РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«НИИ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА» РАМН

На правах рукописи

РАССТРИГИНА ИРИНА МИХАЙЛОВНА

МОРФОГЕНЕЗ ЦИТОТРОФОБЛАСТИЧЕСКОЙ ИНВАЗИИ В ТЕЧЕНИЕ НЕОСЛОЖНЕННОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ.

14.03.02 – ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доктор медицинских наук,

профессор, Милованов А. П.

Москва 2015

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИЦТ – интерстициальный цитотрофобласт

МВП – межворсинчатое пространство

МГК – многоядерные гигантские клетки

ММР – металлопротеиназа

МПО – маточноплацентарная область

РА – радиальные артерии

СА – спиральные артерии

ЦТ – цитотрофобласт

ЦТИ – цитотрофобластическая инвазия

ЭВТ – эндоваскулярный цитотрофобласт

ЯВ - якорная ворсина

$TIMP_s$ – ингибиторы металлопротеиназ

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – рецепторы к фактору роста эндотелия сосудов

EGF – эпидермальный фактор роста

FGF - фактор роста фибробластов

TNF – фактор некроза опухоли

TGFα – трансформирующий фактор роста α

PIGF - плацентарный фактор роста

IL-6 – интерлейкин-6

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….6-9

НАУЧНАЯ НОВИЗНА……..10

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ….....11

1. **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**
   Морфогенез цитотрофобластической инвазии в норме и у женщин, страдающих преэклампсией.
   - **1.1. История изучения цитотрофобластической инвазии…….12-14**
   - **1.2. Различные способы изучения цитотрофобластической инвазии……14-15**
   - **1.3. Дифференцировка цитотрофобласта на основные типы и динамика инвазии…….15-18**
     - **1.3.1. Интерстициальный инвазивный цитотрофобласт…....16-17**
     - **1.3.2. Эндоваскулярный инвазивный цитотрофобласт……17**
     - **1.3.3. Многоядерные гигантские клетки……17-18**
   - **1.4. Источники цитотрофобластической инвазии……..19-22**
   - **1.5. Факторы, влияющие на цитотрофобластическую инвазию**
     - **1.5.1.Ауто- и паракринные влияния……..22-23**
     - **1.5.2. Оксигенация…….……23-24**
     - **1.5.3. Роль металлопротеиназного каскада в процессе физиологической и осложненной беременности**
       - **1.5.3.1. Типы металлопротеиназ……...……...24-26**
       - **1.5.3.2. Регуляция экспрессии ММР-2 и 9…….....26**
       - **1.5.3.3. Клетки-продуценты ММР и их локализация в процессе беременности……...27-28**
       - **1.5.3.4.TIMP…….....28-29**
   - **1.6. Влияние различной патологии на процесс инвазии…….....30-31**
   - **1.7. ЦТИ при преэклампсии……..…….31-35**
   - **1.8. Заключение……..…35-36**
2. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ…….……...37-42**

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ…….

3.1. Особенности цитотрофобластической инвазии и металлопротеиназной активности её элементов в течение I триместра беременности.

3.1.1. Идентификация маточноплацентарной области и источники инвазии в I триместре……...…43-46

3.1.2. Количество и размеры инвазивных элементов в стандартной площади среза в 7-8 недель п.о…….……...47-52

3.1.3. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в сроке гестации 7-8 недель п.о……...…52-55

3.1.4. Перестройка эндо- и миометриальных сегментов маточно-плацентарных артерий на сроке гестации 9-12 недель п.о……...55-58

3.1.5. Иммуноэкспрессияметаллопротеиназ 2 и 9 типов в инвазирующих клетках на 9-12нед. п.о……..58-61

3.2. Особенности цитотрофобластической инвазии и металлопротеиназной активности её элементов в течение II триместра беременности.

3.2.1. Источники ЦТИ во II триместре беременности…….…...62-70

3.2.2. Особенности распределения и изменения величины инвазирующих клеток в маточноплацентарной области удалённых маток на сроке 18-25 недель ……..…….70-73

3.2.3.Иммуноэкспрессия ММР-2 и ММР-9 во II триместре ……..74-79

3.3. Особенности цитотрофобластической инвазии и металлопротеиназной активности её элементов в течение III триместра беременности.

3.3.1. Ворсины характерные для III триместра……...…….80-81

3.3.2. Гистометрия инвазирующих клеток в маточноплацентарной области удаленных маток и биоптатах плацентарного ложа на сроке 31-40 недель ……..……...….82-85

3.3.3. Иммуноэкспрессия ММР-2 и ММР-9 в III триместре …….85-88

3.4. Редукция цитотрофобластической инвазии у женщин с преэклампсией.

3.4.1.Особенности распределения и изменения величины инвазирующих клеток в маточноплацентарной области женщин, страдающих преэклампсией……89-95

3.4.2. Оценка интенсивности имуноэкспрессии ММР-2 и ММР-9 в цитотрофобластических элементах при преэклампсии ……..96-100

ОБСУЖДЕНИЕ……..101-117

ВЫВОДЫ……118-119

БИБЛИОГРАФИЯ……120-140

ВВЕДЕНИЕ

Плацента – важнейший орган, играющий значительную роль во внутриутробном развитии человека и во многом предопределяющий его дальнейшую судьбу. Вместе с тем, многие важные детали функциональной активности плаценты, особенности её строения и влияния на организм матери и плода до сих пор не ясны. Ключевой механизм плацентации – цитотрофобластическая инвазия (ЦТИ) в стенку матки человека - изучен недостаточно.

ЦТИ представляет собой процесс миграции клеток цитотрофобласта из плаценты в эндометрий и миометрий, где они выборочно внедряются в артерии матки и модифицируют их в расширенные сосудистые каналы, приносящие возрастающий объем материнской крови к плаценте. Благодаря этому устанавливается маточно-плацентарное кровообращение, от которого зависят рост эмбриона и плода, то есть успешное завершение беременности или ее потеря на разных этапах развития **[7].**

Большинство исследований в этой области ведутся в основном на материале ранних стадий беременности, несмотря на то,что во II – III триместре инвазия продолжается **[7,8].** Дальнейшая перестройка радиальных артерий матки обеспечивает необходимый прирост объема материнской крови в межворсинчатое пространство плаценты и адекватный рост плода до его рождения.

В последние годы появились публикации **[6,8,104,119],** свидетельствующие о решающей роли ЦТИ в маточно-плацентарной области (МПО) для развития эмбриона, плода и физиологического течения беременности. ЦТИ условно подразделяется на три волны: начальная (в период имплантации), первая (5-8 нед. п.о.), вторая (16-18 нед) и далее до 29-30 нед. постменструального срока (п.м). Волна ЦТИ, происходящая в I триместре изучена достаточно подробно, с учетом её молекулярных механизмов регуляции и клеточных источников ворсинчатого трофобласта из оснований ворсин, непосредственно примыкающих к эндометрию (якорные

ворсины - ЯВ). В 1992 году группа авторов **[50]** предложила разделить для удобства изучения мигрирующий ЦТ на четыре зоны: 1) собственно ворсинчатый ЦТ, 2) проксимальный слой плотно расположенного ЦТ с многочисленными митозами; 3) дистальный – расходящиеся клетки ЦТ в пределах эндометрия; 4) инвазирующий ЦТ вглубь эндометрия. Данная рубрикация ЦТИ широко используется в дальнейших исследованиях **[77].**

Наряду с этим, многие детали второй волны ЦТИ, проникающей в нижнюю треть миометрия и приводящей к прогрессирующему расширению радиальных артерий матки, остаются неясными. В последние годы **[5,7]** установлено, что ЦТИ продолжается после 18 недели гестации (п.м.), наблюдается пик её активности в конце II триместра, который длится до 27-28 нед. в центральной зоне МПО с дальнейшим распространением инвазирующего ЦТ в периферические её отделы. Однако, морфологических исследований ЦТИ во II триместре физиологической беременности очень мало, что связано с трудностью сбора необходимого материала **[135].** Отдельные авторы **[138]** использовали с этой целью базальную пластину родившейся плаценты с морфометрией эндометриальных сегментов маточно-плацентарных артерий. Но подобный материал не подходит для изучения ЦТИ в пределах миометрия. Возникают закономерные вопросы, из каких источников формируются значительное количество ИЦТ во II триместре беременности и за счет каких механизмов эти клетки глубоко проникают в миометрий?

Обширное семейство разрушающих матрикс цинкзависимых металлопротеаз (metalloproteinases - MMPs) играет важную роль во многих физиологических процессах, таких как морфогенез, васкуло- и ангиогенез, склероз и, наконец, опухолевый рост. Любая доброкачественная и, тем более, злокачественная опухоль является мощным стимулом для возникновения каскада MMPs, который способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток через деградированный матрикс

соседних тканей. **[8,12].** Менее известны данные о роли металлопротеиназного каскада в процессе цитотрофобластической инвазии на различных этапах физиологической и осложненной беременности. Имеются данные о существенном значении ММР-2 и -9 в процессе имплантации бластоцисты в эндометрий матки у обезьян **[153]** и человека **[141],** в раннем развитии плаценты и цитотрофобластической инвазии в I и II триместрах беременности **[70],** а также в плодных оболочках **[155].** В условиях патологии беременности роль MMPs рассматривается в основном у женщин с преэклампсией и при синдроме привычного невынашивания **[26].** Следовательно, данные о ЦТИ на разных этапах неосложнённой беременности и при преэклампсии фрагментарны, отсутствуют сведения об источниках инвазии во II триместре беременности, о продукции металлопротеиназ различными типами инвазивных клеток на разных сроках гестации.

Цель настоящего исследования заключается в морфометрической оценке различных типов инвазирующего цитотрофобласта, их источников и продукции металлопротеиназ 2 и 9 типов в течение условно нормальной беременности и при преэклампсии. Для достижения этой цели использованы следующие задачи.

Задачи

1. Найти источники цитотрофобластической инвазии в середине беременности.
2. Охарактеризовать количество и размеры интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток в течение неосложненнной беременности в стандартной площади маточноплацентарной области.
3. Оценить активность синтеза металлопротеиназ-2 и -9 в трех типах клеток, осуществляющих процесс цитотрофобластической инвазии на разных сроках неосложненной беременности.
4. Определить количество и размеры интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток у женщин, страдающих преэклампсией.
5. Охарактеризовать функциональную активность металлопротеиназ -2 и -9 в трех типах клеток, осуществляющих процесс цитотрофобластической инвазии при преэклампсии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые выявлена взаимосвязь трех типов инвазирующих клеток в течение неосложненной беременности. В I триместре регистрируется максимальное количество интерстициального ЦТ в стандартной площади среза. Для него характерна умеренная иммуноэкспрессия ММР-2. Эндоваскулярный цитотрофобласт обнаруживается в просветах спиральных артерий эндометрия с высокой иммуноэкспрессией ММР-2. Во II триместре источниками продолжения цитотрофобластической инвазии становятся новые генерации якорных ворсин. С увеличением площади их контакта с материнским эндометрием, пролиферацией ворсинчатого цитотрофобласта осуществляется и глубокое проникновение всех инвазивных клеток в сторону радиальных артерий. Встречное взаимодействие интерстициального и внутрисосудистого цитотрофобласта приводит к лизису эластических и мышечных компонентов и значительному расширению просвета радиальных артерий. Пик иммуноэкспрессии металлопротеиназ приходится на II триместр: возрастает экспрессия ММР-9 в интерстициальном цитотрофобласте и многоядерных гигантских клетках, при максимальном её уровне во внутрисосудистом компоненте. В III триместре регистрируется спад цитотрофобластической инвазии при одновременном увеличении количества и размеров многоядерных гигантских клеток.

У женщин с преэклампсией цитотрофобластическая инвазия редуцируется за счет эндоваскулярного цитотрофобласта, уменьшения количества и размеров интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток с достоверным снижением иммуноэкспрессии металлопротеиназ.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Количественная оценка трех типов инвазивных клеток с пиками их плотности распределения и металлопротеиназной активности на 9-12 и 18-24 нед. гестации важны в акушерской практике. Первое снижение цитотрофобластической инвазии является одним из основных патогенетических механизмов неразвивающейся беременности. Недостаточность второго пика объясняет начало формирования симптомокомплекса преэклампсии и позволяет уточнить патоморфологические признаки этого тяжелого осложнения в III триместре при изучении биопсий плацентарного ложа и удалённых маток.

Основные материалы и положения доложены: на Научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2012), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014).

Результаты диссертации внедрены в лекционный курс и практические занятия тематических циклов по практической плацентологии на кафедре патологической анатомии, цитологии и молекулярной патологии ФГБОУ ДПО Института повышения квалификации ФМБА России.

I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Морфогенез цитотрофобластической инвазии в норме и у женщин, страдающих преэклампсией.

1.1. История изучения цитотрофобластической инвазии.

Несмотря на то, что плацента была известна ещё в первобытные времена **[131]**, только в XVII веке итальянский анатом H.Fabricius, изучая плаценты овец, выделил в них котиледоны с двумя встречными сосудистыми системами **[7]**. Но функции этого органа познавались постепенно, по мере внедрения клеточного уровня исследований. Известно, что в 1777г W.Hunter в «Атласе беременной матки» отмечает разделение материнского и плодного кровотока и описывает спиральные артерии матки человека. В 1870 году, изучая материал маток под микроскопом, G.Friedländer заметил в просвете спиральных артерий клетки, блокирующие кровоток. Происхождение и значение их на тот момент оставалось неясным. Термин «трофобласт» был предложен только через 30 лет, в 1899году A.A.Hubrecht, который отметил, что трофобласт находится не только на поверхности бластоцисты, но некоторые его клетки обнаруживаются и в стенке беременной матки, около её сосудов. Долгое время это был спорный вопрос. Патологоанатомы L.Ashoff и Th. Landhans выдвинули гипотезу, что эти клетки приходят из материнского кровотока. Hinselman (1913г.) предположил, что эти клетки обладают ферментативной активностью (цитировано по Милованову А.П., Кириченко А.К. **[7]**). В 1927г. O. Grosser, изучая и классифицируя плаценты различных животных и человека, доказал плацентарную (фетальную) природу «трофобласта» и тот факт, что они вызывают дегенеративные изменения стенок маточных артерий. Характер изменений стенок артерий, замещение структурных элементов фибриноидом были описаны, но значение этого процесса оставалось неясным. Долгое время для обозначений изменений использовали неправильный термин «фибриноидный некроз».

Только в 1966г. эмбриолог Hamilton et al. на уникальной коллекции эмбрионов человека описал процесс цитотрофобластической инвазии из клеточных колонн вглубь эндометрия. Существенным скачком в изучении этого процесса стал новый метод биопсии плацентарного ложа матки, взятой во время Кесарева сечения и внедренный в 1958году W.B.Robertson and G.Dixon **[55].** В 1967 году группа авторов: I. Brosens, W.B. Robertson and G.Dixon. публиковали работу **[35]**, в которой подчеркивается физиологический характер явно деструктивной перестройки стенок спиральных артерий матки с замещением их фибриноидом, которые после перестройки не реагируют на регуляцию со стороны организма матери и непрерывно снабжают плод необходимой ему материнской кровью.

Следующим важным шагом, который сделали эти авторы, была гипотеза, что причина преэклампсии и эклампсии заключается в недостаточности цитотрофобластической инвазии (1972г.). Дальнейшие исследования цитотрофобластической инвазии были фрагментарными, они зависели от собранного материала. Идеальным вариантом был бы материал ампутированных маток, но с каждым годом его становится все меньше. Весь мир стремится перейти на органосохраняющий принцип борьбы с акушерскими осложнениями. Вместе с тем, таким исследователям как Pijnenborg R., Dixon G., Robertson W.B., Brosens I. (1980, 1981, 1982 гг.) **[119,120]** удалось объединить изучение ампутированных маток из разных стран и описать их и подразделить условно этапы цитотрофобластической инвазии на первую и вторую волны, отмечая периоды наибольшей интенсивности этого непрерывного процесса.

С помощью электронной микроскопии в 1974году Sheppard et al. **[142,143]**, в 1980г. De Wolf et al. **[52]** продемонстрировали и доказали встраивание фетальных клеток (цитотрофобласт) в эндотелиальный слой спиральных артерий и дальнейшее их движение против тока крови в радиальные артерии. В дальнейшем были разработаны

иммуногистохимические методы изучения цитотрофобласта, в частности найден маркёр, выявляющий эпителиальные филаменты в их цитоплазме – антитела к низкомолекулярному цитокератину (Khong T.Y. et al. 1986 **[92]**; Yen et al 1988**[161]**).

В нашей стране клинические аспекты ЦТИ с помощью допплерометрии изучались А.Н.Стрижаковым и коллегами (1990, 1991, 1998, 2000, 2007) **[17,18,19,20,21]**. Иммуногистохимический метод использовали Милованов А.П. и коллеги (1999, 2009, 2010, 2012, 2013, 2014) **[6,7,8,9,10,11,14]**, а также Волощук И.Н. и коллеги (1991,2000,2007) **[1,4,13]**, Кириченко А.К. 2005г **[5]**.

