных выявил значимые различия в 33–36 недель гестации.

В подгруппе IB (СЗРП + ПЭ) концентрация TAZ оказалась значимо выше, чем в подгруппе СЗРП, у женщин, родивших детей с нормальной массой, и в контрольной группе (во всех случаях $p < 0,05$). Между пациентками с СЗРП + ПЭ и женщинами, у которых родились маловесные дети, значимые различия отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при окислительном стрессе, воспалении, а также некрозе происходит активное повреждение тканей и в кровотоке высвобождаются внутриклеточные структуры, обладающие выраженным провоспалительным действием. Такие соединения и фрагменты клеток принято называть аларминами (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Среди общего пула DAMPs особое место занимают паттерны, ассоциированные с митохондриями, поскольку именно корректное функционирование митохондрий определяет энергетический баланс клеток, а следовательно, и тканей в целом.

Наиболее хорошо изученные митохондриальные DAMPs — митохондриальная ДНК, N-формил пептид, а также микроРНК, связанные с регуляцией активности митохондрий [17].

В отечественной литературе распространение получил термин «провоспалительные факторы митохондриального происхождения». В данной работе мы предположили, что выделяемые в материнский кровоток микровезикулы также могут выполнять роль ПФМП и иметь митохондриальное происхождение. Предполагая, что информация о состоянии митохондрий и эффективности энергетического метаболизма является ключевой в межклеточной коммуникации при беременности, мы проанализировали содержание основных белков, характеризующих биогенез митохондрий, во фракции микровезикул крови у женщин при нормальном течении беременности и на фоне СЗРП.

В продолжение анализа содержания ряда белков митохондрий в ткани плаценты, проведенного на предыдущем этапе исследования, в 2018 году, мы оценивали концентрации белков VDAC1, OPA1, DRP1, TAZ в микровезикулах, выделенных из плазмы крови женщин с плацента-осложненной или физиологической беременностью на разных сроках (аппроксимированных к 25, 29, 33 и 37 неделям) [16, 17]. Перечисленные белки являются ключевыми мембранными и матриксными белками митохондрий, отвечающими за поддержание структурно-функциональной целостности митохондрий, а также участниками сигнального пути, приводящего к активации аутофагии.

Стоит отметить, что белки митохондриального происхождения в настоящий момент активно исследуются во всем мире на предмет их участия в развитии и потенцировании осложнений, связанных с нарушениями биоэнергетического баланса. Служащая признанным примером ПФМП митохондриальная ДНК способна запускать сигнальные каскады, приводящие к активации врожденного иммунитета. В связи с этим все большее распространение получает мнение, что и другие митохондриальные белки могут выступать в этой роли.

СЗРП зачастую становится сопутствующим осложнением при ПЭ. Недавние исследования показали, что секретируемые плацентой в материнский кровоток микровезикулы и митохондриальные DAMPs могут играть роль триггеров системного воспаления и эндотелиальной дисфункции. При ПЭ выявлено значительное увеличение количества циркулирующих в кровотоке микровезикул, а в ткани плаценты

обнаружено повышение уровня ПФМП на фоне снижения экспрессии маркеров аутофагии.

Вариантом микроаутофагии является митофагия — процесс селективного удаления из клетки поврежденных митохондрий, при этом именно баланс между скоростью биогенеза митохондрий и митофагии определяет количество митохондрий в клетке, а значит, и ее метаболический статус. В данной части работы нам удалось собрать коллекцию плазмы крови пациенток с нормальным течением беременности и с СЗРП, не сопровождающимся повышением АД и другими симптомами, характерными для ПЭ. Это позволило нам получить представление о возможной роли микровезикул и содержащихся в них митохондриальных маркеров в развитии данного типа осложнений беременности.

На стадии бластоцисты микровезикулы являются важным средством коммуникации между эмбриональными стволовыми клетками, входящими в состав внутренней клеточной массы, и клетками трофобласта, они стимулируют миграцию трофобласта и эффективную имплантацию эмбриона [18]. Кроме того, установлено, что во время нормально протекающей беременности клетки синцитиотрофобласта постоянно секретируют микровезикулы, обладающие провоспалительными, иммуноактивирующими и прокоагулянтными свойствами [19].

