



4843483

На правах рукописи

ДУРНОВА
Анна Олеговна

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ
КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

27 ЯНВ 2011

Санкт-Петербург – 2011

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии Учреждения Российской академии медицинских наук «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН» и в лаборатории нейроэндокринологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научные руководители:

доктор биологических наук
Полякова Виктория Олеговна

доктор медицинских наук
Коновалов Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Кветная Татьяна Викторовна

доктор биологических наук
Чернышева Марина Павловна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им И.И. Мечникова Росздрава»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2011 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу: 197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (197110, Россия, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В последнее время число женщин репродуктивного возраста с сахарным диабетом прогрессивно увеличивается, при этом весомую роль в увеличение вносит сахарный диабет второго типа. По данным Т. Cundy [Cundy T. et al., 2007], в настоящее время число беременных женщин с сахарным диабетом 2 типа превосходит число женщин с сахарным диабетом 1 типа. Несмотря на это течение беременности, осложнения и ее исходы изучены для группы женщин с сахарным диабетом 2 типа в меньшей степени.

Из данных литературы известно, что женщины с сахарным диабетом являются группой риска по развитию воспалительных заболеваний, в особенности репродуктивной системы, что может приводить к осложненному течению беременности. В развитие воспаления существенный вклад вносят иммунокомпетентные клетки, локализованные в плаценте. Однако присутствие этой группы клеток в плаценте женщин с сахарным диабетом остается недостаточно изученным. Неизвестно в какой мере сопутствующие заболевания матери, ее возраст и течение беременности влияют на выраженность воспалительного процесса. Кроме того, необходимо учитывать, что в последние годы увеличивается частота беременности у женщин старшего репродуктивного возраста, среди таких женщин также чаще встречается сахарный диабет, течение которого во время беременности имеет возрастные особенности, отягощающий процесс гестации. В связи с этим актуальным представляется изучить возрастные особенности экспрессии маркеров основных иммунокомпетентных клеток, участвующих в воспалении в плаценте у женщин с разными типами сахарного диабета, корреляции уровня их экспрессии с течением беременности и частоты выявления гистологических аномалий в плаценте, связанных с развитием воспалительного процесса.

Результаты многолетних исследований показали, что здоровье новорожденного ребенка в значительной степени определяется течением антенатального периода. Нарушение функций плаценты – одна из основных причин перинатальной заболеваемости и смертности [Савельева Г.М. и др., 1991]. Из плацентарных компонентов объектом нашего исследования был выбран ворсинчатый хорион, т.к. в силу особенностей строения он играет наиболее важную роль в осуществлении обменных процессов между кровью матери и плода. В настоящее время убедительно доказано, что наиболее активной тканью плаценты в метаболическом и функциональном плане, является эпителий ворсинчатого хориона.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является сравнительный анализ возрастных особенностей экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток плаценты человека при сахарном диабете.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Верифицировать клетки, активно участвующие в механизмах воспаления в плаценте, с использованием маркеров: макрофагов (CD68), натуральных киллеров (CD57) и В-лимфоцитов (CD20);
2. Выявить возрастные особенности экспрессии и оценить диагностическую значимость указанных маркеров при оценке состояния плаценты, как при нормально протекающей беременности, так и при патологических изменениях плаценты у женщин с сахарным диабетом;
3. Провести сравнительное изучение состояния фето-плацентарного комплекса у женщин с сахарным диабетом разных возрастных групп;
4. Оценить вклад различных факторов воспаления в патологическое течение беременности у женщин старшего репродуктивного возраста.

Научная новизна

Впервые выполнено детальное исследование субпопуляций резидентных иммунокомпетентных клеток (макрофаги, В-лимфоциты, NK-клетки)

в ворсинчатом хорионе зрелой плаценты у беременных различного возраста в норме и при сахарном диабете.

Установлено, что все три субпопуляции присутствуют в ворсинчатом хорионе. Впервые проведен сравнительный анализ иммунокомпетентных клеток в плаценте у рожениц разного возраста с эндокринно-метаболической патологией. Показано увеличение экспрессии маркера макрофагов в плаценте у первородящих здоровых женщин старше 28 лет, аналогичная тенденция установлена для маркера В-лимфоцитов. У беременных женщин с сахарным диабетом экспрессия маркеров воспаления зависела от типа сахарного диабета. Выявлены различия в экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток у перво- и повторнородящих женщин, например, экспрессия маркера В-лимфоцитов в группе с сахарным диабетом 2 типа увеличивалась с возрастом, а у повторнородящих женщин не выявлено возрастных изменений экспрессии. Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли медиаторов в формировании иммунного ответа в плаценте при воспалительных процессах, при этом вклад конкретных сигнальных молекул зависит от возраста беременных.

Практическая значимость

Результаты проведенного исследования позволяют расширить представление о возрастных морфо-функциональных изменениях доношенной плаценты в норме и при сахарном диабете. Полученные данные позволяют оптимизировать тактику ведения беременных разного возраста, страдающих сахарным диабетом, для снижения риска развития воспалительных процессов и связанной с этим патологии в плаценте, а также прогнозировать тяжесть и риск развития патологической беременности у женщин старшего репродуктивного возраста.

Положения, выносимые на защиту

1. Функциональная активность резидентных иммунокомпетентных клеток плаценты (макрофагов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров) коррелирует с возрастом беременных и типом сахарного диабета

2. В плаценте женщин старшего репродуктивного возраста отмечается снижение экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток при всех типах сахарного диабета.