1.2. Различные способы изучения цитотрофобластической инвазии

По регуляции ЦТИ существует множество исследований, но в основном в них оценивается качественная характеристика инвазивных клеток. Существует лишь несколько работ с попытками морфометрии ЦТИ в различные сроки беременности. Классической является уже упомянутая выше работа Pinenborg R. и соавт. (1981) **[120]**, основанная на уникальной коллекции из 47 ампутированных маток в течение I триместра до конца 18-ой недели постменструального срока (п.м.). Разделив участки контакта плаценты с маткой (МПО) на центральную и периферическую зоны, они определили максимальную плотность распределения инвазивных интерстициальных клеток в центре МПО с формированием многоядерных гигантских клеток (МГК) как тупиковых клеток этого процесса. Однако использование срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, снижало объективность полученных данных, поскольку ИЦТ порой трудно дифференцировать с децидуальными клетками. В 2002 году выполнена морфометрия ИЦТ, визуализированного с помощью маркера – цитокератина 8 на серийных срезах в стандартном объеме МПО в доношенном сроке у женщин с преэклампсией и анемией беременных с помощью специальной насадки для микроскопа, позволяющей подсчитать все элементы плацентарного ложа **[87]**. В 2005году Salafia C.M. и коллеги исследовали

базальные пластинки родившихся плацент и проводили морфометрию маточноплацентарных артерий эндометрия **[138].** В 2010 году **[8]** охарактеризованы темпы ЦТИ в процессе неосложненной беременности с учетом иммуномаркера цитокератина-7, но без морфометрии. В настоящее время уделяется большое внимание изучению местных клеточных факторов, влияющих на ЦТИ. C. Helige и коллегами проведена морфометрия децидуальных естественных киллеров и децидуальных естественных макрофагов материнского организма в зоне инвазии цитотрофобласта в пределах плацентарного ложа **[73].**

Для изучения динамики процесса инвазии, обнаружения клеток цитотрофобласта, синцитиотрофобласта, изучения состава экстрацеллюлярного матрикса иммуногистохимический метод незаменим **[42,77]**. Он используется как в культуре цитотрофобласта с добавлением различных факторов роста, интерлейкинов, цитокинов, так и в биоптатах матки, взятых из плацентарного ложа во время кесарева сечения или из ампутированных маток **[69,100,138,163]**. Для исследования инвазивного процесса в настоящее время используются различные технологии **[122]**, в том числе применение электронной микроскопии **[61]**, ультразвука и магнитного резонанса **[36]**. Появились методы оценки эффективности действия металлопротеиназ в пределах плацентарного ложа путем измерения толщины коллагеновых волокон в этой зоне и за её пределами **[145].** Следует подчеркнуть значительные трудности сбора такого материала по срокам условно нормальной беременности и, вместе с тем, ценность получаемых результатов в тех случаях, когда это удается сделать.

1.3. Дифференцировка цитотрофобласта на основные типы и динамика инвазии

На ранних сроках гестации процесс ЦТИ подробно изучен, но в дальнейшем, по мере продвижения инвазивных клеток к радиальным артериям миометрия возникает вопрос, как инвазивным клеткам удается лизировать стенки этих достаточно крупных артерий, с двумя эластическими

мембранами и толстой мышечной оболочкой для обеспечения быстрого роста плода **[131]**? Каково же направление дифференцировки задействованных в нем клеток? Вневорсинчатый цитотрофобласт традиционно подразделяется на интерстициальный (ИЦ), многоядерные гигантские клетки (МГК) и эндоваскулярный цитотрофобласт (ЭВЦ) **[85,119].** Известно, что по пути ЦТИ из оснований якорных ворсин в миометрий цитотрофобласт изменяет экспрессию ростовых факторов и структуру рецепторов, которые играют важную роль в васкулогенезе, ангиогенезе и лимфангиогенезе **[131]**, в частности это VEGFR 1-3, растворимый VEGFR-1, VEGF-A, VEGF-G и плацентарный ростовой фактор PIGF **[131]**. При дифференцировке цитотрофобласта редуцируются рецепторы, специфичные для поляризованного цитотрофобласта в составе эпителия ворсин, например интегрин α1β1 **[131].** В лизисе экстрацеллюлярного матрикса, стромы, эндотелия участвуют специфичные металлопротеиназы (MMPs), синтезируемые инвазирующим цитотрофобластом. Применительно к МПО инвазирующий цитотрофобласт предлагается дифференцировать на две формы [KurmanR.J., 1991): 1) интерстициальный цитотрофобласт (ИЦТ), который распространяется в пределах стромы МПО и достигает спиральных артерий со стороны их адвентиции; 2) эндоваскулярный цитотрофобласт (ЭВТ), выявляемый в просвете этих артерий.

1.3.1. Интерстициальный инвазивный цитотрофобласт.

В результате действия инвазивных интерстициальных клеток на спиральные, а затем и радиальные артерии они превращаются в широкие эндо- и миометриальные сегменты маточноплацентарных артерий **[53, 58, 107].** Использование антител против цитокератина-8 позволяет иммуновизуализировать интерстициальный цитотрофобласт по четкому венчику этого маркера в цитоплазме. При отсутствии необходимой перестройки извитых радиальных артерий высокая интенсивность и турбулентность потока крови вызывает повреждение архитектоники ворсин, в том числе якорных **[41]**. К концу беременности маточноплацентарные артерии

становятся более короткими и менее извитыми, мешковидными, диаметр их резко увеличивается **[138]**. Есть данные, что инвазивный цитотрофобласт стимулирует продукцию ангиогенных факторов в эндометрии **[132,133,163,164].**

1.3.2. Эндоваскулярный инвазивный цитотрофобласт.

Этот тип инвазирующего цитотрофобласта необходим для ремоделирования более крупных радиальных артерий, так как цель и уникальная способность эндоваскулярных клеток – имитировать фенотип эндотелиальных клеток и встраиваться изнутри в стенки радиальных артерий для дальнейшей их перестройки с лизисом эластичной и мышечной ткани и замещением её фибриноидом **[42,125].** Эндоваскулярный инвазивный цитотрофобласт отличается не только своим местоположением, но и некоторыми свойствами.**[138,155]** Механизм встраивания этого цитотрофобласта в эндотелий сложный, он опосредован через кадгерин и Fas-лиганд/Fas-сигнальную систему **[28,38]**. Есть данные, что он включает фагоцитоз фрагментов гибнущих эндотелиальных клеток **[27]**. Однако не все клетки, инвазирующие сосуды, встраиваются в их стенку и эндотелий. Многие из них остаются в миометрии и объединяются в весьма необычные и во многом загадочные структуры.

1.3.3. Многоядерные гигантские клетки.

В течение второй волны ЦТИ, распространяясь в центральных участках маточноплацентарной области на границе с миометрием и, «как будто встретив препятствие», ИЦ образует большие скопления в межмышечных прослойках, часть клеток сливается, образуя МГК. С 33-ой недели инвазия интерстициального цитотрофобласта затихает, но на границе инвазии в миометрий всегда определяются многоядерные гигантские клетки **[91].** В 37-40 недель во многих участках миометрия в центральной зоне плацентарной площадки они преобладают **[8]**. Как уже

было сказано, МГК имеют трофобластную природу **[120]**. Существуют два вида МГК. По классификации al-Lamki **[94]**: 1)«рыхлые» агрегаты из одноядерных клеток, соединенных между собой различными контактами, 2) собственно многоядерные крупные клетки, содержащие в цитоплазме 2 и более ядер. В агрегатах трофобластных клеток, причисляемых к МГК, существуют специальные соединительные каналы (щелевые контакты) и десмосомы **[45]**. В структуру таких щелевых контактов входят белки коннексины **[71,152]**. Через них возможен обмен ионами и небольшими молекулами **[161]**. Щелевые контакты участвуют в процессе протеолиза**.** Возможно, с помощью них из агрегатов образуются МГК. **[49].** Структура собственно многоядерных гигантских клеток имеет характерные особенности: высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, хорошо развитый комплекс Гольджи, вокруг него много цистерн эндоплазматической сети, в цитоплазме определяются кластеры гликогена, липидные капли и четкая иммуноэкспрессия против антител к цитокератину-8 в их цитоплазме. Митотических фигур нет. **[94]** . Это может свидетельствовать о синтезе белков, ферментов и гормонов для аутокринной стимуляции инвазии **[34]**, например с помощью β-ХГЧ и плацентарного лактогена **[94].** Доказано, что МГК экспрессируют белок комплекса гистосовместимости HLA-G класс I **[98].** Перестройка радиальных артерий продолжается и после II триместра **[35]**. Вместе с тем, остается неясным главный вопрос: МГК – это тупик ЦТИ, поскольку эти клетки располагаются на крайних рубежах инвазивного процесса в миометрии, - или это агрегация активных клеток для усиления их протеолитической функции? От этого процесса напрямую зависит благоприятный исход беременности, жизнь будущего ребенка, а иногда и его матери. Рассмотрим известные источники и механизмы регуляции ЦТИ в III триместре.

Источники цитотрофобластической инвазии

Несомненный интерес представляют морфология инвазивного роста цитотрофобласта, его источники, смена фенотипа и механизмы регуляции. Для расшифровки морфогенеза МПО полезна концепция о промежуточном типе цитотрофобласта, который отличается по своим свойствам и локализации как от синцитиотрофобласта, так и от ворсинчатого цитотрофобласта. Промежуточный, или вневорсинчатый, цитотрофобласт — это несколько субпопуляций данных клеток во вневорсинчатых структурах плаценты, включая клеточные островки, септы, плодные оболочки и, конечно, базальная пластинка. Источники образования и функции этих клеток интенсивно изучаются. Считается [50], что существует два пути цитотрофобластической инвазии:

1) большая часть инвазирующих ИЦТ и ЭВТ проникают в имплантационную площадку из остатков клеточных колонн или ранний путь: цитотрофобласт клеточных колонн → цитотрофобласт в составе щита → ИЦТ → ЭВТ;

2) обнаружены новые очаги пролиферации ИЦТ из оснований так называемых якорных ворсин. Если раньше им отводилась исключительно механическая или опорная функция (ворсины, фиксирующие ворсинчатое дерево), то в настоящее время доказана их способность формировать пролифераты из ворсинчатого цитотрофобласта в сторону децидуальной ткани. Следовательно, обнаружена новая принципиальная особенность морфогенеза МПО: ворсинчатый цитотрофобласт является камбием не только для регенерации синцитиотрофобласта, но и источником пролиферирующих инвазивных форм вневорсинчатого цитотрофобласта, а именно для ИЦТ и ЭВТ в составе МПО. В результате формируется 2-ой путь инвазии: ворсинчатый цитотрофобласт из оснований якорных ворсин → ИЦТ → ЭВТ. Этот инвазивный процесс становится единственным в течение 5-12-й недели и всего II триместра. В ряде публикаций [50, 147] данный путь инвазии детально изучен, выделено несколько этапов смены фенотипа этих клеток. DamskyC.H. и соавт. (1992) предложили разделить дистанцию инвазии цитотрофобласта на несколько зон (рис. 1).

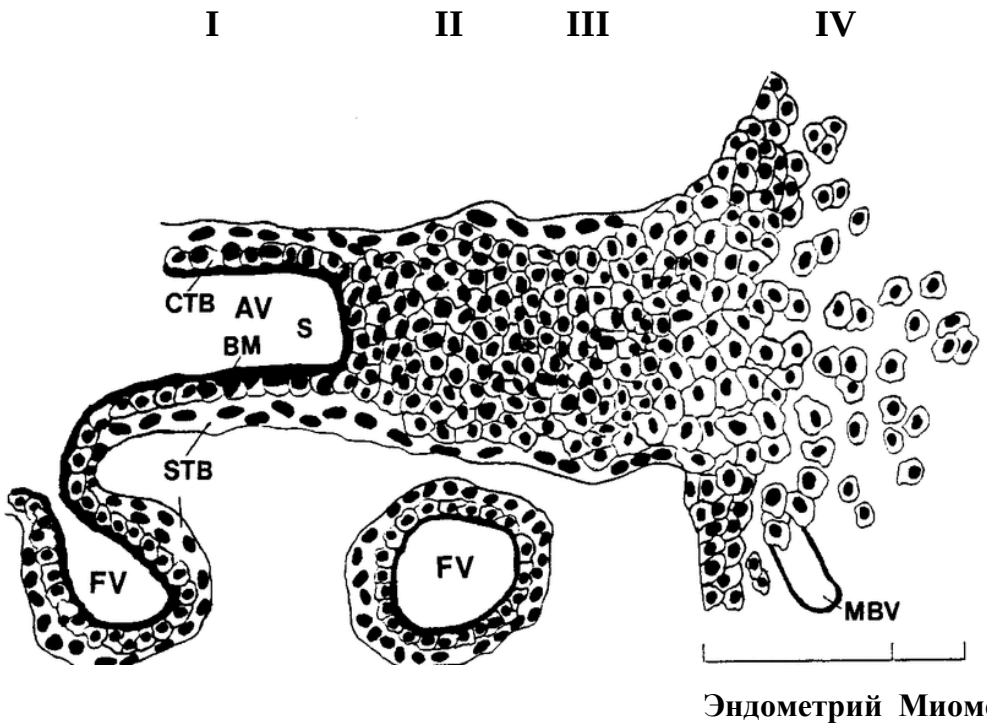


Рис.1. Взаимоотношения тканей матери и якорных ворсин в плаценте 10 недель (п.о.) (С.Н. Damsky et al. 1992 [50])

I Цитотрофобласт в составе эпителия основания якорной ворсины, по месту её контакта с d. basalis (клетки Лангханса, или 1 зона);

II Более или менее компактный слой пролиферирующего цитотрофобласта (проксимальный щит, или 2-ая зона)

III Разобщенный инвазивный слой цитотрофобласта (дистальный щит, или 3-я зона);

IV Удаленные клетки в глубоких слоях МПО (4-я зона)

FV *– флотирующие (плавающие) ворсины.*

AV *– якорные ворсины, связанные со стенкой матки*

CTB *– цитотрофобласт*

S *– строма*

BM *– базальная мембрана*

STB *– синцитиотрофобласт*

MBV- *фрагменты распавшихся клеточных колонн.*

В 1-й зоне представлен однорядный ворсинчатый цитотрофобласт – частый элемент эпителия ворсин в течение I и отчасти II триместра , он является камбием для регенерации синцитиотрофобласта. В основании якорных ворсин цитотрофобласт становится стволовой клеткой для пролиферации и последующей инвазии ИЦТ и ЭВТ. Для этой локализации цитотрофобласта характерны частые митозы и множество гранул гликогена в цитоплазме. Цитотрофобласт 1-й зоны тесно связан с базальным слоем эпителия якорной ворсины по Damsky et al. 1992г [50].

Во 2-й зоне цитотрофобласт отходит от базального слоя, но сохраняет десмосомальные контакты между отдельными клетками, составляя характерные пласты роста вглубь МПО или вдоль полосы фибриноида Рора. Крайние ряды цитотрофобласта окружены матриксом и контактируют с децидуальными клетками. Они сохраняют ультраструктурные черты ворсинчатого цитотрофобласта (гранулы гликогена, отдельные глыбки цитокератина), но характеризуются более активными процессами размножения, что подтверждается иммуноположительной реакцией против антигена пролиферации клеток. Это убедительно показано в ткани плацентарного ложа на 5—10-й неделе гестации и в культуре цитотрофобласта [65]. Важным фактом стало то, что пролиферирующий цитотрофобласт утратил интегрин-рецепторы к коллагену IV типа и фибронектину, но сохранил один из рецепторов к ламинину. Следовательно, фенотип стволовых клеток во 2-й зоне изменился в сторону потери рецепторов к белкам базального слоя эпителия и приобретения максимальной пролиферативной активности.

В 3-й зоне разобщенность цитотрофобласта увеличивалась, поскольку отдельные его клетки расположены среди децидуальных клеток и матрикса. В его цитоплазме отсутствуют гранулы гликогена, мало лизосом и липидных капель и много филаментов. По составу интегрин-рецепторов, кроме ламинина. вновь появились рецепторы к фибронектину, но уже в новой комбинации (a5/B1). Высокая специализация этих клеток выражается в синтезе особой коллагеназы IV типа с массой 72 кДа, а также плацентарного

лактогена [59]. Иными словами, мигрирующий цитотрофобласт приобретает гормональную и целенаправленную протеолитическую функцию, т.е. становится в полной мере соответствующим ИЦТ.

В 4-й зоне встречаются лишь редкие удлиненные клетки цитотрофобласта с гиперхромными ядрами среди преобладающих децидуальных клеток, матрикса или пучков миометрия. В них нет митозов, цитокератин формирует полный венчик вокруг ядра. Они иммунонегативны в отношении плацентарного лактогена, но сохраняют рецепторы к ламинину, фибронектину, коллагену IV типа при появлении новых, необычных интегринов (ul/Bl). Во многих удаленных от якорной ворсины клетках обнаружены признаки дистрофии цитоплазмы и кариорексиса [Damsky C.H. и соавт (1992)].

Несмотря на несомненную полезность разграничения ЦТИ на протяжении пути от ворсинчатого ЦТ до эндометрия, в этой схеме не представлены пути продвижения внутрисосудистого ЦТ и отсутствуют МГК, что необходимо учитывать для полной оценки ЦТИ. Кроме того, нет сведений об изменениях ЦТИ во время II триместра и судьбе якорных ворсин в III триместре.

1.5. Факторы, влияющие на цитотрофобластическую инвазию

1.5.1. Ауто- и паракринные влияния

Нужно отметить, что изначальный ворсинчатый цитотрофобласт, вступая на путь миграции и формируя пролифераты в основаниях якорных ворсин, принципиально меняет не только внешнюю рецепторную структуру, но и многие внутренние механизмы, а также антигенную структуру. Это разделение и сам процесс регулируется во многом за счет специальных транскрипционных факторов **[139]**. На экспрессию необходимых генов влияют многие белки и ферменты. Так, усиливают инвазию плацентарный протеин 13 (PP 13) **[77]**, он запускает инвазию **[152]**, а также плацентарный протеин А(PAPP-A), он повышается в сыворотке матери в процессе беременности и снижается после родов. Доказано, что он способствует инвазии **[32]**. Есть данные о том, что на дифференцировку цитотрофобласта оказывает большое влияние LIF-фактор,

ингибирующий лейкоз **[149]**.Различные вещества, такие как PPAR- гамма **[60]**, белки FOXO **[89],** способные активировать рецепторы, регулирующие инвазивный процесс. Многие регулирующие вещества выделяют NK-клетки **[57, 75, 121].** На ЦТИ могут оказывать влияние не только высокоспециализированные регуляторные молекулы, но и, казалось бы, простые по химическому составу вещества. Например, определяющее значение имеет NO **[90]** и кислород.