Продукция микровезикул усиливается в ответ на системный и локальный окислительный стресс при физиологической беременности. Предполагают, что такое мягкое системное воспаление служит фактором, поддерживающим адекватный уровень активации врожденного иммунитета матери на фоне общего подавления системы приобретенного иммунитета.

В то же время при ПЭ показано увеличение количества микровезикул в крови, в том числе микровезикул, секретируемых синцитиотрофобластом [19, 20]. Анализ маркеров, содержащихся в микровезикулах при ПЭ, позволяет предполагать их участие в развитии системной эндотелиальной дисфункции, активации системы свертывания, подавлении ангиогенеза в плаценте, потенцировании окислительного стресса.

Сведения об изменениях секреции микровезикул при СЗРП в литературе единичны, в основном рассматривается задержка роста плода, ассоциированная с ПЭ. Так, например, D. Goswamia и соавт. не выявили увеличение количества микровезикул в крови матери при нормотензивном СЗРП [20].

В рамках данной работы объектом нашего исследования также стала группа женщин с СЗРП на фоне нормотензии, однако в отличие от D. Goswamia и соавт. мы проанализировали микровезикулы на предмет маркеров митохондриального биогенеза, а не абсолютное количество микровезикул. Преобладание маркера слияния митохондрий OPA1 над маркером деления DRP1 в сроке 37 недель свидетельствует о нарушении системы отбора митохондрий, позволяющей накапливать дисфункциональные митохондрии. В то же время мы наблюдаем соответствующее состоянию окислительного стресса увеличение уровня белка TAZ, отвечающего за поддержание целостности кардиолипина — критично важного липида для выполнения митохондриями функции дыхания и продукции энергии в количестве, адекватном потребностям растущего плода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают предположение, что при синдроме задержки роста плода по сравнению с состоянием при физиологической беременности наблюдаются изменения в биогенезе и работе системы контроля качества митохондрий, приводящие к энергетической

катастрофе, вероятно, имеющей прямое отношение к развитию функциональной несостоятельности плаценты.

Характеристика состава и сравнение профилей белков, содержащихся в микровезикулах в норме и при осложнении