3. Для старшего репродуктивного возраста характерно снижение экспрессии маркера макрофагов у повторнородящих женщин с сахарным диабетом 2 типа и маркера натуральных киллеров у первородящих женщин с сахарным диабетом 2 типа и у повторнородящих с сахарным диабетом 1 типа.

4. Частота развития воспаления, приводящего к последующей плацентарной недостаточности и внутриутробному инфицированию плода, достоверно выше у беременных старшего репродуктивного возраста.

5. Оценка экспрессии маркеров воспаления в плаценте у женщин старшего репродуктивного возраста является эпидемиологически значимой, позволяя оценить риск последующего развития патологии у новорожденных детей.

Связь с научно-исследовательской работой Института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3-х глав, выводов, указателя литературы и приложения. Текст диссертации изложен на 101 странице, содержит 7 таблиц, иллюстрирован 28 рисунками. Список литературы содержит 131 источник, из них отечественных – 48, зарубежных – 83.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных исследований, 1 глава в учебном руководстве, 11 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены на XII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009); Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, 2009); Научно-практической конференции «Исследования по приоритетным направлениям в медицине и биологии» (Санкт-Петербург, 2009); 18-ой Международной конференции «СПИД, рак и общественное здоровье» (Санкт-Петербург, 2009); Международной научно-практической конференции с международным участием «Осенняя геронтологическая конференция в Белгороде» (Белгород, 2009); VI-й международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2009), I-й ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2010» (Санкт-Петербург, 2010), 3-й международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения - 2010» (Белгород, 2010).

Полученные в работе результаты включены в главу книги «Введение в молекулярную диагностику», которая рекомендована УМО ММА им. И.М. Сеченова в качестве учебного пособия для студентов медицинских вузов и врачей.

Результаты исследований используются в научной, педагогической и практической деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН и НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом для морфо-функционального исследования был выбран ворсинчатый хорион 160 плацент (срок гестации 36-40 недель), полученных

в родильном отделении Научно-исследовательского института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН у первородящих и повторнородящих женщин различного возраста (от 18 до 39 лет). В качестве основных признаков распределения материала по группам служили три показателя: возраст, наличие сахарного диабета и количество предшествующих родов (табл. 1). Нами было сформировано три группы с сахарным диабетом: 1-я – роженицы с сахарным диабетом 1 типа, 2-я – с сахарным диабетом 2 типа и 3-я – с сахарным диабетом беременных. Внутри каждая группа была разделена на женщин, у которых изучаемые роды были первыми или повторными, соответственно плаценты от первородящих или повторнородящих женщин. По возрасту группы были разделены на рожениц младше 28 лет (что является физиологической нормой для родов) и женщин старше 28 лет. В качестве контрольной группы были отобраны женщины, не имеющие сахарного диабета с доношенной беременностью. В плаценте объектом для исследования были выбраны стволовые, промежуточные и терминальные ворсины.

Таблица 1

Распределение материала по группам

Название группы		Кол-во плацент
Контрольная группа	Первородящие ≤ 28 лет	10
	Первородящие > 28 лет	10
	Повторнородящие ≤ 28 лет	10
	Повторнородящие > 28 лет	10
Сахарный диабет 1 типа	Первородящие ≤ 28 лет	10
	Первородящие > 28 лет	10
	Повторнородящие ≤ 28 лет	10
	Повторнородящие > 28 лет	10
Сахарный диабет 2 типа	Первородящие ≤ 28 лет	10
	Первородящие > 28 лет	10
	Повторнородящие ≤ 28 лет	10
	Повторнородящие > 28 лет	10
Сахарный диабет беременных	Первородящие ≤ 28 лет	10
	Первородящие > 28 лет	10
	Повторнородящие ≤ 28 лет	10
	Повторнородящие > 28 лет	10

Гистологические методы

Образцы плацент объемом 1 см³ обезживали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина (pH 7.2), проводили при помощи гистологического процессора Leica TP1020, заливали в парафин и готовили микротомные срезы 5 мкм. В качестве обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин.

Иммуногистохимические методы

Парафиновые срезы помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Для иммуногистохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к маркерам натуральных киллеров – CD57 (1:50, Novocastra), В-лимфоцитов – CD20 (1:100, Dako) и макрофагов – CD68 (1:50, Novocastra). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные анти-мышинные и анти-кроличьи иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты Novocastra). Методику визуализации экспрессии всех антител проводили по стандартному протоколу.

Количественная оценка результатов исследования

Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения Vidiotest Morphology 5.0». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 400х.

Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади

клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза или накопления исследуемых сигнальных молекул.

Методы статистической обработки

Статистическая обработка всех экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Верификация экспрессии маркера макрофагов - CD68 в плаценте у женщин с сахарным диабетом разных возрастных групп

При светооптическом исследовании выявлено, что в группе первородящих женщин старшего репродуктивного возраста с СД 1 типа, область иммуноокрашивания была больше, по сравнению с контрольной группой.