1.5.2. Оксигенация

Кислород – важнейший регулятор процесса ЦТИ. Низкая концентрация кислорода влияет на транскрипционные факторы на биохимическом уровне, изменяя и стимулируя процесс дифференцировки цитотрофобласта и экспрессию генов **[131].** Васкуляризация матки напрямую зависит от содержания кислорода в атмосфере, это обнаружено в экспериментах на крысах **[137]**. Влияние кислорода неоднозначно. Чрезмерно низкое парциальное давление его снижает у крыс долю ИЦ и повышает объем ЭЦ **[137]**. По-видимому это адаптивный механизм. Гипоксия матери активирует цитотрофобласт для распространения не только в зону спиральных артерий эндометрия, но и на более длинную дистанцию и встраивание в радиальные артерии матки **[137,162]**. Раннее плацентарное и эмбриональное развитие проходит при низком содержании кислорода с транспортом питательных веществ из материнской плазмы и секрецией материнских эндометриальных желез. Этот тип питания эмбриона называется гистиотрофным **[39].** Первоначальная излишняя перфузия межворсинчатого пространства (МВП) в течение этих первых 10 недель повышает риск потери беременности **[150]** из-за повреждающего эффекта свободных кислородных радикалов. В период установления межворсинчатого кровотока (11-12 недель п.о.) отмечается значительное повышение ферментной активности антиоксидазных ферментов: каталазы, глютатион-пероксидазы, Mg^{-}, Zn^{-}, супероксиддисмутазы в плацентарной ткани **[40].** Подъем содержания кислорода в МВП в значительной мере происходит в II –III триместрах **[146]**. Среди

транскрипционных факторов, контролируемых кислородом, особое место занимает HIF – гипоксийно-индуцибельный фактор-1α: промоутер транскрипции в период гипоксии **[153].** Он поддерживает нормальную плацентарную функцию в этот период **[44].** HIF - 1α может регулировать клеточную пролиферацию и апоптоз посредством регуляции генов, таких как p53, p21, и Bcl-2 **[43,101]**. Имеются данные, что в состояниях, сопровождающихся гипоксией материнского организма, наблюдается повышенная ЦТИ и большая дилятация просвета спиральных артерий. Она может быть адаптивной реакцией для усиления газообмена кислорода между плацентой и плодом. **[86]** Показано, что адаптивный процесс в плацентах женщин с анемией не ограничивается плацентарными ворсинами, но включает улучшение материнской оксигенации на уровне спиральных артерий с более глубокой инвазией **[88].** Поток крови в этом случае гораздо больший и поэтому газообмен между плацентой и плодом более интенсивный **[88].**

Вместе с тем, более выраженная гипоксия (культивирование клеток при 1% оксигенации) связана со снижением пролиферации клеток в I триместре и редукцией дифференцировки цитотрофобласта в плацентах **[31,83,140].** В цитотрофобласте при такой этих условиях наблюдается усиление гибели клеток путем апоптоза **[68,74].** Каковы же реальные механизмы продвижения ЦТ-клеток и гестационная перестройка вначале спиральных, а затем и радиальных артерий?

1.5.3. Роль металлопротеиназного каскада в процессе физиологической и осложненной беременности.

1.5.3.1. Типы металлопротеиназ

Металлопротеиназы – ферменты, продуцируемые различными клетками и разрушающие компоненты внеклеточного матрикса. Семейство металлопротеиназ включает 16 ферментов, которые экспрессируются разными клетками в интерстициальное пространство в виде биологических латентных форм. Активация проферментов происходит под действием

протеаз. Молекула металлопротеиназы состоит из четырех доменов: 1) предомена, являющегося сигнальным пептидом, необходимым для секреции фермента; 2) продомена, отщепляемого при активации фермента; 3) каталитического домена, содержащего ион цинка; 4) регуляторного домена, имеющего центр связывания с ингибиторами металлопротеиназ (TIMP) **[12].** Металлопротеиназы классифицируются в основном по специфичности компонентов матрикса **[24,97]**. Это семейство делится на 4 группы в соответствии со своими свойствами и локализацией **[77]**:

Коллагеназы, действующие преимущественно на фибриллярный коллаген I , II, III и включающие интерстициальную коллагеназу (MMP-1), нейтрофильную коллагеназу (MMP-8) **[54,102].**

Желатиназы, деградирующие преимущественно денатурированный коллаген (желатин) и нативный коллаген IV типа; они включают желатиназу A , масса - 72 kDAили коллагеназу IV типа (MMP-2) и желатиназу B, масса - 92 kDa или коллагеназу IV типа (MMP-9).

Стромелизины, имеющие широкий спектр влияния на фибронектин, ламинин, коллаген III, IV, V типа, эластин, протеогликановый внутренний протеин; они включают стромелизин -3 (MMP-11), матрилизин (MMP-7) и металлоэластазу альвеолярных макрофагов в легких человека.

Мембранный тип матрикса металлопротеиназ (MT –MMPs), составляющие новый субкласс; они включают MT-MMP-1, -2 и -3 **[54,81,102].** Эти MT-MMPs локализованы на поверхности клеток и их субстрат пока не совсем ясен. Про MT-MMP-1 известно, что он включен в процесс превращения латентной формы MMP-2 в активную.

Интерстициальный цитотрофобласт продуцирует различные металлопротеиназы **[72].** Из семейства MMPs желатиназа A (MMP-2) и желатиназа B (MMP-9) занимают ведущее место в деградации компонентов базальной мембраны и матрикса **[93].** MMP-2 и MMP-9 и их ингибиторы

TIMP-1 и TIMP-2 имеют особое значение при беременности, они определяют ход имплантации, плацентации и инвазивную способность трофобласта в эндометрии **[141].**

1.5.3.2. Регуляция экспрессии ММР-2 и -9.

Она осуществляется с помощью следующих механизмов:

1. Эндотелиальный ростовой фактор (**VEGF**), эпидермальный ростовой фактор (**EGF)** и фибробластный ростовой фактор (**FGF)** являются важными факторами, которые активируют деградацию экстрацеллюлярного матрикса в процессе цитотрофобластической инвазии. **[25,128]**. VEGF, EGF, FGF-4 и FGF-10, но не FGF-2, стимулируют активность ММР-9, в то время как FGF-2 снижает активность ММР-9 до 17 % от базового уровня. FGF-4 и FGF-10 также стимулируют активность и ММР-9. Эти результаты подтверждают гипотезу, что ростовые факторы управляют инвазивной способностью цитотрофобласта и поэтому играют значительную роль в развитии плаценты на ранних сроках **[25]**. Используя иммуногистохимию, было обнаружено, что в плацентах I триместра FGF-4 экспрессировался в строме ворсин, особенно в эндотелиальных клетках FGF-10 экспрессия была локализована во вневорсинчатом трофобласте, инвазирующем децидуальную оболочку.

2. Активность металлопротеиназ регулируется также специфичными тканевыми ингибиторами **(TIMPs)** (см. раздел 1.5.3.4)

3. Зафиксировано, что **интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли (THF-α),** в русскоязычном варианте – ФНО-α, подавляют инвазию вневорсинчатого цитотрофобласта **[29,97]**, снижая уровень мРНК ММР-9 и/или снижая его активность. Регуляция ММР-2 и ММР-9 экспрессии различна: постоянная ММР-2 и ситуативная ММР-9.

1.5.3.3. Клетки-продуценты ММР и их локализация в процессе беременности.

I триместр: По некоторым данным, в плацентах I триместра зафиксировано интенсивное иммуноокрашивание ММР-9 в клеточных колоннах, в их инвазивной части как у человека **[77],** так и у обезьян **[154]**. Большинство авторов придерживаются мнения, что ММР-2, и -9**,** хорошо экспрессируются в цитотрофобласте на границе материнской части и якорных ворсин. Это подтверждает, что плацентарная ткань, в частности, ворсинчатый цитотрофобласт, продуцирует инвазирующие клетки, моделирует и контролирует процесс их миграции посредством экспрессии ММР-2, -9, отсутствующих в миометрии на ранних сроках беременности. Подобная картина наблюдается и у обезьян, в частности макак резус **[154]**. Есть данные, что мРНК, необходимая для синтезаММР-9 визуализируется также вдецидуальных клетках, но без указания их конкретных типов. Экспрессия ММР-9 зафиксирована в цитотрофобласте эндометрия. У макак резус имплантация бластоцисты проходит на 9,5 день беременности. Присутствие мРНК, необходимой для синтеза ММР-2 и -9 на 12 день беременности подтверждает их очевидную роль в этом процессе.

II триместр: имеющиеся данные противоречивы, некоторые авторы утверждают, что на парафиновых срезах наблюдается экспрессия ММР-9 в инвазивных трофобластных клетках (на криостатных срезах она отсутствовала.) **[77].** Более распространено мнение, что в процессе нормальной гестации в амниотической жидкости и в плодных оболочках обнаруживаются ММР-2,и она экспрессируется постоянно, а ММР-9 выявляется чаще перед родами **[156].**

III триместр: Металлопротеиназа 9 типа в доношенном сроке у человека обнаружена в амниальных клетках и слое цитотрофобласта плодных оболочек, в париетальных децидуальных клетках и синцитиотрофобласте ворсин **[158].** На криостатных срезах все вневорсинчатые трофобластные

клетки, включающиеся в инвазивный фенотип, показывают сильное интра- и экстрацеллюлярное окрашивание **[77].** ММР-2 в доношенных случаях и непосредственно перед родами локализована в клетках амниона, париетальных децидуальных клетках и сосудистой стенке маточноплацентарных артерий. В синцитиотрофобласте отмечено лишь слабое окрашивание **[156].**

Коллаген I типа – важнейший компонент мезенхимальной части в плодных оболочках и в строме плацентарных ворсин. Коллаген IV типа локализован преимущественно в базальных мембранах. В деградации коллагена IV типа участвуют и ММР-2 и ММР-9, а на коллаген I типа действует только ММР-2 . Эта характеристика может объяснить данные о том, что ММР-2 представлен преимущественно в стромальной ткани и её клетках, в то время как ММР-9 больше связан с эпителиальной тканью **[156].** ММР-9 более активна на границе материнской и плодной части по сравнению с чисто плодной или материнской частями, подтверждая важность ММР-9 для отделения тканей плаценты во время родов **[51]**.

1.5.3.4. TIMP

Столь необходимый лизис экстрацеллюлярного матрикса на пути ИЦ и МГК с помощью металлопротеиназ в физиологических условиях регулируется специфическими тканевыми ингибиторами – TIMP **[16,80]**. Была описана их иммуноэкспрессия в человеческих децидуальных клетках, и в вневорсинчатом трофобласте **[77]**. Аналогичные данные получены на макаках резус **[154]**, то есть инвазивная способность цитотрофобласта «сдерживается» на пара- и аутокринном уровнях регуляции. На сегодняшний день описаны три различных TIMPs **[46,91]**: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3. Кроме того сообщается о существовании трех дополнительных TIMP-imp-a , TIMP-imp-b и TIMP-4 **[148].** TIMP связываются с про-ММР и активными ММР, ингибируя таким образом активацию латентных форм ММР в активные ферменты. TIMP различаются по их специфическому действию на ММР.

TIMP-1 подавляет все MMPs в активной форме и более того, MMP-9 (желатиназу B) в латентной и в активной форме **[69,77]** TIMP-2 специфичен для MMP-2 **[27]**. TIMP-3 действует на все типы металлопротеиназ у человека **[77]**. TIMPs экспрессируются эндометриальными стромальными и децидуальными клетками человека, задействованными в процесс функциональной активности экстрацеллюлярного матрикса **[97].**

Тканевые ингибиторы металлопротеиназ синтезируются преимущественно в децидуальных клетках **[54,77,154].** Есть множество свидетельств, что инвазивный вневорсинчатый цитотрофобласт, как интерстициальный **[37,54,77,80,128,141,157]**, так и многоядерные гигантские клетки **[80]** также синтезируют TIMPs. Есть данные, что TIMP-1 и TIMP-2 экспрессируются не только во вневорсинчатом цитотрофобласте, но и в эпителии желез **[138].** Сообщается, что на ранних сроках гестации естественные киллеры организма (NK-клетки) материнской матки также экспрессируют TIMP-1 и TIMP-2 в пределах плацентарного ложа, причем TIMP-2 экспрессируется сильнее **[111].**

Обнаружено, что у обезьян MMPs начинают экспрессироваться раньше, чем TIMPs. MMP-2 и TIMP-2 обнаруживаются раньше, чем TIMPs. MMP-9 и TIMP-1 **[154].** По некоторым данным, TIMP-1 и TIMP-2 экспрессируются на протяжении всего срока беременности **[126,141]** и уровень их существенно не меняется **[126].** По другим данным, перед родами наблюдается высокий уровень экспрессии MMP-9, а сразу после родов существенно повышается уровень её ингибитора TIMP-1 **[77].** Есть свидетельства, что именно в инвазивном цитотрофобласте доношенной плаценты после родов наблюдается высокая активность TIMPs **[37,77].** Этот процесс в свою очередь может блокироваться PI3K -ингибиторами.**[128].** Ингибиторы могут быть инактивировны с помощью ряда протеиназ - трипсина, химотрипсина, стромелизина-3 и эластазы нейтрофилов **[109].**

1.6. Влияние различной патологии на процесс инвазии

В 1999 году Миловановым А.П. была создана классификация патологических процессов в МПО **[7]**, согласно которой разнообразные патологические состояния вызывают определенные нарушения цитотрофобластической инвазии. Так, бластопатии часто сопровождаются недостаточностью начальной и первой волн инвазии. Недостаточность второй волны инвазии в свою очередь может служить причиной гестозов, атероза маточноплацентарных артерий, внутриутробной задержки развития плода. Хроническая гипертоническая болезнь матери и сахарный диабет может стать причиной системной патологии – недостаточной гестационной перестройки спиральных и радиальных артерий. Приращение, отслойка плаценты, миомы, склероз плацентарного ложа часто сочетаются с нарушениями тканевых и клеточных соотношений в маточноплацентарной области. Эндометриты, начавшиеся до наступления беременности, как правило, влекут за собой воспаление плацентарного ложа: отмечено, что цитомегаловирус и бактериальные инфекции могут тормозить дифференцировку и/или миграцию клеток цитотрофобласта**[117,159].** Никотин также негативно влияет на вышеуказанные процессы **[117,159].** У пациенток со спонтанными абортами и угрозой абортов, а также с разрывами плодных оболочек активные формы ММР-2 в амниотической жидкости были существенно снижены по сравнению с физиологическими родами в доношенном сроке **[158].** Доказано **[158]**, что женщины с преждевременным разрывом плодных оболочек имеют значительно более высокую активность ММР-9 и концентрацию её в амниотической жидкости. Однако, измеренные с помощью ELISA изменения в сыворотке крови, связанные с синдромом невынашивания и рождением раньше 37 недель гестации, показали, что на содержание ММР -9 в крови этот синдром не влияет **[26].**

1.7. ЦТИ при преэклампсии.

Имеются данные, что при преэклампсии инвазивный цитотрофобласт сохраняет экспрессию адгезивных рецепторов, характерных для популяции-предшественника и недостаточно изменяет рецепторы, обеспечивающие инвазию и/или имитирующие эндотелиальный фенотип. VEGF и VEGFR-1 остается сниженным, вместе с тем, PIGF не поражен **[131].**

Механизм гестационной перестройки связан с разрушением стенки спиральных и радиальных маточных артерий матери металлопротеиназами **[47]** и увеличением просветов сосудов **[97].** Инвазия – неотъемлемая часть нормальной беременности, в то время как слабая цитотрофобластическая миграция в спиральные артерии играет существенную в развитии преэклампсии **[2,156].** Преэклампсия – тяжелая форма позднего токсикоза беременности, угрожающая жизни и здоровью женщины и будущего ребёнка. Кроме клинических проявлений (гипертензия, протеинурия, олигурия, нарушения центральной нервной системы) **[15],** это заболевание имеет и морфологические проявления – признаки нарушения перестройки спиральных артерий матки, которое приводит к неадекватному кровоснабжению плаценты и, соответственно, плода **[97,156]**. Отмечается снижение интенсивности инвазивного процесса **[110].** В последнее время пристально изучаются молекулярно-генетические предпосылки патогенеза преэклампсии, разрабатываются новые методики изучения плацентарного ложа при этом заболевании **[23].** Недавние данные о том, что VEGF и VEGFR экспрессия нарушена при преэклампсии позволяют думать, что система VEGF важна в регуляции инвазии трофобласта в течение нормального и патологического развития плаценты **[25].** Особого внимания заслуживают желатиназы (А и В), именуемые также ММР-2 и -9, денатурирующие коллаген – составную часть стенок сосудов.

На иммуногистохимическом уровне показано, что в ДК и соседних с ними клетках ИЦ в срезах МПО женщин с преэклампсией, по сравнению с

соответствующими по сроку контрольными плацентами, имеет место более высокий уровень экспрессии ММР-9 **[97]**. По некоторым данным, при преэклампсии уровень ММР-2 также повышен **[95]**. Повышенная экспрессия ММР-9 децидуальными клетками возникает при недостаточной инвазии, компенсируя нормальный ход инвазии вневорсинчатого цитотрофобласта в децидуальную оболочку. Такая дисрегуляция стимулирует продукцию стромелизина-1 (ММР-3) децидуальными клетками; документировано, что это активатор про-ММР-9 **[97].**

Существуют разные оценки интенсивности окрашивания ММР-2 и ММР-9 в преэклампсической плаценте. По некоторым данным для доношенной плаценты, ММР-2 существенно выше по сравнению с нормой. Экспрессия ММР-9 также существенно выше, чем в норме **[96].** По другим данным, металлопротеиназа - 9 хорошо экспрессируются в большинстве плацент при неосложненной беременности. Экспрессии ММР-9 при преэклампсии может и не быть. В некоторых случаях она слабая **[144].** По-видимому, имеет место дисрегуляция процесса и мозаичная картина в разных участках маточноплацентарной области.