ях, в динамике беременности, на наш взгляд, являются перспективным подходом, который в будущем позволит малоинвазивным путем осуществлять мониторинг и прогнозирование развития акушерских осложнений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ажибеков С.А., Путилова Н.В., Третьякова Т.Б., Пестряева Л.А. Роль генетически детерминированных особенностей энергетического обмена в формировании плацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки роста плода. *Акушерство и гинекология*. 2016; 11: 11–15. [Azhibekov S.A., Putilova N.V., Tret'yakova T.B., Pestryaeva L.A. Role of the inherited characteristics of energy metabolism in the development of placental insufficiency with an outcome to intrauterine growth restriction. *Obstetrics and Gynecology*. 2016; 11: 11–15. (in Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2016.11.11-5
2. La Rocca C., Carbone F., Longobardi S., Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol. Lett.* 2014; 162(1): 41–8. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.06.013
3. Romo A., Carceller R., Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2009; 6(suppl.3): S332–6.
4. Stahl P.D., Raposo G. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward. *Essays in Biochem.* 2018; 62(2): 119–24. DOI: 10.1042/EBC20170088
5. Dimuccio V., Ranghino A., Barbato L. P., Fop F. et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One*. 2014; 9(8): e104490. DOI: 10.1371/journal.pone.0104490
6. Kornek M., Schuppan D. Microparticles: modulators and biomarkers of liver disease. *J. Hepatol.* 2012; 57(5): 1144–6. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.029
7. Rackov G., Garcia-Romero N., Esteban-Rubio S., Carrión-Navarro J. et al. Vesicle-mediated control of cell function: the role of extracellular matrix and microenvironment. *Front. Physiol.* 2018; 9: 651. DOI: 10.3389/fphys.2018.00651
8. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biol.* 2007; 9(6): 654–9. DOI: 10.1038/ncb1596
9. Garcia-Romero N., Esteban-Rubio S., Rackov G., Carrión-Navarro J. et al. Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: clinical application. *Mol. Aspects Med.* 2018; 60: 27–37. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.009
10. Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* 2011; 3: 15. DOI: 10.3410/b3-15
11. Chiarello D.I., Abad C., Rojas D., Toledo F. et al. Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020; 1866(2): 165354. DOI: 10.1016/j.bbdis.2018.12.005
12. Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine growth restriction: antenatal and postnatal aspects. *Clin. Med. Insights Pediatr.* 2016; 10: 67–83. DOI: 10.4137/CMPed.S40070
13. Mitchell M.D., Peiris H.N., Kobayashi M., Koh Y.Q. et al. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 213(4): S173–81. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.07.001
14. Vishnyakova P.A., Volodina M.A., Tarasova N.V., Marey M.V. et al. Mitochondrial role in adaptive response to stress conditions in preeclampsia. *Sci Rep.* 2016; 6: 32410. DOI: 10.1038/srep32410
15. Vishnyakova P.A., Tarasova N.V., Volodina M.A., Tsvirkun D.V. et al. Gestation age-associated dynamics of mitochondrial calcium uniporter subunits expression in feto-maternal complex at term and preterm delivery. *Sci Rep.* 2019; 9: 5501. DOI: 10.1038/s41598-019-41996-3
16. Вишнякова П.А., Суханова Ю.А., Микаелян А.Г., Булатова Ю.С. и др. Синдром задержки роста плода и маркеры митохондриальной дисфункции. *Акушерство и гинекология*. 2018; 6: 31–6. [Vishnyakova P.A., Sukhanova Yu.A., Mikaelyan A.G., Bulatova Yu.S. et al. Fetal growth restriction and markers for mitochondrial dysfunction. *Obstetrics and Gynecology*. 2018; 6: 31–6. (in Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2018.6.31-36
17. Скрипниченко Ю.П., Баранов И.И., Высоких М.Ю. Определение уровня митохондриальной ДНК в крови для прогнозирования осложнений беременности. *Акушерство и гинекология*. 2018; 2: 44–9. [Skripnichenko Yu.P., Baranov I.I., Vysokikh M.Yu. Determination of the blood level of mitochondrial DNA for the prediction of pregnancy complication. *Obstetrics and Gynecology*. 2018; 2: 44–9. (in Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2018.2.44-49
18. Desrochers L.M., Bordeleau F., Reinhart-King C.A., Cerione R.A. et al. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat. Commun.* 2016; 7: 11958. DOI: 10.1038/ncomms11958
19. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72(5): 440–57. DOI: 10.1111/aji.12311
20. Goswamia D., Tannetta D.S., Magee L.A., Fuchisawa A. et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2006; 27(1): 56–61. DOI: 10.1016/j.placenta.2004.11.007

Поступила / Received: 29.08.2022

Принята к публикации / Accepted: 26.09.2022

Об авторах / About the authors

Микаелян Асмик Гагиковна / Mikayelyan, A.G. — аспирант 2-го акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: mikaelyan_asmik@bk.ru

Марей Мария Владимировна / Marey, M.V. — научный сотрудник лаборатории митохондриальной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 2357-6937. E-mail: m_marey@oparina4.ru

Булатова Юлия Сергеевна / Bulatova, Yu.S. — врач акушер-гинеколог 2-го акушерского отделения патологии беременности ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: yu.bulatova@mail.ru

Тетруашвили Нана Картлосовна / Tetrushvili, N.K. — д. м. н., доцент, заместитель директора Института акушерства по научной работе, заведующая отделом медицины плода и 2-м акушерским отделением патологии беременности ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 3803-7764. <https://orcid.org/0000-0002-9201-2281>. E-mail: tetrauly@mail.ru

Высоких Михаил Юрьевич / Vysokikh, M.Yu. — к. б. н., доцент, заведующий лабораторией митохондриальной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 2742-0833. E-mail: mikhail.vyssokikh@gmail.com