При морфометрическом анализе микроскопических изображений ворсин хориона были выявлены следующие достоверные различия экспрессии маркера макрофагов в зависимости от возраста. В контрольной группе у первородящих женщин старше 28 лет наблюдалось достоверное

увеличение экспрессии маркера макрофагов в плаценте, по сравнению с молодыми роженицами в 1,5 раза по показателю относительной площади экспрессии. Аналогичная тенденция наблюдалась в группе женщин с СД 1 типа, где среднее значение у женщин младше 28 лет составило $1,55 \pm 0,40\%$, а старше 28 лет $2,53 \pm 0,39\%$. В группах женщин с СД 2 типа и с СДБ не наблюдалось статистически достоверных отличий в экспрессии CD68 между роженицами старше 28 лет двумя возрастными группами (рис.1).

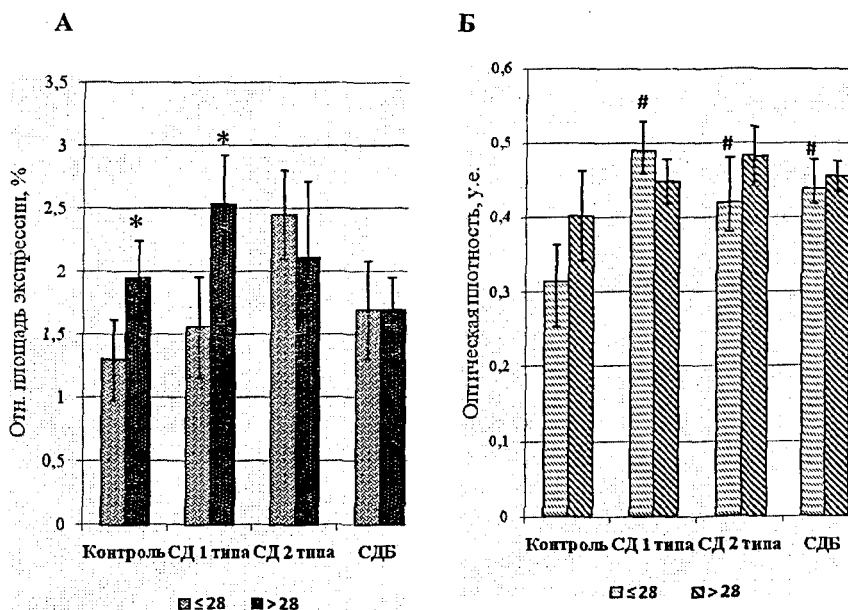


Рис. 1. Экспрессия протеина CD68 в плаценте первородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - относительная площадь экспрессии протеина CD68; * - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$);

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; # - статистически достоверное отличие показателя в группе с сахарным диабетом от показателя в контрольной группе ($p < 0,05$).

При анализе показателя оптической плотности экспрессии протеина CD68 в плаценте у первородящих женщин, статистически достоверных различий между женщинами младшего и женщинами старшего

репродуктивного возраста не выявлено. При этом нами установлено, что во всех плацентах от женщин с сахарным диабетом младше 28 лет, значения оптической плотности маркера макрофагов были статистически достоверно выше, чем в контрольной группе ($0,489 \pm 0,04$; $0,42 \pm 0,06$; $0,438 \pm 0,04$ и $0,314 \pm 0,05$ у.е., соответственно) (рис. 1).

Показатель оптической плотности, повышенный у женщин с сахарным диабетом младше 28 лет по сравнению с контрольной группой, свидетельствует о более активном участии макрофагов в процессах, происходящих в плаценте у женщин с метаболическими нарушениями.

Усиление экспрессии маркера макрофагов у женщин старше 28 лет в контрольной группе, а также в группе с СД 1 типа, по нашему мнению, может быть связано с функциями, выполняемыми ими в плаценте. С возрастом частота воспалительных заболеваний возрастает, также показано, что макрофаги (Мф) на поздних сроках беременности сохраняют свою активность и способны связывать и инактивировать бактериальные и дрожжевые клетки. Поэтому закономерным является увеличение присутствующих в плаценте Мф в старшей возрастной группе.

У женщин с сахарным диабетом 1 типа данный показатель еще выше, так как в этой группе женщин по результатам анализа истории болезни носительство уреоплазмы, повторяющийся кандидоз и бактериальный вагиноз были выявлены у 80% рожениц. Вероятным является выполнение макрофагами в плаценте защитной функции.

В группе с сахарным диабетом 2 типа наметилась тенденция к снижению относительной площади экспрессии маркера CD68 с возрастом. Показано, что гипергликемия снижает функции иммунных клеток (например, клетки слабее отзываются на действие митогенов, то есть имеют сниженную способность к пролиферации) и повышает интенсивность воспалительных реакций.

У первородящих женщин старшего возраста с сахарным диабетом беременных не происходит увеличения экспрессии протеина CD68, как

наблюдается в норме, что, по-видимому, связано с супрессорным действием гипергликемии на иммунную систему.

Факт отсутствия в старшей возрастной группе аналогичного увеличения оптической плотности экспрессии маркера макрофагов может подтверждать теорию угнетения иммунитета у женщин с сахарным диабетом старшего репродуктивного возраста

Сравнение средних значений относительной площади окрашивания у повторнородящих женщин выявило следующие различия: в группе женщин старше 28 лет с сахарным диабетом 1 типа экспрессия маркера макрофагов в ворсинах хориона была достоверно выше ($3,20 \pm 0,40\%$) по сравнению с экспрессией его в плацентах женщин младшей возрастной группы ($2,42 \pm 0,29\%$).