Преэклампсия, несомненно, полиэтиологичное заболевание, но основным фактором его развития в настоящее время считается генетический. По некоторым данным **[114,130]** беременные, страдающие преэклампсией, имеют особый вариант набора генов, кодирующих экспрессию ММР-2 и ММР-9 и, соответственно, особые формы этих ферментов, обладательницы которых чаще переживают и спонтанные аборты **[118]**. Имеют значение также гены, ответственные за регуляцию этих ферментов, например кодирующие VEGF, фактора регуляции MMPs **[25,63].** Вместе с тем доказано, что даже по уровню активности ММР-2 и ММР-9 в тканях децидуальной оболочки в I триместре нельзя судить о возможности развития преэклампсии в III триместре **[76].** Эта возможность может быть не

реализована. Кроме того, генетический полиморфизм не влияет на успех в лечении гипертензивных расстройств **[115].**

Металлопротеиназы могут инактивироваться тканевыми ингибиторами TIMPs. При патологии экспрессия TIMPs изменяется. По данным D.O.Anumba (2010г.), в сыворотке крови женщин с потерей беременности в анамнезе в I триместре следующей беременности регистрируют повышенный уровень TIMP-2 **[26].** У женщин с преэклампсией средние концентрации MMP-2 и TIMP-2 в амниотической жидкости выше, чем в норме **[95]**. Следует отметить, что TIMP-1 в децидуальных клетках более выражено экспрессируется при карциноме, этот фермент некоторые авторы рассматривают как маркер опухолевого процесса **[56]** .

Факторы активации могут быть различны, как и факторы инактивации. По некоторым данным, MMP-2 активируется p-амино-фенил-меркурик-ацетатом и даже pH среды имеет значение, так как существует оптимальный диапазон кислотности, при котором наблюдается наибольшая протеолитическая активность металлопротеиназы **[136]**. Есть данные, что активная MMP-2 может активировать неактивную MMP-9 **[129],** также MMP-3 может активировать неактивную MMP-9 **[97].** Биохимия этих процессов требует дальнейшего изучения. Замечено, что при преждевременном разрыве плодных оболочек концентрация активных форм MMP-9 в амниотической жидкости сильно возрастает, а концентрация MMP-2 остается такой же **[158]**. Однако на содержание активных форм ферментов в сыворотке крови этот фактор не оказывает влияния **[26].** По некоторым данным, в сыворотке крови присутствуют специфичные ингибиторы TIMP1 и TIMP2, которые при преэклампсии обнаруживаются в больших концентрациях **[106].**

Много работ основано на оценке образцов крови беременных с помощью методов зимографии и ELISA. В крови все ферменты находятся в неактивных формах, поэтому при таком методе можно говорить лишь о

наличии фермента, а не об его активности: при преэклампсии уровень ММР-9 в сыворотке крови по сравнению с нормой повышен **[63,70,96,106],** уровень ММР-2 также повышен **[95,106,108,111,114].** Даже при гипертензии беременной он повышен **[114].**

Кроме того, есть данные, что дети, рожденные от матерей с преэклампсией, имеют более высокий уровень ММР-9 в крови, чем обычные **[103].** В крови беременной женщины кроме проферментов присутствуют также активные в прошлом формы, инактивированные с помощью соответствующего типу TIMPs.

Вместе с тем, при исследовании экстрактов тканей и биоптатов картина может быть несколько иная, более полно отражающая именно активность ферментов. Инактивация металлопротеиназ при преэклампсии может быть причиной образования скоплений нелизированного коллагена в стенке сосудов пупочной артерии (RomanowiczL., GalewskaZ., BishopJ.),что заметно на морфологическом уровне **[136]**. При преэклампсии рано разрушается гиалуроновая кислота, меняется её соотношение с глюкозаминогликанами. Это способствует разрушению хондроэтинсульфатов. По некоторым данным **[136]** это неблагоприятно сказывается на детях, рожденных от матерей с преэклампсией.

Есть данные, что стенка пупочной артерии при преэклампсии содержит аккумуляции коллагена **[62,63]**, он не расщепляется, а эластин разрушается и стенка сосуда теряет эластичность, что неблагоприятно влияет на плодноплацентарный кровоток. Эндотелиальные клетки стенки пупочной артерии, наоборот, демонстрируют повышенную экспрессию активных форм металлопротеиназ**[105].**

Исследований, посвященных тканям плацент, к сожалению, мало. По некоторым данным **[144],** экспрессии ММР-9 при преэклампсии может вообще не быть или она слабая. Исследования цитотрофобласта при

преэклампсии **[126]** с помощью ПЦР и Вестерн-блоттинга показывают, что уровень экспрессии мРНК ММР-9 в трофобласте и ММР-9 в группе преэклампсии был значительно ниже, чем при нормальной беременности. Высокий уровень ММР-9 в цитотрофобласте показательно сочетался со снижением вероятности развития асфиксии у новорожденного.

Исследования последних лет **[3]** показывают, что причины преэклампсии могут быть различны. Предложено разделение на раннюю преэклампсию (20-34 недели гестации (п.м.)) и позднюю преэклампсию (34-38 недель). Прослеживается семейная предрасположенность именно к ранней преэклампсии, которая сочетается с незрелостью плода и неспособностью цитотрофобласта осуществить гестационную перестройку спиральных и радиальных артерий. В клинике поздней преэклампсии на первое место выходит угрожающее состояние матери, метаболический синдром, нарушение толерантности к глюкозе и прочая соматическая патология. Цитотрофобластическая инвазия осуществляется, идет частичная перестройка сосудов, но она недостаточно эффективна. Нарушения со стороны плода менее выражены. Эти данные необходимо учитывать при оценке морфологических проявлений и разработке методов лечения преэклампсии.

1.8. Заключение

Представленные данные дают исключительно важную информацию о нормальных функциях плаценты и её влияния на развитие эмбриона. Некоторые заболевания взрослых людей берут начало во внутриутробном периоде. Изучение развития нормальной цитотрофобластической инвазии человека незаменимо для лучшего понимания дефектов, связанных с осложнениями беременности. В этом контексте дальнейшие исследования должны быть направлены на перевод базовых знаний о факторах, которые регулируют дифференцировку трофобласта, в диагностические методы и,

возможно, тесты для раннего выявления различных акушерских осложнений.

Семейство металлопротеиназ – неотъемлемый участник всего процесса репродукции человека: от ранних стадий беременности до её завершения. На 6-7 день после оплодотворения ММР-2 и -9 лизируют маточный эпителий и его базальный слой, состоящий из коллагена IV типа. Этот первый этап контролируется цитокинами IL-6 и TGF-α, выделяемыми стромальными клетками окружающего эндометрия. В дальнейшем, включаются ММР-1, 8 и 13, которые лизируют интерстициальные коллагены, и бластоциста погружается на оптимальную глубину. Развитие плаценты определяется протеолитической активностью цитотрофобластического щита, который способствует переходу первичных ворсин (клеточные колонны) во вторичные ворсины (мезенхимальный тип). В течение I триместра металлопротеиназный каскад, продуцируемый инвазивным цитотрофобластом, разрушает эластомышечные компоненты стенок спиральных артерий и превращает их в маточноплацентарные артерии с открытыми в межворсинчатое пространство устьями, т.е. реализует первую волну цитотрофобластической инвазии.

Во II триместре ММР-2 и -9 участвуют в гестационной перестройке более крупных радиальных артерий матки. Перед родами резко повышается продукция ММР-2 в плодных оболочках с их разрывом и завершением родового акта. Дискоординация по типу гипер- или гипофункции ММР-2 и -9 часто приводит к невынашиванию беременности или является важным звеном патогенеза преэклампсии. Эти данные и анализ новых результатов исследований влияния металлопротеиназного каскада приблизит расшифровку патогенеза многих тяжелых акушерских осложнений, что в конечном итоге может улучшить их диагностику и предопределить назначение адекватной терапии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА.

Для решения поставленных задач была собрана представительная коллекция операционного материала, который позволил изучить клеточные элементы ЦТИ на всем протяжении неосложненной беременности и при преэклампсии (Табл. 1). Материал оказался довольно разнородным по причинам и показаниям. Так, в I триместре в исследовании преобладали женщины, пожелавшие прервать беременность по личным соображениям (25 пациенток). Они были соматически здоровы, с нормальными предварительными анализами. Несколько медицинских абортов были не включены в разработку из-за явных признаков хронического эндометрита. Во II триместре важной группой стали 30 поздних медицинских абортов, выполненных по социальным показаниям (несовершеннолетние, больные психическими заболеваниями) с помощью внутривенного введения препарата «Энзапрост» и самостоятельного рождения плода и последа (акушер-гинеколог к.м.н. Солоницын А.Н.). Роды наступали в течение суток при сохранности всех компонентов последа. При вырезке материала забирали преимущественно базальную пластинку с прилежащими ворсинами. В III триместре основным материалом стали биопсии плацентарного ложа, взятые во время кесарева сечения с последующей их ориентацией так, чтобы в микропрепаратах была видна зона перехода эндометрия в миометрий (акушер-гинеколог к.м.н. М.П.Курочка, г.Ростов-на-Дону).

Поскольку медицинские аборты на разных сроках беременности позволяли изучить ЦТИ только в пределах базальной пластинки с частью эндометрия, особую ценность для данного исследования представляли случаи ампутации маток, отобранные в архиве Московского центра патологоанатомических исследований (врач-патологоанатом к.м.н.

Характеристика изученного материала (82 женщины) **Таблица 1**

Неосложненная беременность					
Группы	Срок	Коли-чество случа-ев	Медаборты по желанию здоровых пациенток	Гистерэктомии (показания)	Биопсии плацентарного ложа, взятые во время кесарева сечения
I	7-8 нед. (п.о.)	10	10 соскобов		
II	9-12 нед. (п.о.)	15 (3+12)	3 соскоба	12 маток: 1 - разрыв матки после криминального аборта 2 - шеечная беременность 3-10 – миомы вне маточноплацентарной области 11 - ранний разрыв матки по рубцу 12 - кровотечение после выскабливания по поводу замершей беременности	
III	18-28нед. (п.м.)	30 (25+5)	25 соскобов (поздних абортов по медицинс-ким и социальны м пока-заниям)	5 маток: 1. миома, послеоперационное кровотечение 2. стерилизация с удалением матки при шизофрении 3-5. разрыв матки по рубцу	
IV	31-40 нед. (п.м.)	12 (5+7)	-	5 маток: 1- разрыв матки по рубцу 2 - крупные миомы 3-5 послеродовое кровотечение	7 биоптатов: 1-3- рубец на матке 4-6 – узкийтаз 7 - тазовое предлежание
Преэклампсия					
Группа	Срок	Коли-чество случае в	Медаборты	Гистерэктомии	Биоптаты плацентарного ложа
V	28-33 нед. (п.м.)	11			ранняя преэклампсия
IV	34-38 нед. (п.м.)	4			поздняя преэклампсия

А.В.Добряков), а также из Красноярска (врач-патологоанатом д.м.н. А.К.Кириченко), из Ставрополя (врач-патологоанатом Е.Н. Димова). Всем им мы приносим благодарность за помощь в сборе данной коллекции маток.

Таким образом, собранный материал представил возможность изучить ЦТИ не только в течение I триместра, но и во II, III триместрах условно нормальной или неосложненной беременности, что послужило базой для сравнения МПО в норме и у женщин, страдающих преэклампсией. Материал подразделен на 6 групп (Табл. 1).

I – медицинские аборты на 7-8 неделе (п.о.) – 10 случаев

II - медицинские аборты на 9-12 неделе (п.о.) – 3 случая + ампутированные матки – 12 случаев

III– поздние медицинские аборты на 18-28 неделе (п.м.) – 30 случаев, разбитых на три подгруппы 18-20 недель (10 случаев), 22-24 недели (10 случаев), 25-28 недель (10 случаев) из них 5 ампутированных во II триместре маток.

IV – (31-40 недель (п.м.)) – 7 биопсий плацентарного ложа, взятых во время кесарева сечения + 5 ампутированных маток при условно неосложненной беременности.

V - (28-33 недель (п.м.)) – 11 биопсий плацентарного ложа, взятых во время кесарева сечения по поводу тяжелого течения преэклампсии, сопровождающейся гипоксией плода.

VI- (34-40 недель (п.м.)) – 4 биопсии плацентарного ложа, взятых во время кесарева сечения по поводу тяжелого течения преэклампсии у женщин с избыточной массой тела и угрожающем состоянии роженицы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗУЧЕНИЕ НЕОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Методы морфологического исследования

Световая микроскопия. Материал фиксирован в 10% растворе формалина, забуференного до нейтрального pH. Из каждого случая отобрано не менее 6 фрагментов, которые проведеныпо стандартной схеме и залиты в парафин. Из блоков делали по 5 серийных срезов. Препараты окрашены гематоксилином и эозином для предварительного обзора (микроскоп LeicaDM2500) на предмет наличия МПО и дальнейшего изучения инвазирующих элементов.

Иммуногистохимия инвазивных клеток. После депарафинирования серийные срезы подвергались иммуногистохимическому исследованию в соответствии со стандартными протоколами. Иммунореактивность первичных антител обнаруживали с помощью вторичных антител, коньюгированных с пероксидазной системой. Использовали антитела для выявления **цитокератина 8 типа** (цитокератин-8, фирма Novocastra, клон TS1) + (система детекции Thermo Scientific Ultravision Detection System Anti-Olyvalent, HRP/DAB). С помощью данного маркера визуализировались три инвазивных элемента: 1) ИЦТ– отдельные клетки округлой или вытянутой формы среди желез, децидуальной оболочки и прилежащих пучках миоцитов**.** 2)МГК– клетки имеют более трех ядер с общим ободком иммуноэкспрессии цитокератина.3) ЭВТ – встроенные в эндотелий сосуда клетки, экспрессирующие цитокератин.

На оставшихся серийных срезах использовали готовые к применению антитела для выявления **металлопротеиназ:** 1) MMP-9 (фирма Novocastra, клон 17B11; 2) MMP-9, фирма Novocastra, клон 15W2. Во всех случаях использована единая система детекции (Thermo Scientific Ultravision Detection System Anti-Polyvalent). С помощью данных маркеров исследованы

ИЦТ, МГК и ЭВТ. На качественном уровне оценивали интенсивность экспрессии этих клеток при увеличении 200. Для ММР-2 за негативный (0 баллов) был принят уровень окраски окружающих децидуальных клеток. Различали три уровня положительной окраски клеток: 1 балл – слабая; 2 балла – средняя; 3 балла – максимальная. Для ММР-9 уровень окраски окружающих децидуальных клеток был принят за 1 балл, так как из литературы известно (Xu P**.,** 2002), что эти клетки слабо положительны по этому маркеру. Соответственно, 0 баллов – негативная окраска, 2 балла – средняя интенсивность окраски, 3 балла – максимальная интенсивность окраски. Из каждого случая нами было оценено по 10 клеток каждого типа.

Гистометрия. Инвазивные клетки визуализированы с помощью маркера цитокератин-8. В случаях неосложненной беременности определено количество ИЦТ и МГК в 70 стандартных полях зрения (785000 μм^2) при увеличении 200. Для определения размеров инвазивных клеток вычисленацена деления линейки в μм при увеличении 200, а затем измерялся поперечный размер каждой клетки в плоскости среза, проходящей перпендикулярно через ядро. Было использовано большее количество полей зрения (108), измеренопо пять клеток МГК и ИЦТ (соответственно всего 1080клеток). После поздних медицинских абортов в промежутке от 18 до 28 недель с помощью иммуногистохимического маркера цитокератин-8 выявлялись ЯВ, которые непосредственно связаны с эндометрием матки (всего 192 ворсины). По плотности распределения цитотрофобласта (ЦТ) выявляли три разновидности ЯВ: 1) максимальная активность цитотрофобласта с выявлением у базального слоя двух-трех рядов этих клеток (Max);

2) средняя активность при отсутствии рядов с распространением в дистальные отделы эндометрия (Med).3) единичный цитотрофобласт (Min).

Статистические методы Обработка результатов проводилась с применением программы «STATISTICA-6». Определяли параметры

распределения признаков: среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического(m), стандартное отклонение (δ), медиану (Me). Сравнивали только близкие по срокам гестации группы (Iи II) с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ БАЗА.

Исследования проводились в лаборатории патологии женской репродуктивной системы ФГ БУ «НИИМЧ» РАМН, при этом использованы: микроскоп LeicaDM2500, программное обеспечение изображений Image Scope Color – система для микроскопии и анализа, камера Leica Camera Software.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.

Обработка результатов проводилась с применением программы «STATISTICA-6». Определяли параметры распределения признаков: среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического (m), стандартное отклонение (δ), медиану (Me). Сравнивали близкие по срокам гестации группы (I и II группы) с использованием критерия Стьюдента. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 ОСОБЕННОСТИ ЦИТОТРОФОБЛАСТИЧЕСКОЙ ИНВАЗИИ И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЕЁ ЭЛЕМЕНТОВ В ТЕЧЕНИЕ I ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ.

3.1.1. Идентификация маточноплацентарной области и источники инвазии в I триместре.

В указанном сроке гестации большинство ворсин плаценты достаточно крупные с фестончатыми очертаниями эпителия, который состоит из двух слоев клеток: поверхностный синцитиотрофобласт и подлежащий слой ворсинчатого цитотрофобласта. В некоторых ворсинах цитотрофобласт представлен непрерывным слоем клеток, либо прерывистым слоем, то есть с отдельными фрагментами, где присутствует только синцитиотрофобласт на базальном слое эпителия. Большинство ворсин называются «плавающими», поскольку они заканчиваются дистальными ветвями в межворсинчатом пространстве. Особый интерес для данного исследования представляют более редкие ворсины, которые непосредственно соприкасаются с эндометрием, т.е. с материнской тканью, и придают механическую устойчивость растущему ворсинчатому дереву, поэтому они названы «якорными ворсинами».