В группе же с сахарным диабетом 2 типа, наоборот, у беременных старшего возраста экспрессия маркера макрофагов достоверно снижалась ($2,97 \pm 0,36$ и $1,62 \pm 0,35\%$, соответственно). Достоверных различий по показателю относительной площади экспрессии протеина CD68 в контрольной группе и группе с сахарным диабетом беременных нами не зарегистрировано (рис. 2).

Анализ оптической плотности иммуноокрашенных клеток выявил повышенную экспрессию CD68 в ворсинчатом хорионе у повторнородящих женщин младше 28 лет в группе с сахарным диабетом 1 типа, со значением $0,510 \pm 0,05$ у.е. и во всех трех группах с сахарным диабетом старшего возраста ($0,455 \pm 0,04$, $0,452 \pm 0,05$, $0,451 \pm 0,02$ у.е.) по сравнению с контрольной группой ($0,355 \pm 0,03$ у.е.) (рис. 2).

Усиление экспрессии маркера макрофагов у повторнородящих женщин в группе с сахарным диабетом 1 типа может быть обусловлено, как общей реакцией организма на хроническое воспаление, так и наличием гестоза именно в этой группе женщин, где средняя и тяжелая степень гестоза наблюдалась в самом большом числе случаев.

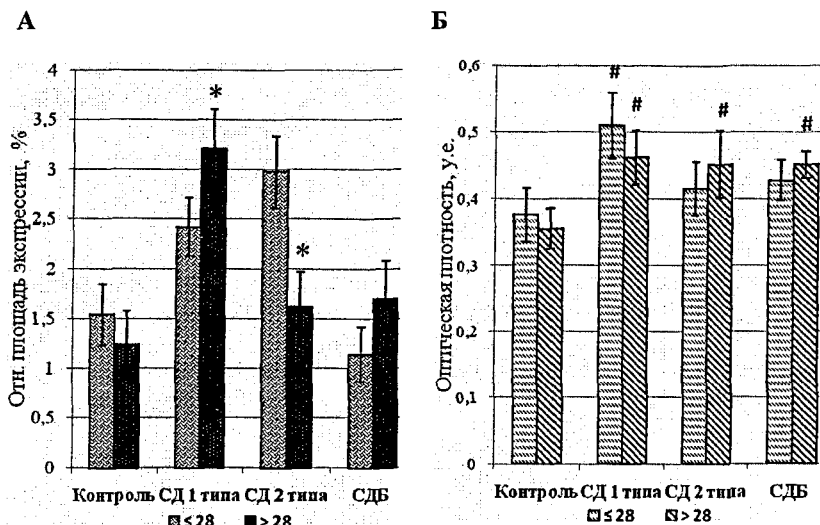


Рис. 2. Экспрессия протеина CD68 в плаценте повторнородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - Относительная площадь экспрессии протеина CD68; - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$);

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; # - статистически достоверное отличие показателя в группе с сахарным диабетом от показателя в контрольной группе ($p \leq 0,05$).

Наметившаяся тенденция к снижению в группе беременных старшего возраста экспрессии маркера макрофагов у первородящих женщин с сахарным диабетом 2 типа, у повторнородящих беременных той же группы становится статистически достоверной.

Увеличение оптической плотности у повторнородящих женщин старше 28 лет может объясняться лучшим состоянием здоровья, так как даже первая беременность при сахарном диабете 1 типа является риском, как для матери, так и для плода. Высокая активность макрофагов способствует сохранению беременности, они выполняют важную роль в защите от патогенных организмов, а также в борьбе с патологическими процессами в плаценте на поздних сроках.

Верификация экспрессии маркера В-лимфоцитов в плаценте у женщин разных возрастных групп

Маркером В-лимфоцитов является протеин CD20, который участвует в их активации и пролиферации. Визуально экспрессия этого протеина в ворсинах хориона различалась в исследуемых группах. Отмечены различия между экспрессией маркеров В-лимфоцитов в плацентах рожениц разных групп, например, в контрольной группе выявлены лишь единичные клетки, тогда как в группе с сахарным диабетом 1 типа, в поле зрения отмечается 10-15 клеток.

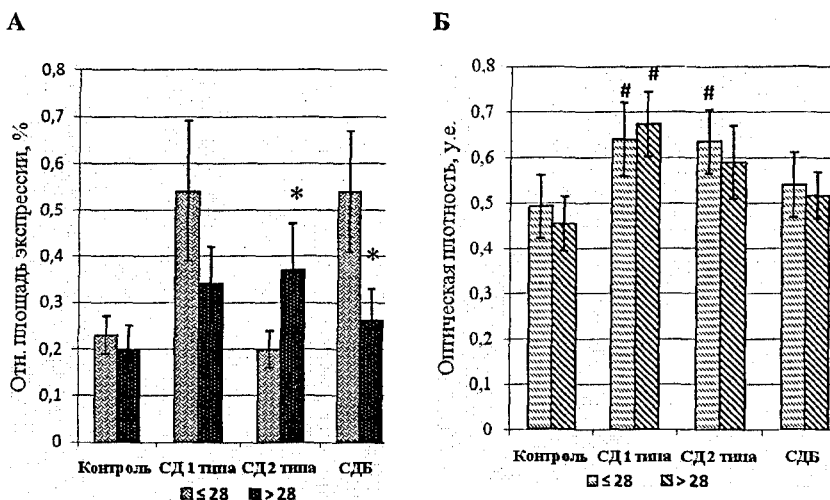


Рис. 3. Экспрессия протеина CD20 в плаценте первородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - Относительная площадь экспрессии протеина CD68; * - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$);

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; # - статистически достоверное отличие показателя в группе с сахарным диабетом от показателя в контрольной группе ($p < 0,05$).

Морфометрический анализ микроскопических изображений позволил сравнить уровень экспрессии CD20 у женщин разных групп. Установлено,

что в плаценте у первородящих женщин младшего возраста (18-28 лет) с сахарным диабетом 2 типа число В-лимфоцитов в 2 раза меньше, по сравнению с первородящими старшего возраста (29-40 лет) ($0,37 \pm 0,10\%$ по сравнению с $0,20 \pm 0,04\%$) ($p < 0,05$). В группе с сахарным диабетом беременных наблюдалась противоположная тенденция установлено увеличение количества В-лимфоцитов в младшей возрастной группе по сравнению со старшей ($0,54 \pm 0,13$ и $0,26 \pm 0,07\%$, соответственно) ($p < 0,05$).

Возрастных изменений экспрессии протеина CD20 по показателю относительной площади экспрессии в группе с сахарным диабетом 1 типа и контрольной группе нами не зарегистрировано (рис. 3).

Подсчет оптической плотности иммуноокрашенных клеток выявил повышенную экспрессию CD20 в ворсинчатом хорионе у первородящих женщин младше 28 лет в группе с сахарным диабетом 1 и 2 типов, а также в группе женщин старше 28 лет с сахарным диабетом 1 типа, по сравнению с контрольной группой.

Большее число В-лимфоцитов в плаценте женщин с сахарным диабетом может быть связано с выполняемой ими функцией по инактивации патогенных микроорганизмов. Известно, что у женщин с сахарным диабетом частота урогенитальных заболеваний намного выше, чем у здоровых женщин, это объясняется благоприятной средой для развития дрожжеподобных грибов и бактерий (обилие глюкозы), а также ослаблением местного иммунитета.

Увеличение с возрастом экспрессии CD20 в группе женщин с сахарным диабетом 2 типа может быть связано с высокой частотой преждевременного излития околоплодных вод у этой группы женщин - время безводного периода составляло от 2 часов 55 мин до 11 часов.

Снижение экспрессии маркера В-лимфоцитов с возрастом в группе женщин с сахарным диабетом беременных может быть обусловлено тем, что гипергликемия приводит к недостаточной активации иммунных клеток, в частности В-лимфоцитов, что сопровождается нарушениями иммунного

ответа, что, в свою очередь, может способствовать повышенной инфицированности у пациенток с сахарным диабетом беременных.

Повышенная оптическая плотность экспрессии маркера CD20 в группе женщин с сахарным диабетом 1 и 2 типов, по сравнению с нормальными значениями контрольной группы, возможно, отражает необходимость большего числа рецепторов для активации, так как увеличение содержания сахара в крови подавляет функцию иммунной системы.

При светооптическом исследовании экспрессии маркера В-лимфоцитов в ткани плаценты повторнородящих женщин нами были установлены различия с его экспрессией в контрольной группе, где были отмечены единичные клетки, и группами с сахарным диабетом.

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных структур по маркеру CD20 позволил сделать вывод о различии экспрессии маркера В-лимфоцитов между повторнородящими женщинами младшего и старшего репродуктивного возраста.

В контрольной группе повторнородящих женщин в плацентах от женщин старше 28 лет площадь экспрессии протеина CD20 была больше ($0,22 \pm 0,04\%$), по сравнению с этим показателем в плацентах младшей возрастной группы ($0,13 \pm 0,03\%$). Тогда как в группах с сахарным диабетом не было изменения экспрессии маркера В-лимфоцитов с возрастом (рис. 4).

Если у первородящих женщин только в нескольких группах с сахарным диабетом оптическая плотность была выше, по сравнению с значениями контрольной группы, то у повторнородящих женщин всех групп с сахарным диабетом он был выше (рис. 4). Это свидетельствует о большей активности В-лимфоцитов у повторнородящих женщин с сахарным диабетом.

В норме у повторнородящих женщин старшего возраста происходит увеличение числа В-лимфоцитов, а у женщин с сахарным диабетом возраст не влияет на экспрессию маркера В-лимфоцитов, он остается повышенным и в старшей и в младшей возрастной группе по сравнению с контролем.

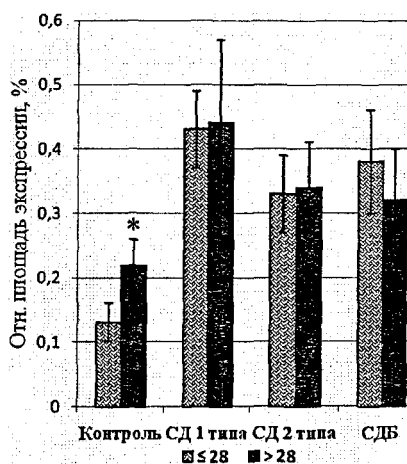
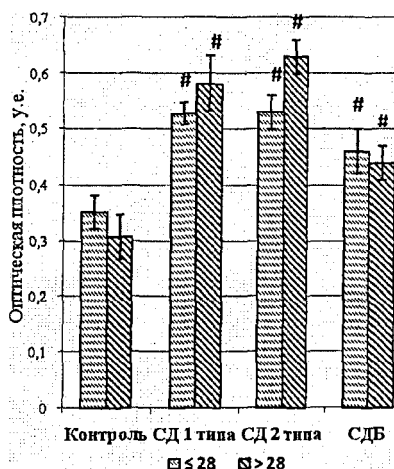
А**Б**

Рис. 4. Экспрессия протеина CD20 в плаценте повторнородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - Относительная площадь экспрессии протеина CD20; * - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$);

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; # - статистически достоверное отличие показателя в группе с сахарным диабетом от показателя в контрольной группе ($p \leq 0,05$).