В большинстве якорных ворсин видны несколько зон распространения цитотрофобласта. Первая из них - плотная группа этих клеток вблизи основания ворсины. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 2А), видны последующие слои инвазии, распространение цитотрофобласта вглубь эндометрия с постепенным его разрежением и проникновением между децидуальными клетками. В сроке гестации 7-8 недель п.о. наблюдалось большое количество ворсин с признаками цитотрофобластической инвазии (рис. 2А). В месте прикрепления их к эндометриальной ткани заметны пролифераты. Однако, не во всех якорных

А

Б

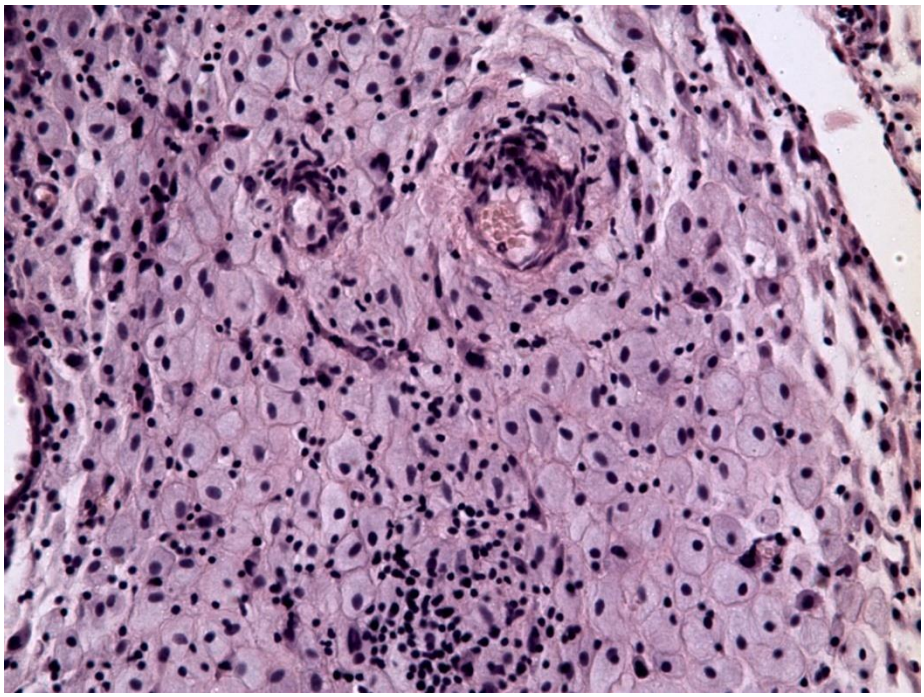
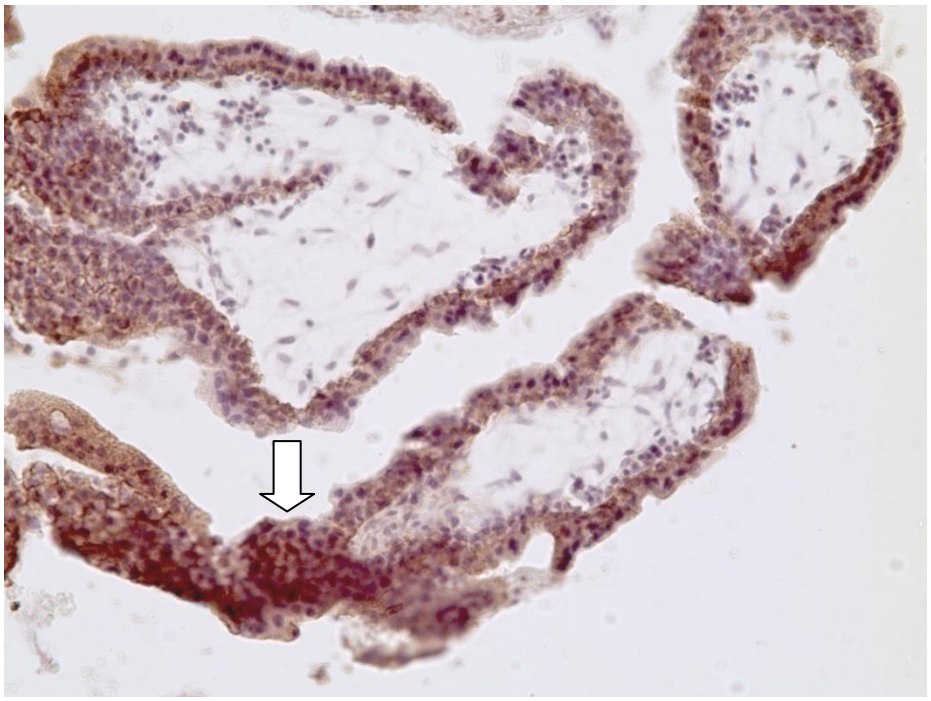


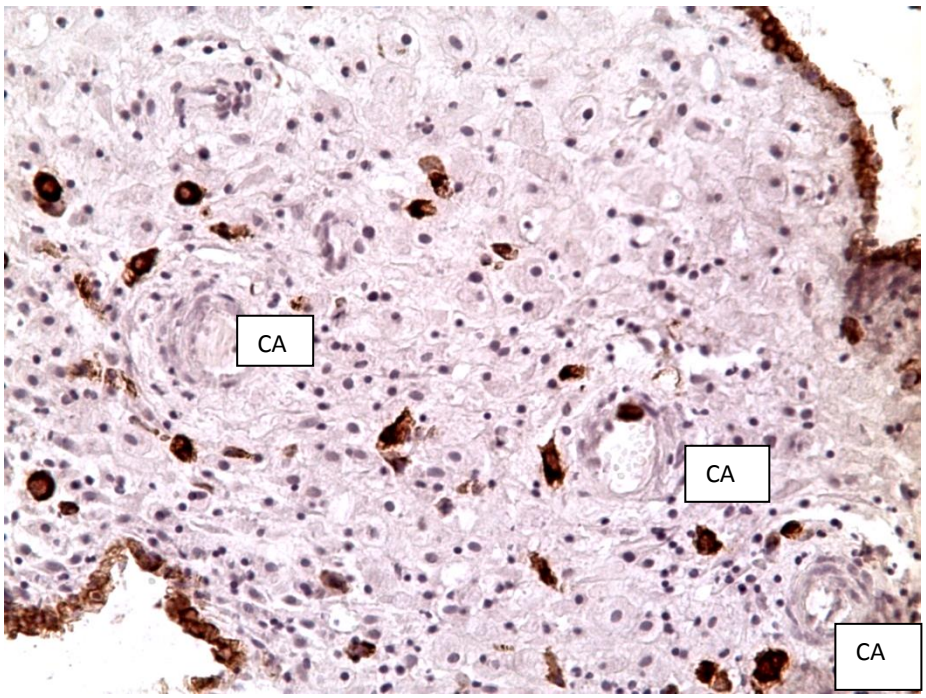
Рис. 2 Медицинский аборт на 7-8нед. п.о. : А - Якорные ворсины (←↑) х100 , Б –Узкие спиральные артерии эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

ворсинах чётко видны 4 слоя цитотрофобласта, что вероятно отражает разные начальные стадии ЦТИ. Это подтверждается узкими просветами спиральных артерий и лишь приближением ИЦТ и МГК к адвентиции этих артерий, где фиксируются первые признаки гестационной перестройки их стенок (рис. 2Б).

Окраска срезов гематоксилином и эозином не позволяет в полной мере оценить картину цитотрофобластической инвазии. Можно лишь ориентировочно говорить о скоплении вытянутых веретеновидных клеток вокруг артерий, о постепенном истончении стенок спиральных артерий, замещении эластомышечных элементов ткани оксифильным фибриноидом, но сам процесс перестройки остается неясен. Для этой цели подходит иммуногистохимическое исследование с маркером к цитокератину (в нашем случае цитокератин-8), с помощью которого хорошо визуализируются все формы инвазивного цитотрофобласта (рис. 3А). Использование этого иммуномаркера также дает большую наглядность различной плотности распределения одноядерных инвазирующих клеток на дистанции от ворсинчатого цитотрофобласта до глубоких отделов эндометрия и позволяет более полно охарактеризовать ЦТИ в целом.



А



Б

Рис. 3 Медицинский аборт на 7-8 нед: А- Якорная ворсина с пролифератами цитотрофобласта (↓). Б- МГК достигают адвентиции извитой спиральной артерии (СА), начало её гестационной перестройки., маркер - цитокератин-8, п.о х200**.**

3.1.2 Количество и размеры инвазивных элементов в стандартной площади среза в 7-8 недель (п.о,)

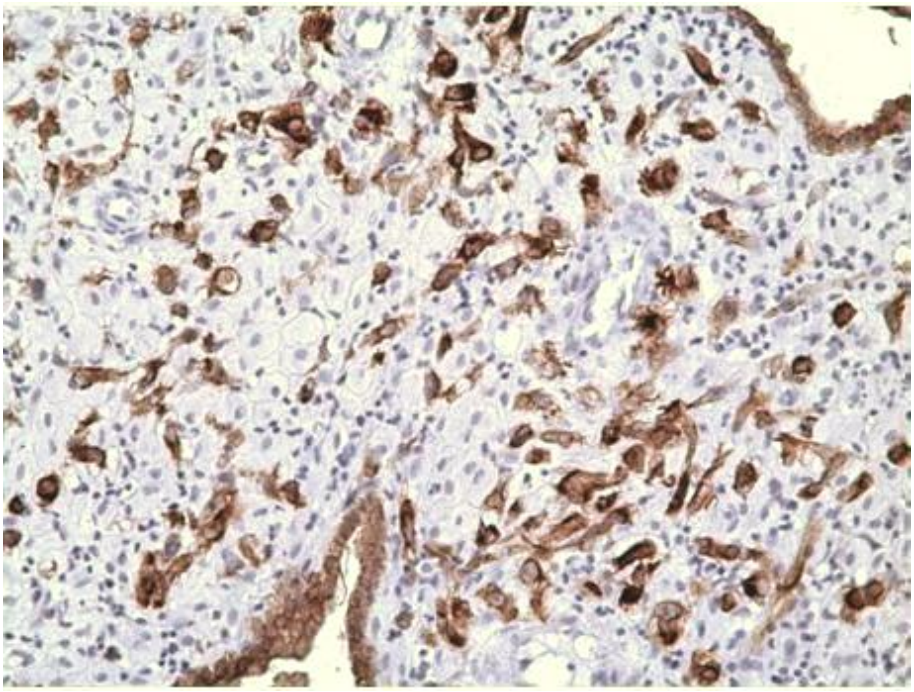
При изучении микропрепаратов с применением маркера цитокератин-8,хорошо видно, что интерстициальный одноядерный цитотрофобласт приближается и проникает в стенку артерий. Некоторые клетки выходят на линию эндотелия, замещая его в отдельных местах. Многоядерные клетки также достигают адвентиции спиральных артерий, но не проникают в их стенки (рис. 3Б). В целом, плотность распределения двух типов инвазивных клеток в сроке гестации 7-8 недель п.о. достаточно велика, с явным преобладанием интерстициального цитотрофобласта (табл. 2), (рис. 4А,Б). Сравнение 1 и 2 групп по методу Стьюдента и Манна-Уитни, значимых различий между ними не выявило ($p<0,05$). Следует подчеркнуть вариабельность расположения инвазирующих клеток, что зависит от разной удаленности исследуемого поля зрения от оснований якорных ворсин.

Таблица 2

Абсолютное количество инвазивных клеток в стандартном поле зрения.

Срок гестации (п.о.)	Многоядерные гигантские клетки (МГК)	Интерстициальный цитотрофобласт (ИЦ)
7-8 недель	14,80 (8,88-20,71)	248,80 (184,76-312,84)
9-12 недель	13,21 (10,62-15,80)	273,11 (245,30-300,91)
	$p>0,05$	$p>0,05$

А



Б

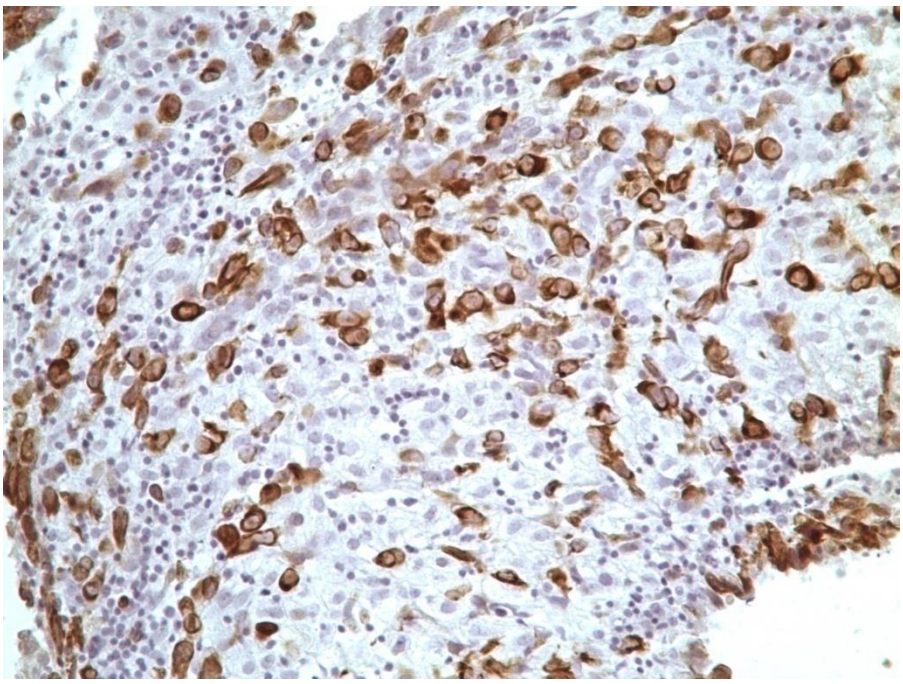


Рис. 4 Большое количество различных форм цитотрофобласта в стандартной единице площади: А- медицинский аборт на 7-8 нед. п.о.: значительное количество ЦТ и МГК. Б – медицинский аборт на 9-12 нед. п.о.: преобладание интерстициального ЦТ**,** маркер -цитокератин-8, х200.

Форма и величина интерстициального цитотрофобласта весьма разнообразны, они зависят от плоскости среза, проходящего через ядро или вдоль клетки. Величина поперечного диаметра же при срезе, проходящем через ядро, наоборот, менее вариабельна и позволяет точнее оценить истинные размеры клетки. Диаметр интерстициального цитотрофобласта в самом раннем из исследованных нами сроков минимален (табл. 3).

Таблица 3

Размер поперечного диаметра инвазивных клеток.

Срок гестации	Многоядерные гигантские клетки (МГК) (μм)	Интерстициальный цитотрофобласт (ИЦ) (μм)	Количество измеренных клеток (МГК/ИЦ) (шт.)
7-8 недель	23,89 (23,10-24,68)	15,74 (15,02-16,46)	(95/115)
9-12 недель	29,65 (28,79-30,52)	21,95 (21,40-22,51)	(220/220)
	$p<0,05^{*}$ **	$p<0,05^{*}$ **	

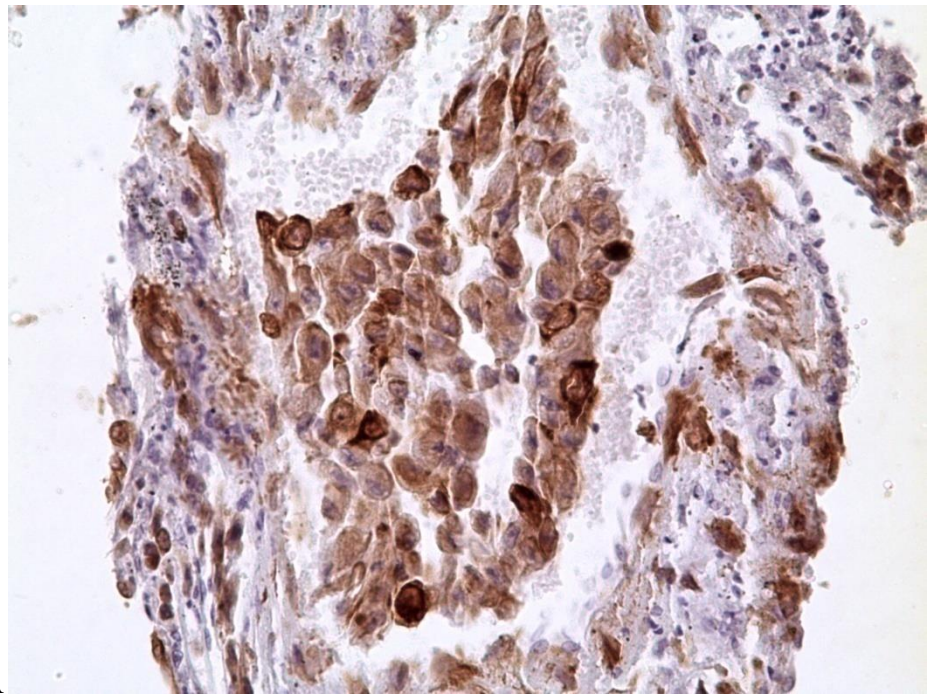
Было проведено сравнение I и II гестационных групп: по Методу Стъюдента* и Манна-Уитни**.