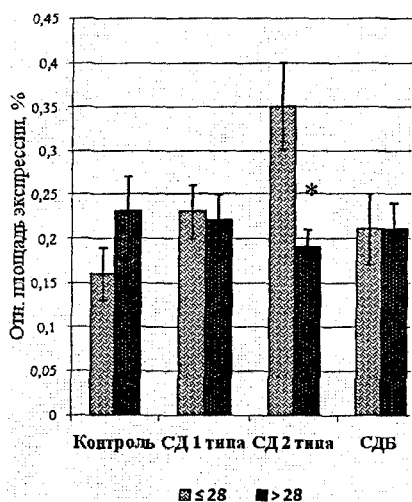
Повышенная экспрессия протеина CD20 на поверхности В-лимфоцитов у повторнородящих женщин с сахарным диабетом свидетельствует о большей активности данных клеток в плаценте по сравнению с контрольной группой.

Верификация экспрессии маркера NK-клеток в плаценте у женщин разных возрастных групп

Визуально экспрессия маркера NK-клеток в ворсинах хориона практически не различалась в исследуемых группах.

Подсчет суммарной площади иммуноокрашенных клеток по экспрессии маркера CD57 позволил выявить различия показателей в разных возрастных группах. Нами было проведено сравнение средних значений суммарной площади протеина CD57 и показано, что у первородящих женщин с сахарным диабетом 2 типа, экспрессия маркера NK-клеток с возрастом снижается ($0,19 \pm 0,02\%$ по сравнению с $0,49 \pm 0,05\%$). В других исследуемых группах не было выявлено достоверных различий в экспрессии протеина CD57 в разных возрастных группах (рис. 5). Оптическая плотность экспрессии протеина CD57 была статистически достоверно выше в группе с сахарным диабетом 1 типа младше 28 лет ($0,391 \pm 0,05$ у.е.), по сравнению с контрольной группой ($0,292 \pm 0,03$ у.е.) (рис. 5).

А



Б

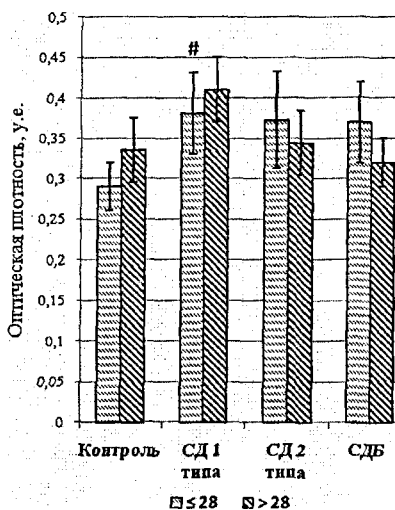


Рис. 5. Экспрессия протеина CD57 в плаценте первородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - Относительная площадь экспрессии протеина CD57; * * - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$);

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур; # - статистически достоверное отличие показателя в группе с сахарным диабетом от показателя в контрольной группе ($p < 0,05$).

По-видимому, повышенная экспрессия рецептора CD57 на НК-клетках отражает компенсаторную реакцию организма молодых женщин на гипергликемическое состояние, которое снижает активацию и препятствует нормальному состоянию иммунокомпетентных клеток. Повышенная экспрессия маркера НК-клеток у женщин младшего возраста с сахарным диабетом 2 типа, может объясняться активным участием натуральных киллеров в процессе ангиогенеза.

Известно, что при сахарном диабете 2 типа, сильно выражена дегенерация капиллярного русла и, возможно, НК-клетки активно участвуют в компенсаторных механизмах по восстановлению нормального кровоснабжения. У беременных старшего возраста, в связи с ослаблением иммунной функции, они привлекаются не так активно и хуже функционируют, что подтверждается большим числом острых нарушений кровообращения в этой группе женщин.

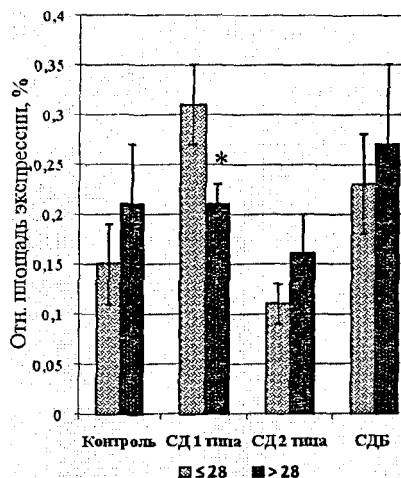
В группе повторнородящих женщин при светооптическом исследовании также визуально было сложно увидеть различия в экспрессии маркера НК-клеток в двух возрастных группах.

Однако при морфометрическом анализе ворсинчатого хориона повторнородящих женщин показано снижение экспрессии протеина CD57 в плаценте женщин старше 28 лет в группе с СД 1 типа по сравнению с более молодыми женщинами ($0,21 \pm 0,02\%$ и $0,31 \pm 0,04\%$ соответственно, $p < 0,05$). В других исследованных группах значения средних показателей относительной площади экспрессии не отличались в плацентах женщин разных возрастных групп (рис. 6).

По показателю оптической плотности экспрессии протеина CD57 не было зафиксировано ни возрастных, ни ассоциированных с сахарным диабетом, статистически достоверных изменений между разными группами (рис. 6).

Сниженная экспрессия маркера НК-клеток в группе повторнородящих женщин с СД 1 типа может свидетельствовать об угнетении иммунной функции у данной группы женщин.

А



Б

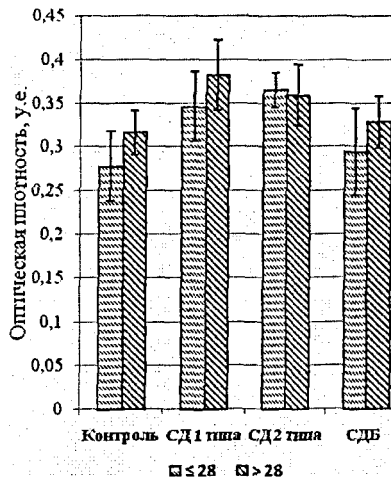


Рис. 6. Экспрессия протеина CD57 в плаценте повторнородящих женщин с разными типами сахарного диабета.

А - Относительная площадь экспрессии протеина CD57; * - статистически достоверное отличие показателя в группе младшего репродуктивного возраста (≤ 28 лет) от показателя в группе старшего репродуктивного возраста (> 28 лет) ($p < 0,05$).

Б - оптическая плотность иммуноокрашенных структур.

При исследовании женщин с сахарным диабетом установлено, что чем старше возраст женщины, тем выше степень повреждения плаценты. Это подтверждается следующими данными о морфо-функциональном состоянии плаценты:

- плацентарная недостаточность в виде субкомпенсированной формы встречалась в 80% у первородящих женщин старшей возрастной группы с СД 1 типа, тогда как в младшей группе она равнялась 20%, а в контрольной группе отсутствовала;

- строение плаценты не соответствовало сроку беременности в 80% случаев у первородящих женщин СД 1 типа и у повторнородящих женщин с СД 2 типа старшей возрастной группы, тогда как в младших возрастных группах строение плаценты соответствовало сроку беременности;
- степень инволютивно-дистрофических процессов в плаценте была повышена в группе рожениц старшего возраста с СД 1 и 2 типов, как у перво- так и у повторнородящих женщин;
- низкая степень компенсаторно-приспособительных реакций в наибольшем количестве случаев отмечалась в группе первородящих с СДБ старшего возраста;
- инфаркты плаценты наиболее часто встречались в группе повторнородящих женщин с СД 2 типа старшего возраста (в 50% случаев).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили выявить достоверные корреляции между экспрессией маркеров воспаления резидентными иммунокомпетентными клетками плаценты и патологическими состояниями, возникающими во время беременности у женщин разного репродуктивного возраста. При этом следует отметить, что именно сигнальные молекулы, продуцируемые иммунными клетками, играют ключевую роль в развитии этих состояний.

Это подтверждается полученными статистически достоверными данными о связи уровня экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток с сопутствующими заболеваниями и осложнениями беременности. У рожениц разного возраста повышенный уровень экспрессии маркеров иммунных клеток свидетельствует о присутствии воспалительного процесса, с чем может быть связано самопроизвольное прерывание беременности, преждевременные роды, преэклампсия, а также осложнения у новорожденных. В этой связи важным является проведение мероприятий направленных на санацию очагов хронического воспаления и лечения

урогенитальной инфекции, предупреждение прогрессии гестоза до тяжелой стадии, планирование беременности с целью снижения влияния осложнений сахарного диабета на беременность.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эпидемиологической значимости маркеров воспаления для оценки течения беременности и возможного развития соматической патологии у новорожденных детей, особенно у рожениц старшего возраста, открывая, таким образом, широкие перспективы для дальнейшего детального изучения эпидемиологической значимости сигнальных молекул в патологии социально значимых заболеваний человека, учитывая особенности онтогенеза и старения организма.

ВЫВОДЫ

1. В плаценте человека впервые верифицирована экспрессия маркеров макрофагов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров, что позволяет оценить резидентный характер их присутствия в ворсинчатом хорионе. Установлена неодинаковая динамика возрастных особенностей функциональной активности резидентных иммунокомпетентных клеток, как при нормально протекающей беременности, так и у женщин, страдающих сахарным диабетом.

2. Экспрессия маркера макрофагов у женщин с СД 1 типа в старшем репродуктивном возрасте достоверно выше, как в группе перво- так и повторнородящих женщин, по сравнению с женщинами младшего репродуктивного возраста. С возрастом, у повторнородящих женщин с СД 2 типа происходит достоверное снижение экспрессии маркера макрофагов.

3. В старшем репродуктивном возрасте наблюдается усиление экспрессии маркеров В-лимфоцитов в группе первородящих женщин с СД 2 типа, тогда как в группе с сахарным диабетом беременных наблюдается противоположная тенденция. У повторнородящих женщин возрастные

различия экспрессии маркера В-лимфоцитов при сахарном диабете отсутствуют.

4. С увеличением возраста у первородящих женщин с СД 2 типа и у повторнородящих женщин с СД 1 типа популяция натуральных киллеров в ткани плаценты уменьшается.