Иными словами, речь идет о начальном этапе цитотрофобластической инвазии с многократным преобладанием мелкого интерстициального цитотрофобласта вдали от оснований якорных ворсин (рис. 4А). Другой инвазивный тип – МГК - встречается в 16-20 раз реже, обычно в более глубоких отделах децидуальной оболочки, составляя около14,80 клеток в стандартном поле зрения (Табл.2). В этих клетках на данном сроке насчитывается 2-3 ядра, они более округлые и крупные, чем одноядерные

интерстициальные клетки. Интерстициальный ЦТ внедряется в стенки спиральных артерий и выявляется на линии эндотелиального слоя с постепенным его замещением. Он проникает сквозь стенку спиральных артерий и активно участвует в лизисе эластического и мышечного компонента стенки артерии. Когда ИЦ проникает в просвет спиральной артерии, эта видоизмененная клетка рассматривается как отдельная форма инвазивного цитотрофобласта – эндоваскулярный цитотрофобласт (ЭВТ) (Рис. 5А,Б). Лизис стенки артерий не единственная его функция. В течение 7-8 недель гестации(п.о.) «пробки» из ЭВТ перекрывают просветы спиральных артерий. Эта структура носит название «цитотрофобластическая пробка» (Рис. 5). На рисунке 5 представлена микрофотография спиральной артерии, просвет которой почти полностью перекрыт скоплением клеток, позитивных по маркеру цитокератин-8. Создается неправильное впечатление, что ЭВТ рыхло и свободно располагается в просвете спиральной артерии. При тщательном просмотре микропрепаратов изредка были видны выросты ИЦТ в просветы артерий, которые продолжались далее как «цитотрофобластические пробки».

Следовательно, на 7-8-ой нед. гестации с помощью иммуномаркера цитокератин-8 выявляются все три типа инвазивных клеток с явным преобладанием ИЦТ, небольшим количеством МГК, а также ЭВТ в составе инвазирующих клеток, перекрывающих просветы спиральных артерий и затрудняющих проникновение материнской крови в межворсинчатое пространство плаценты. Важно подчеркнуть, что в этом гестационном сроке начинается синхронное воздействие на стенки спиральных артерий: извне – ИЦТ с разрушением эластического каркаса и мышечных элементов, изнутри – ЭВТ с полным замещением эндотелия.

А



Б

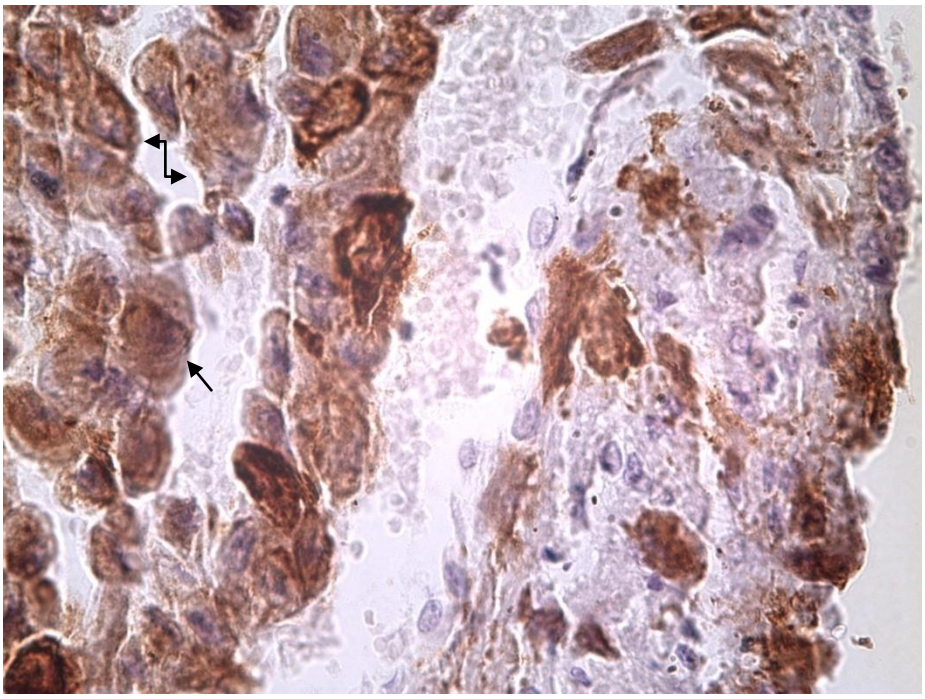


Рис. 5 Медицинский аборт на 7-ой нед. п.о, иммуномаркер - цитокератин-8: А-Группа ЭВТ в просвете спиральной артерии (цитотрофобластическая пробка), х200; Б- фрагмент предыдущего снимка, видны соединения между отдельными клетками (←) в составе пробки, х400.

3.1.3. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в сроке гестации 7-8 недель п.о.

Чтобы оценить функциональную активность инвазивных клеток, в частности степень экспрессии различных ферментов маркер цитокератин-8 не подходит, так как интенсивность его экспрессии не зависит от функциональной активности клетки. С этой целью использованы антитела против синтезированных этими клетками металлопротеиназ и бальная оценка их иммуноэкспрессии (см. раздел 2). Данные этого исследования отражены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Интенсивность иммуноэкспрессии ММР-2

Срок гестации (п.о.)	Интенсивность окрашивания (в баллах) в зависимости от типа клеток		
	ИЦТ	МГК	ЭВТ
7-8 недель	1,81 (1,65-1,98)	1,42 (1,24-1,61)	3,0
9-12 недель	2,08 (1,95-2,20)	1,52 (1,41-1,64)	2,93 (2,87-2,99)
	$p<0,05^{**}$		

Различия между группами I и II достоверны (t-критерий Стьюдента*, (критерий Манна-Уитни**).

Из табл. 4 видно, что ведущим элементом цитотрофобластической инвазии, в том числе и по экспрессии металлопротеиназы 2 типа является эндоваскулярный цитотрофобласт. На сроке 7-8 нед. интенсивность её иммуноэкспрессии близка к максимальной. Функциональная активность интерстициального цитотрофобласта намного ниже, чем ЭВТ, показатель многоядерных гигантских клеток ниже, чем ИЦТ, но превышает минимальное значение (рис. 6А).

Таблица 5

Интенсивность иммуноэкспрессии ММР-9

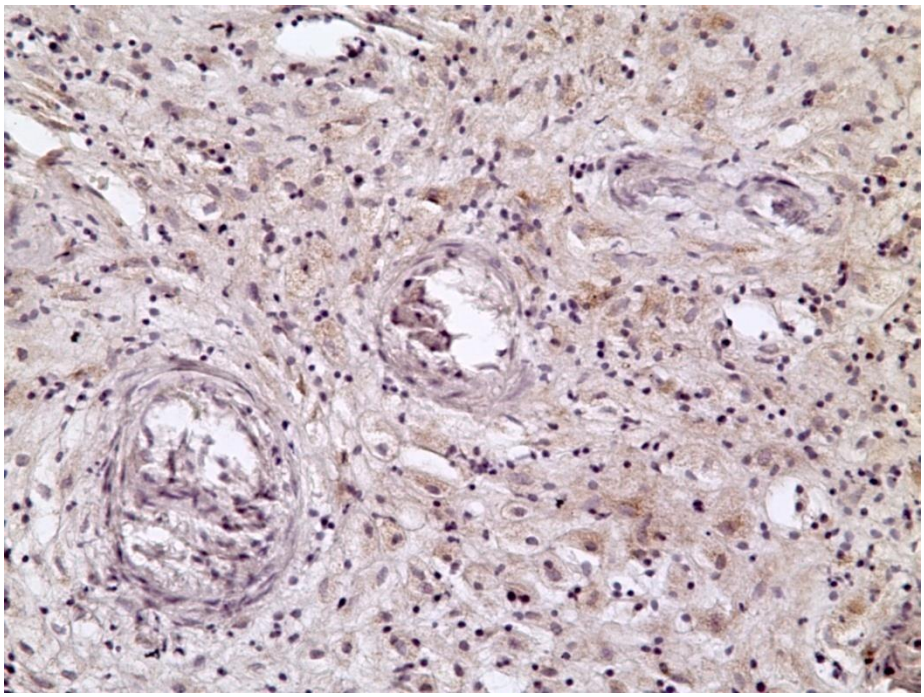
Срок гестации(п.о.)	Интенсивность окрашивания (в баллах) в зависимости от типа клеток		
	ИЦТ	МГК	ЭВТ
7-8 недель	≈1,0 (минимальная)	≈1,0 (минимальная)	2,47 (2,34-2,60)
9-12 недель	1,27 (1,19-1,35)	1,04 (1,00-1,07)	2,68 (2,56-2,80)
	p<0,05* **		p<0,05* **

Различия между группами I и II достоверны (t-критерий Стьюдента*, (критерий Манна-Уитни**). (

Данные по оценке функциональной активности инвазивных клеток в отношении синтеза металлопротеиназы 9 типа несколько иные. Из табл. видно, что ведущим протеолитическим элементом инвазии на сроке 7-8 недель п.о. является эндоваскулярный цитотрофобласт. На протяжении данного срока гестации интенсивность его иммуноэкспрессии металлопротеиназы 9 типа максимальна. Соответствующий показатель интерстициального цитотрофобласта, наоборот, минимальный, он соответствует по интенсивности окраске окружающей ткани (рис. 6Б). Многоядерные гигантские клетки малоактивны, интенсивность их окраски соответствует окраске децидуальных клеток.

Таким образом, становится ясно, что эндоваскулярный цитотрофобласт наиболее активно экспрессирует протеолитические ферменты, в частности металлопротеиназы 2 и 9 типов. Именно он играет решающую роль в

А



Б

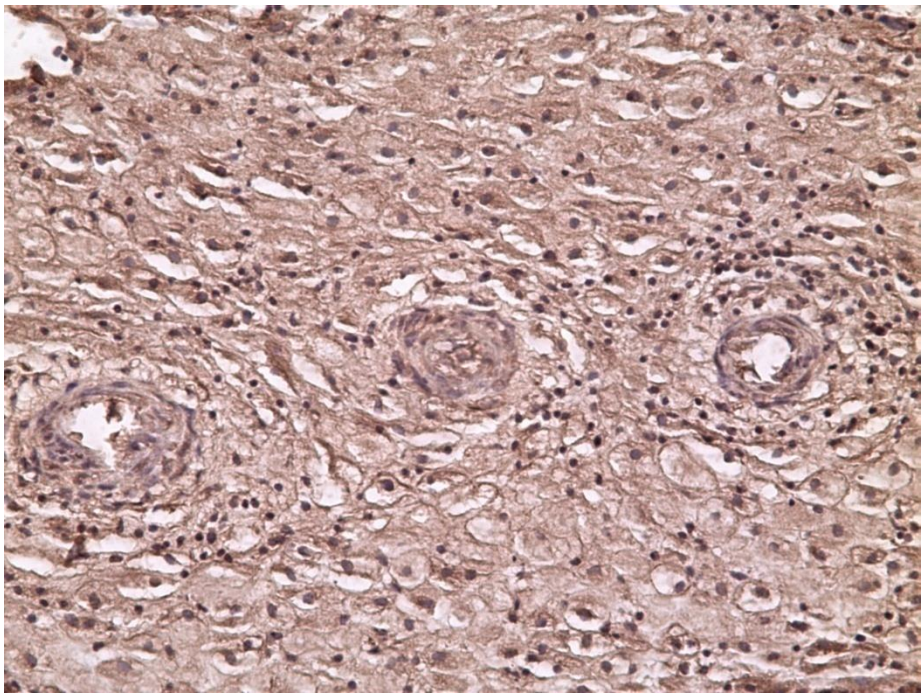


Рис. 6 Медицинский аборт 7-8 нед. х200

А – минимальная экспрессия ММР-2 без выявления инвазивных клеток.

Б – слабая экспрессия ММР-9 в децидуальных и инвазивных клетках.

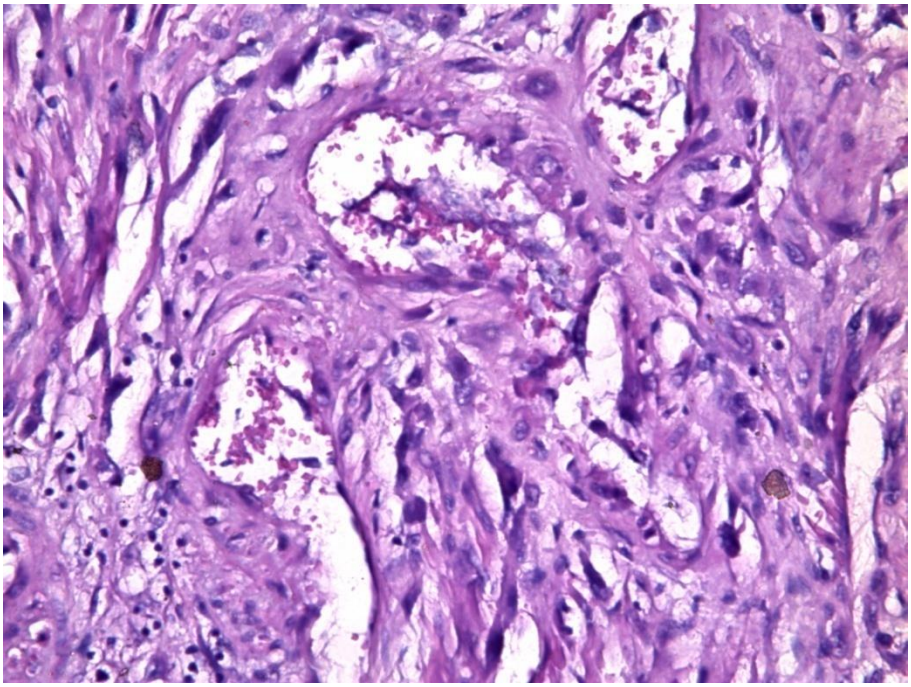
гестационной перестройке стенки спиральных артерий в пределах эндометрия, воздействуя на них со стороны просвета артерии. В отношении интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток можно сказать, что на ранних сроках гестации преобладает синтез металлопротеиназы 2 типа над металлопротеиназой 9 типа. Многоядерные клетки функционально менее активны, чем одноядерные.

3.1.4. Перестройка эндо- и миометриальных сегментов маточно-плацентарных артерий на сроке гестации 9-12 недель п.о.

К этому сроку в ворсинах плаценты различают первый и второй уровни ветвления, присутствует множество боковых и промежуточных ветвей. В опорных ворсинах артериола и венула обычно располагаются в центре стромы. Происходит смещение капилляров к периферии и одновременно трансформация их эпителия. Ворсины становятся более крупными, с большой площадью сечения стромы, расширяются просветы капилляров.

В конце I триместра беременности количество интерстициального цитотрофобласта в стандартной площади маточноплацентарной области достигает максимума - 273 клетки (рис.4В) (табл.2), в диапазоне от 245 до 300 клеток в стандартном поле зрения. Он распределен неравномерно, инвазивные клетки проникают в виде цепочек или цугов вглубь децидуальной оболочки через зону гибнущих эндометриальных желез, концентрируется вокруг сосудов и выявляются в просветах видоизмененных спиральных артерий (рис. 7А,Б). Цитотрофобластические пробки на этом сроке имеют рыхлую структуру, они не полностью перекрывают просвет артерий. Это создает возможность проникновения небольших порций материнской крови через частично обтурированные пробками сосуды в межворсинчатое пространство плаценты. Количество интерстициального цитотрофобласта (рис. 8А) и многоядерных гигантских клеток (рис. 7Б) в стандартном поле зрения существенно не изменилось ($p<0,05$) (рис. 4Б), (табл. 2).