5. У женщин старшего репродуктивного возраста с сахарным диабетом хроническая плацентарная недостаточность развивается чаще и осложняется острыми дисциркуляторными расстройствами в плаценте с последующим внутриутробным инфицированием плода.

6. Определение экспрессии маркеров воспаления позволяет прогнозировать течение беременности у женщин старшего репродуктивного возраста, страдающих сахарным диабетом, и развитие в последующем различной патологии у новорожденных детей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При исследовании плацент после родов у женщин старшего репродуктивного возраста, страдающих сахарным диабетом, рекомендуется проводить оценку экспрессии маркеров воспаления макрофагов, В-лимфоцитов и NK-клеток для оценки риска постнатальной патологии у новорожденных детей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Дурнова А.О. Возрастные особенности иммунокомпетентных клеток плаценты человека при сахарном диабете/А.О. Дурнова, В.О. Полякова, Н.А. Пальченко//Успехи геронтологии. – 2010. – Т.23. – №2. – С. 208-212.
2. Роль иммунокомпетентных клеток в плаценте в норме и при патологии/Э.К. Айламазян, И.М. Кветной, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, А.О. Дурнова//Журнал акушерства и женских болезней – 2010. – №6. С. 12-16.
3. Экспрессия сигнальных молекул – регуляторов апоптоза в плаценте у женщин разного возраста/Е.А. Лапина, Н.С. Линькова, А.О. Дурнова, В.О. Полякова, Н.А. Пальченко, А.В. Костылев, С.С. Коновалов, И.М. Кветной //Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. Геронтология и гериатрия – 2010. – № 22. – С. 45-48.

Глава в руководстве

4. Иммуногистохимические маркеры в оценке функционального состояния плаценты в кн. «Введение в молекулярную диагностику»/В.О. Полякова, Н.С. Линькова, А.В. Костылев, И.М. Кветной, С.С. Коновалов, А.О. Дурнова, Р.И. Абдулрагимов. М., Медицина, 2010. – С. 318-343.

Тезисы докладов

5. Абдулрагимов Р.И. Нейроиммунноэндокринные механизмы старения/Р.И. Абдулрагимов, Н.Н. Севастьянова, А.О. Дурнова//13-я Всероссийская медико-биологическая конференция «Фундаментальная и клиническая медицина». – СПб. – 2010. – С. 4-5.
6. Возрастные изменения экспрессии макрофагов, В-лимфоцитов, и натуральных киллеров в плаценте женщин с сахарным диабетом/А.О. Дурнова, В.О. Полякова, М.А. Клецев, Н.А. Пальченко//Матер. 3-ей международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения - 2010». – Белгород. – 2010. – С. 22-23.
7. Дурнова А.О. Значение провоспалительного маркера макрофагов CD68 в плаценте у женщин с сахарным диабетом/А.О.Дурнова//Русский журнал «СПИД, рак и общественное здоровье» – 2009. – № 2 (27). – С. 17.
8. Дурнова А.О. Иммунокомпетентные клетки в плаценте женщин разных возрастных групп с сахарным диабетом/А.О.Дурнова//Осенняя геронтологическая конференция в Белгороде. – Белгород – 2009. – С. 7-8.
9. Дурнова А.О. Присутствие иммунокомпетентных клеток в плаценте женщин с сахарным диабетом при воспалении/А.О.Дурнова//Исследования по приоритетным направлениям в медицине и биологии – СПб – 2009. –С. 160-162.
10. Дурнова А.О. Экспрессия макрофагов в плаценте у женщин с сахарным диабетом разных возрастных групп/А.О.Дурнова//Осенняя геронтологическая конференция в Белгороде. – Белгород – 2009. – С. 6-7.
11. Дурнова А.О. Экспрессия маркера CD20 в плаценте у женщин с сахарным диабетом разных возрастных групп/А.О.Дурнова//XII Всероссийская медико-

биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 117-118.

12. Дурнова А.О. Экспрессия протеина CD68 в плаценте у женщин с сахарным диабетом разных возрастных групп/А.О.Дурнова//XII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 118-119.

13. Дурнова А.О., Полякова В.О. Верификация иммунокомпетентных клеток в плаценте женщин с нормально протекавшей беременностью и отягощенной сахарным диабетом/А.О.Дурнова, В.О. Полякова//VI-я Международная конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность». – Москва. – 2009. – С. 84-86.

14. Дурнова А.О., Полякова В.О. Паттерн экспрессии макрофагов у первородящих женщин старшего возраста с сахарным диабетом/А.О. Дурнова, В.О. Полякова//I ежегодная научная конференция молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2010». – СПб – 2010. – С. 10-11.

15. CD 8 как маркер угрозы выкидыша у женщин разных возрастных групп на фоне гестоза/Н.С. Линькова, А.В. Костылев, И.Н.Костючек, А.О. Дурнова, Н.А. Пальченко, В.О. Полякова//Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины. – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 191-192.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИМК	Иммунокомпетентные клетки
Мф	Макрофаги
СД	Сахарный диабет
СДБ	Сахарный диабет беременных
НК-клетки	Натуральные киллерные клетки

Дурнова Анна Олеговна ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
САХАРНОМ ДИАБЕТЕ//Авторыф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30–СПб., 2011.–26с.

Подписано в печать ..2010. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 120.

Отпечатано с готового оригинал-макета. ЗАО "Принт - Экспресс" 197376,
С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А