А



Б

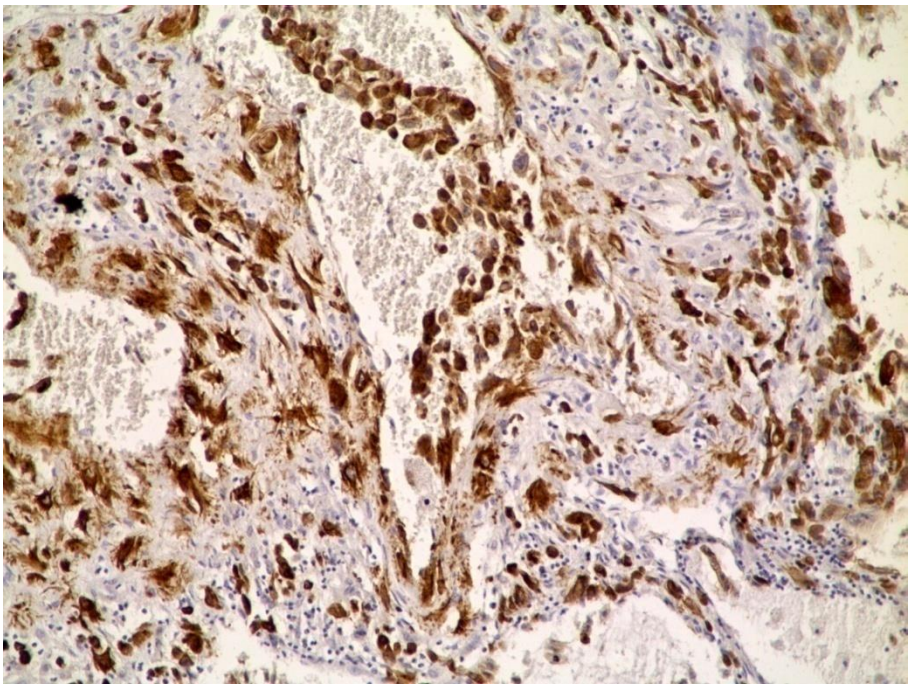
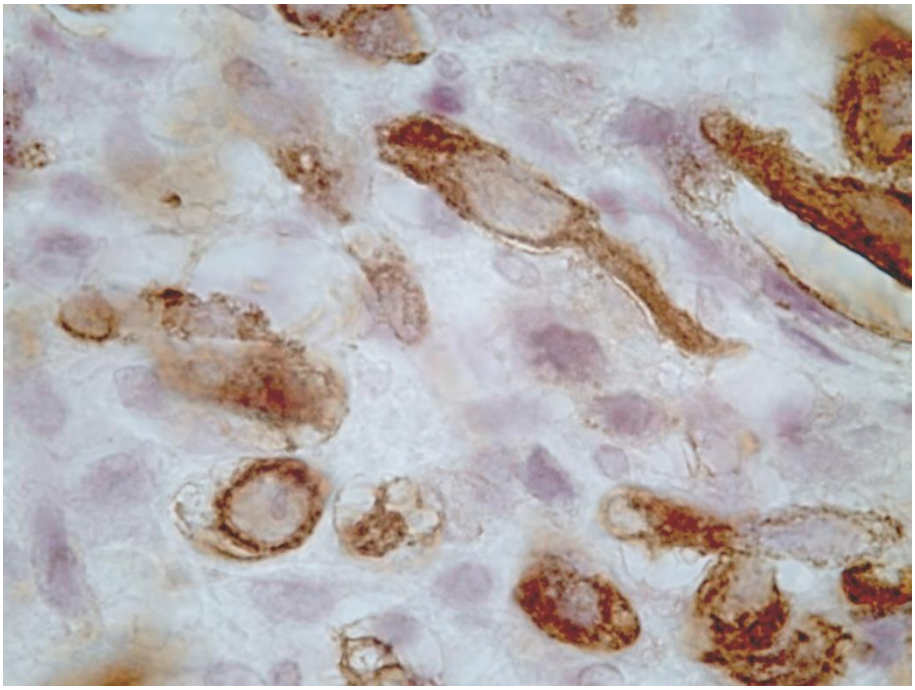


Рис. 7 Медицинский аборт на 9 нед.:

А-Увеличение просвета спиральной артерии в результате перестройки её стенки; ИЦТ с стороны адвентиции и ЭВТ - изнутри. Окраска гематоксилином и эозином; Б-Концентрация иммуновизуализированных ИЦТ и ЭВТ вокруг и внутри спиральной артерии, иммуномаркер - цитокератин-8. х100

А



Б

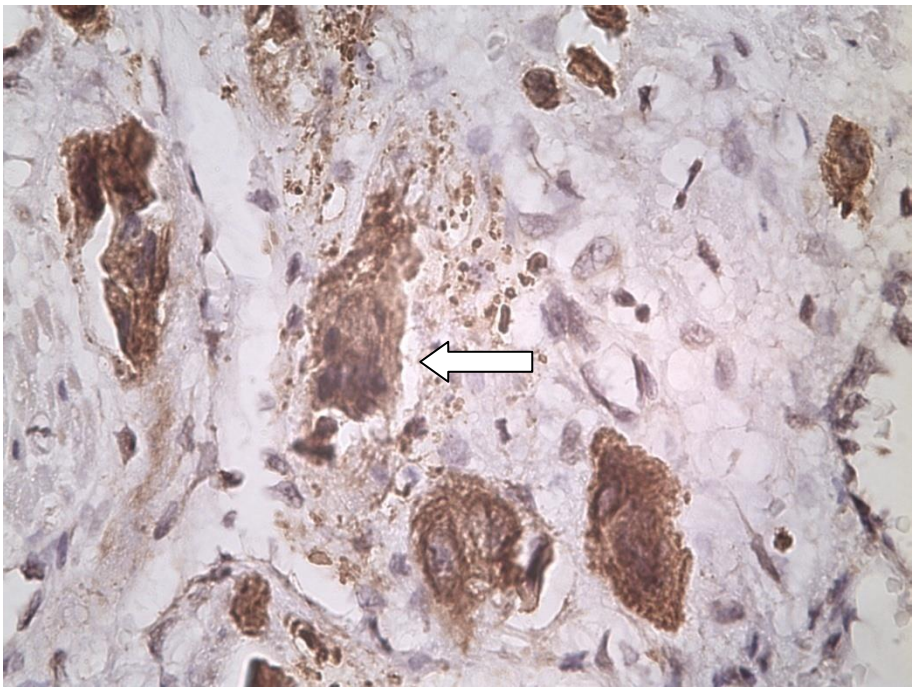


Рис. 8 Медицинский аборт на 10 нед: А-увеличение размеров интерстициального цитотрофобласта за счет ядра и цитоплазмы; Б-увеличение числа ядер (→) и размеров многоядерных гигантских клеток**,** иммуномаркер - цитокератин-8, х400.

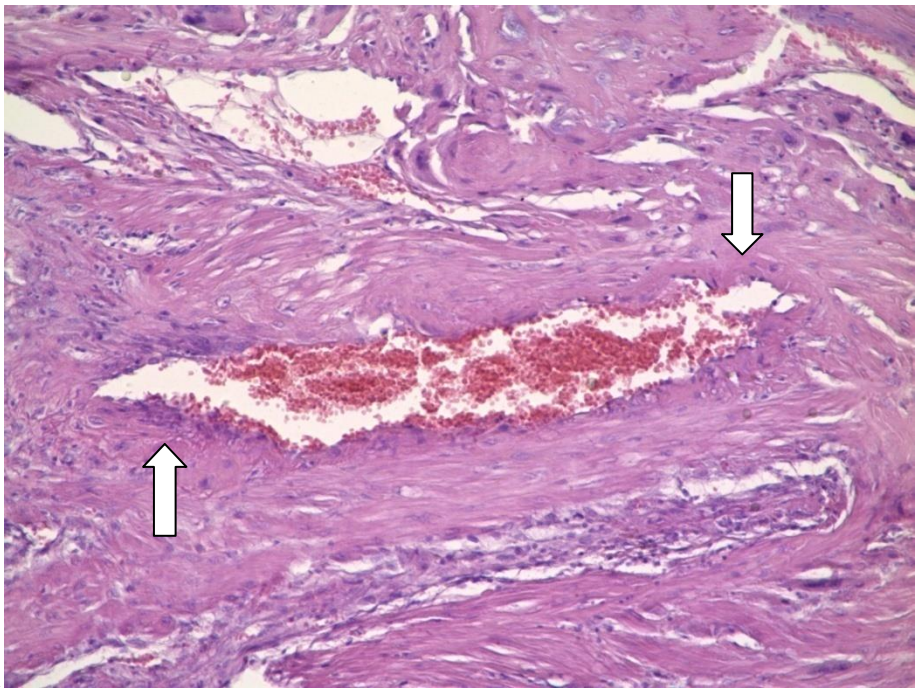
Наблюдается статистически значимое $p<0,05$ увеличение размеров ИЦТ (рис. 7Б), (табл. 3).

Изучение плацентарного ложа двенадцати удаленных маток в этом гестационном сроке существенно дополнило вышеописанную картину цитотрофобластической инвазии. При относительном сходстве количественного распределения и размеров инвазивных клеток в составе децидуальной оболочки (медицинские аборты), в ампутированных матках регистрируется начало гестационной перестройки более глубоко расположенных радиальных артерий, уже в прилегающих пучках миометрия (рис. 9А). По наличию материнских эритроцитов в радиальных артериях можно говорить о кровотоке в них в дистальном направлении, то есть через спиральные артерии в межворсинчатое пространство. Иммуновизуализация инвазивных клеток (маркер цитокератин-8), подтверждает проникновение интерстициального и внутрисосудистого цитотрофобласта в зону радиальных артерий (Рис. 9Б), которые уже имеют более широкий просвет,чем радиальные артерии вне плацентарного ложа матки. На границе эндометрия и первых пучков миоцитов наблюдается концентрация интерстициального цитотрофобласта и МГК, которые уже достигают адвентиции более крупных радиальных артерий, но не проникают ещё в их стенки.

3.1.5.Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в инвазирующих клетках на 9-12 нед. п.о.

Данные по оценке интенсивности иммуноэкспрессии металлопротеиназы 2 типа отражены в табл. 4. Из неё видно, что ведущим элементом инвазии по показателю содержания ММР-2 в клетках является эндоваскулярный цитотрофобласт (рис. 10А). Интенсивность окрашивания его в этом сроке близка к максимальной. Аналогичный показатель в остальных элементах цитотрофобластической инвазии также возрастает, достигая достоверности в отношении ИЦТ (табл. 4).

А



Б

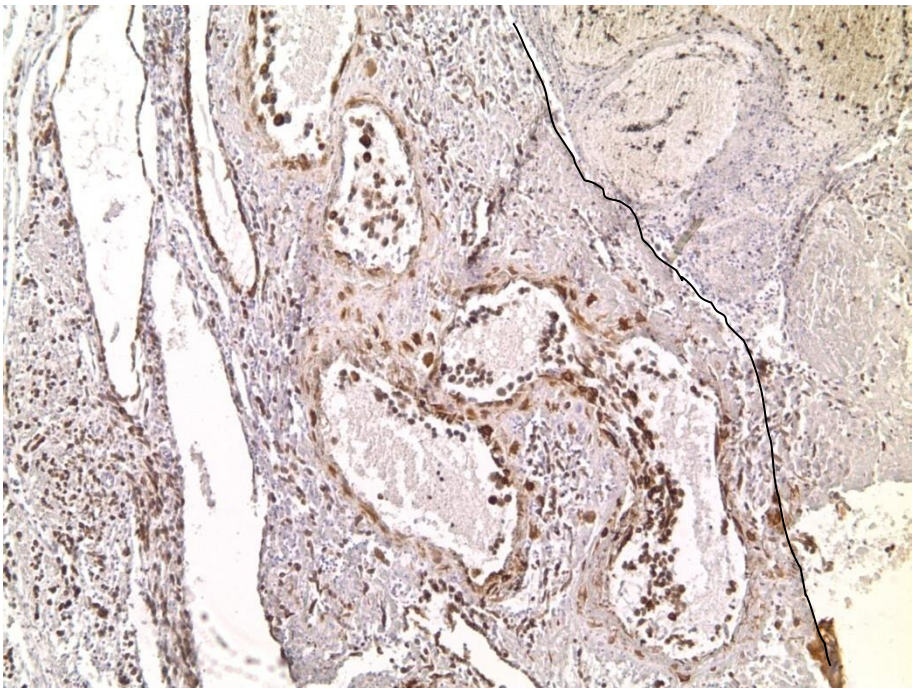
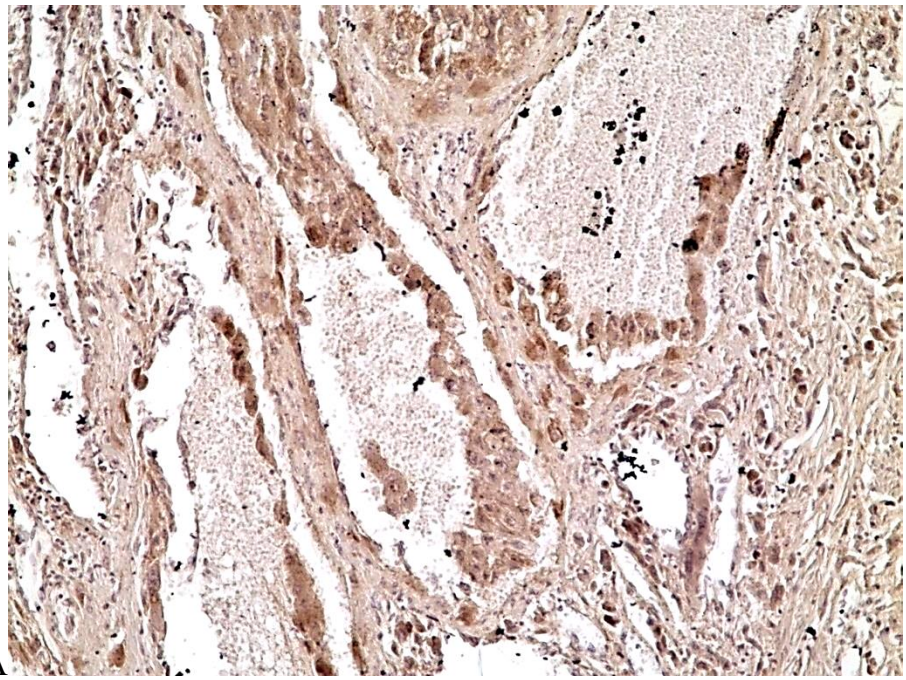


Рис. 9 Ампутированная матка на 11-ой нед. гестации: А – среди мышечных пучков видна радиальная артерия с эритроцитами в просвете и приближением инвазивных клеток к её стенке (↑↓), гематоксилин-эозин, х50; Б – иммуновизуализация интерстициального и внутрисосудистого ЦТ вокруг и внутри расширенной артерии. Линией обозначена условная граница между эндометрием (слева) и миометрием (справа), иммуномаркер - цитокератин-8. Х100.

Данные по оценке интенсивности иммуноэкспрессии с использованием маркера металлопротеиназы 9 типа элементов цитотрофобластической инвазии на сроке 9-12 недель п.о. в случаях неосложненной беременности отражены в таблице 5. Из неё видно, что ведущим элементом инвазии по показателю функциональной активности клеток по-прежнему является эндоваскулярный цитотрофобласт (рис. 9А,Б). На этом сроке беременности интенсивность его экспрессии ММР-9 достоверно выше, чем в предыдущей гестационной группе (рис. 10Б). Показатель для интерстициального вневорсинчатого цитотрофобласта достоверно увеличился. Многоядерные гигантские клетки по-прежнему малоактивны.

Итак, для первой волны ЦТИ характерны начальная, а затем полная гестационная перестройка спиральных артерий за счет максимальной плотности распределения в стандартном поле зрения МПО интерстициального цитотрофобласта при достоверном приросте его размеров и умеренной иммуноэкспрессии ММР-2 и слабой - ММР-9. Максимальной протеолитической активностью обладает ЭВТ как в отношении ММР-2, так и ММР-9. Новым интересным фактом становится продвижение инвазивных клеток в миометрий, к радиальным артериям, преимущественно за счет интерстициального ЦТ и МГК при небольшом количестве ЭВТ.

А



Б

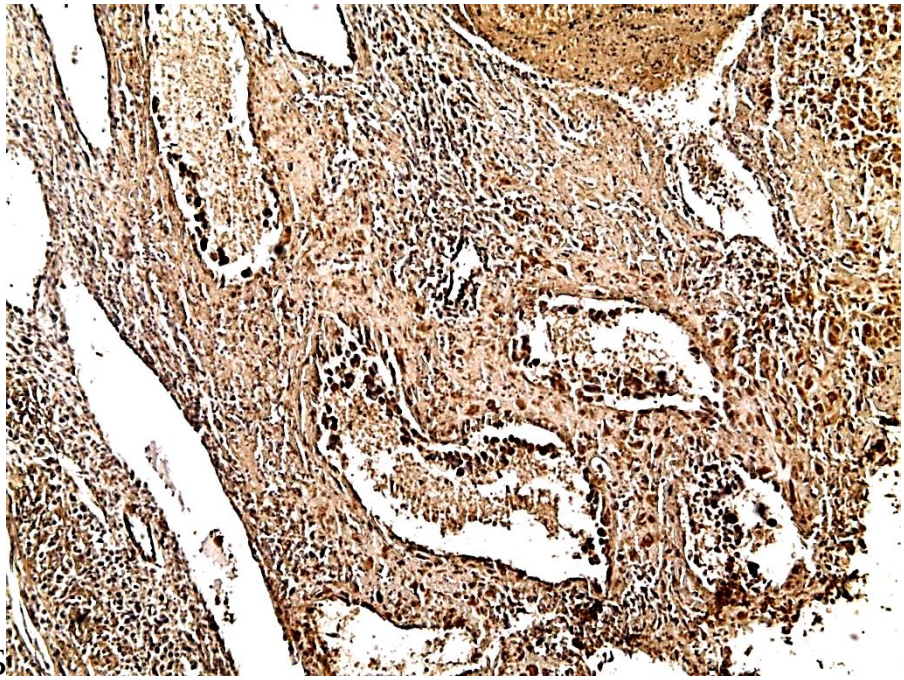


Рис. 10. Ампутированные матки на 9-12 нед. п.о.,:

А - Выраженная иммуноэкспрессия ММР-2 в эндоваскулярных клетках.

Б - Выраженная иммуноэкспрессия ММР-9в эндоваскулярных клетках. х50

3.2. Особенности цитотрофобластической инвазии и металлопротеиназной активности её элементов в течение II триместра беременности

Второй триместр – наиболее сложный гестационный отрезок для изучения ЦТИ, поскольку накопить подобные наблюдения достаточно сложно. Единственным выходом стало изучение т.н. поздних медицинских абортов по медико-социальным показаниям с помощью внутривенного введения «энзапроста», который стимулировал родовую деятельность и вызывал быстрые самостоятельные роды. В этих плацентах особое внимание обращалось на микроскопию базальной пластинки, т.е. место анатомического контакта ворсин и материнского эндометрия. Кроме того, в целях изучения видов инвазирующего ЦТ и их распределения использовались 5 ампутированных маток (табл.1).

3.2.1. Источники ЦТИ во II триместре беременности

Для характеристики продолжения цитотрофобластической инвазии во IIтриместре неосложненной беременности были изучены базальные пластины и прикрепленные к ним якорные ворсины в промежутке от 18 до 28 недель. Анализировались три варианта якорных ворсин (ЯВ): 1) с максимальной, 2) средней и 3) минимальной активностью цитотрофобласта (ЦТ) из их оснований и глубиной его инвазии (подробно – в главе 2).

18-20 нед. В этом периоде доминировали свободные или «плавающие» ворсины разного калибра с однослойным эпителием и редко расположенным ворсинчатым ЦТ. Характерной особенностью их строения были многочисленные стромальные каналы, ограниченные длинными отростками фибробластов; в их просветах были видны крупные плацентарные макрофаги или клетки Кащенко-Гофбауэра. ЯВ имели такое же строение как и большинство ворсин, то есть с наличием плацентарных макрофагов и расширенных капилляров с типичными эритроцитами. МПО представлена прерывистым, преимущественно тонким слоем фибриноида со стороны

межворсинчатого пространства; под ним располагались децидуальные клетки эпителиоидного типа и редкие эндометриальные железы с выраженной деструкцией эпителиоцитов. ЯВ были дифференцированы по степени выраженности выходящего из них ЦТ (табл.6). Оказалось, что на 18-20 нед. п.м. ЯВ с максимальной шириной плотно расположенного ЦТ (рис. 11 А,Б) составляли лишь 20,09% с довольно значительным разбросом значений. Дополнительное количество резервного ЦТ получено за счет распластанных оснований якорных ворсин, либо они имели подковообразную форму, что увеличивало площадь их анатомического контакта с эндометрием. Несколько больше было ЯВ со средней и минимальной активностью ЦТ. Важно подчеркнуть, что эти якорные ворсины – новые генерации, поскольку первые якорные ворсины, бывшие источником ЦТИ в I триместре, иногда встречались в виде «замурованных» ворсин без эпителия и капиллярного русла в строме, как на рис. 11А. Ещё более убедительно процесс инвазии был виден при использовании иммуномаркера цитокератин-8 (рис.12).

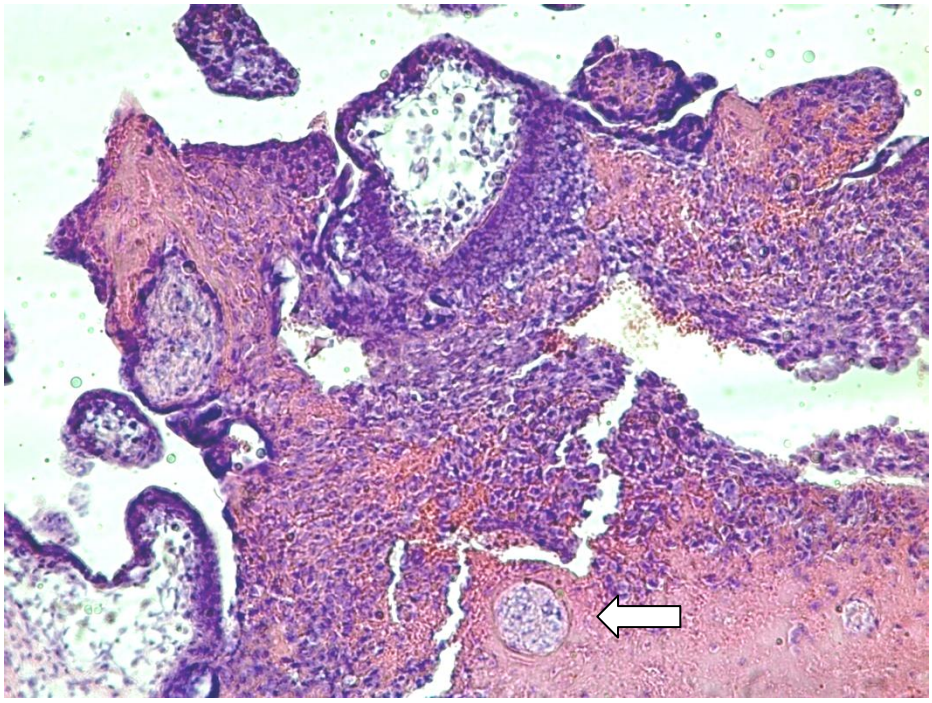
Таблица 6

Оценка якорных ворсин в % по интенсивности и глубине рассеивания цитотрофобласта

Параметры	18-20 недель N=10	22-24 недели N=10	25 -28 недель N=10
Max (максимальная ширина) Средний % по группе	M=20,09 (14,29-25,0)	M=41,12 (35,71-45,45)	M=3,88 (0-7,69)
	P<0,01 *		p<0,001*
Med (средняяширина) Средний % по группе	M= 31,89 (31,90-47,62)	M=24,35 (14,29-33,33)	M=30,60 (15,38-44,44)
	P>0,05		p>0,05
Min (минимальная ширина) Средний % по группе	M=29,65 (23,81-29,65)	M=14,20 (0-20,0)	M=30,30 (11,11-42,86)
	P<0,05*		p>0,05

** - достоверные различия между гестационными группами (показатель Манна-Уитни).

А



Б

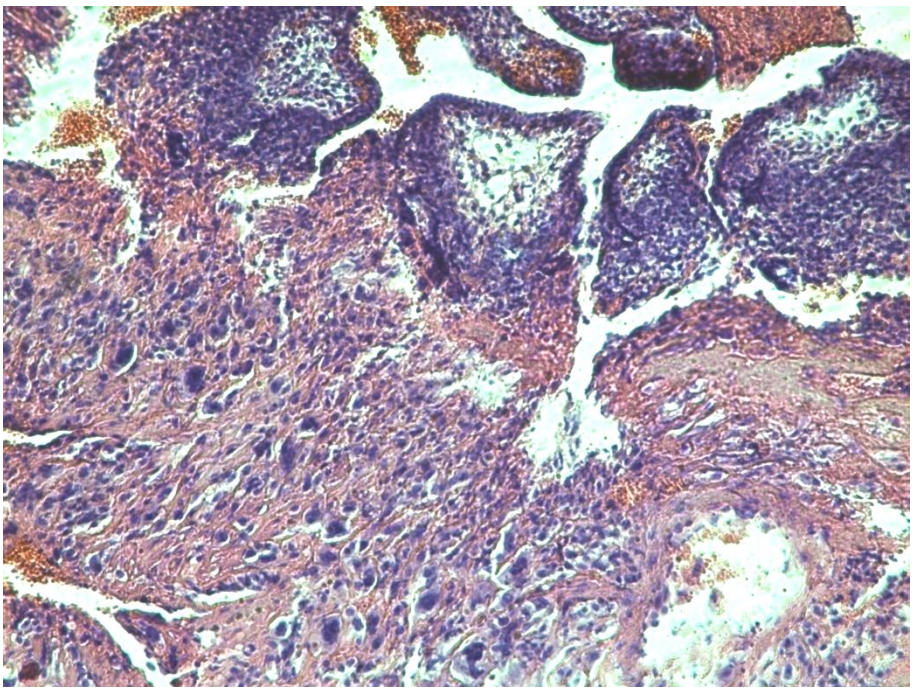
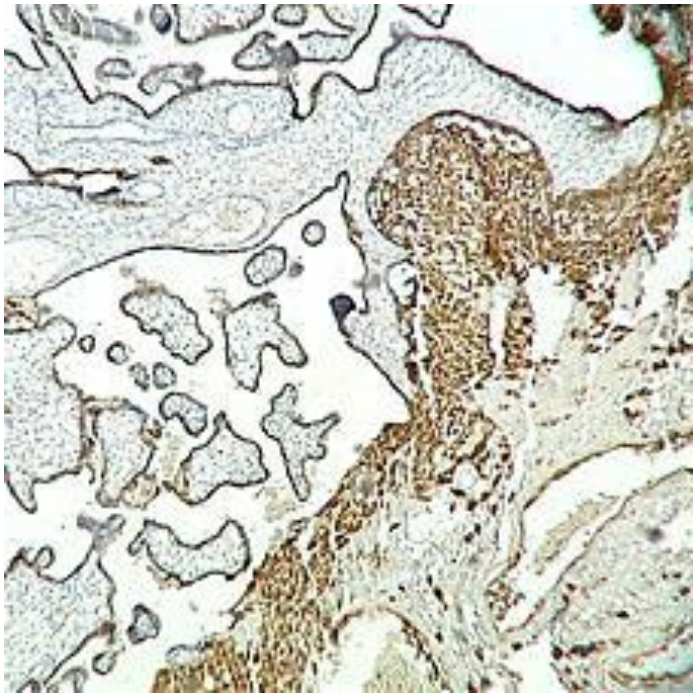


Рис. 11 Базальные пластинки плацент на 18-20 нед. А- в центре ворсина с четкими 1-ой и 2-ой зонами распределения цитотрофобласта, внизу – замурованная ворсина (→). Б – Четыре близко расположенных якорных ворсины с 1-ой,2-ой и 3 зонами инвазии, .Гематоксилин-эозин. Х100.

А



Б

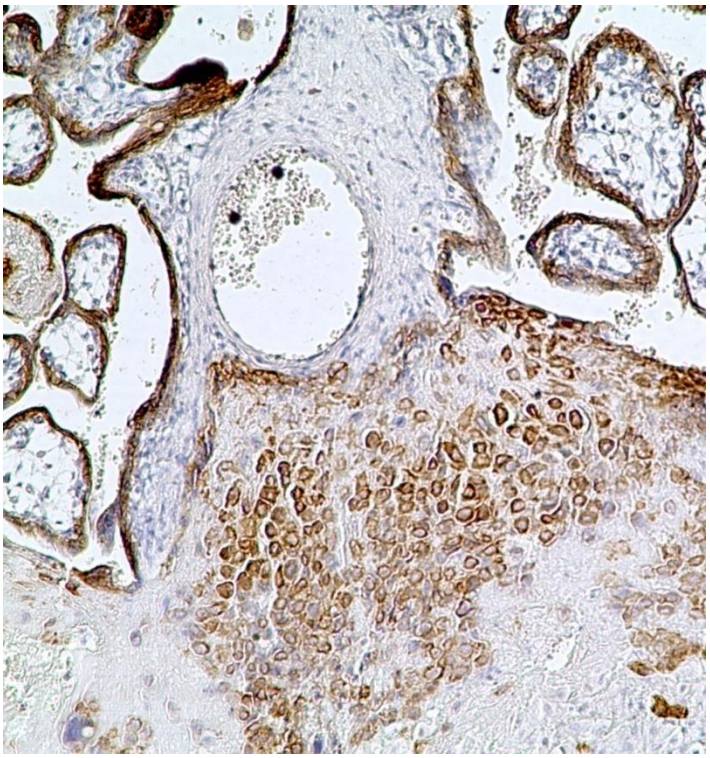


Рис.12 Базальные пластинки плацент на 18-20 нед. Иммуновизуализация инвазирующего цитотрофобласта из оснований якорных ворсин:

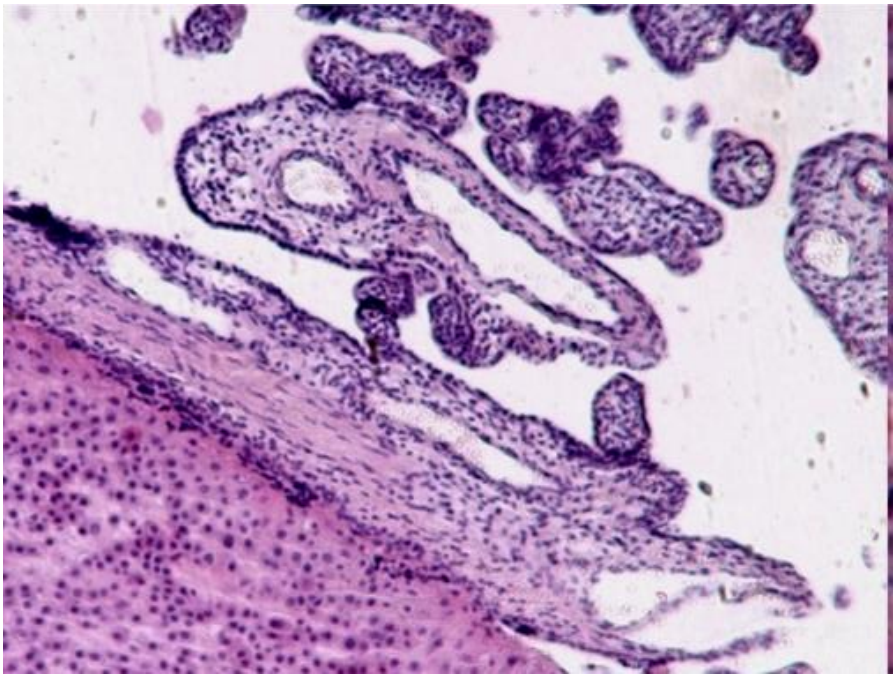
А- подковообразная форма основания якорной ворсины с четко выраженными 1 и 2 зонами. Иммуномаркер - цитокератин-8. х50. Б- такая же по форме ворсина с остатками 1-ой зоны и началом рассеивания 2-ой зоны. Иммуномаркер - цитокератин-8., х100

Важно подчеркнуть, что подобные соотношения интенсивности инвазии ЦТ соответствовали широким сечениям эндометриальных сегментов маточно-плацентарных артерий с включением внутрисосудистого

цитотрофобласта. При иммуногистохимической реакции с цитокератином-8 визуализируются отдельные клетки ЦТ, вторгающиеся в эндотелиальный слой артерий и разрушающие его.

22-24 нед. Морфологическая картина плавающих ворсин изменилась, поскольку в них резко уменьшилось количество стромальных каналов за счет интенсивного созревания и уплотнения фибробластов, экстрацеллюлярного матрикса в строме. Сосудистое русло представлено артериолами и венулами в опорных ворсинах и разветвленной капиллярной сетью в промежуточных ветвях. Указанным изменениям ворсинчатого дерева соответствовали и ЯВ, которые чаще всего были представлены промежуточными и даже опорными ворсинами с адекватной их васкуляризацией. МПО состояла из многочисленных бухт разной глубины с выстилающим слоем фибриноида; в их просветы проникали дистальные ветви ворсин. Изредка встречались другие формы контакта в виде линейного расположения ЯВ вдоль поверхности децидуальной оболочки (рис. 13). На первое место вышли ЯВ с максимальной плотностью ЦТ (табл. 6), когда у основания ворсин четко контурировались несколько слоев ЦТ с последующим его рассеиванием вглубь эндометрия. Их число с высокой статистической достоверностью ($p<0,001$) превышало аналогичный показатель в предыдущей гестационной группе. ЯВ со средней плотностью ЦТ (табл.6) имели лишь тенденцию к уменьшению числа ворсин, в то время как с минимальной плотностью ЦТ стало достоверно меньше. По широким сечениям и полной гестационной перестройке эндометриальных сегментов маточно-плацентарных артерий данные плаценты не отличались от предыдущей группы. Следовательно, больше всего потенциальных источников ЦТИ в ЯВ отмечено в данном гестационном сроке.

А



Б

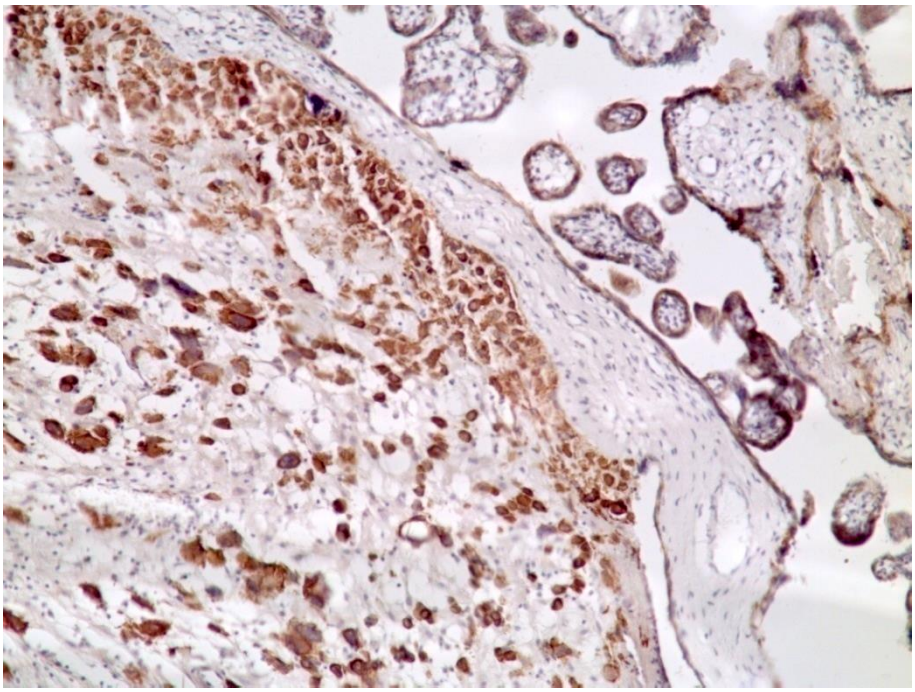
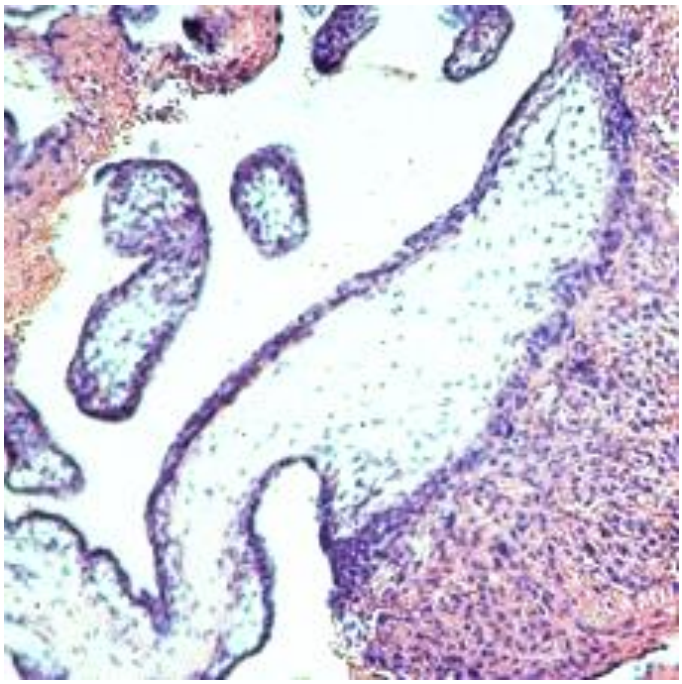


Рис. 13. Базальная пластинка плаценты на 22-24 нед. Линейный контакт якорной ворсины с эндометрием: А –Опорная ворсина с крупными сосудами тесно примыкает к эндометрию с сохранением 1-ой и 2-ой зоны небольшой толщины. Гематоксилин-эозин. . Б – серийный срез. Появление отдельных многоядерных клеток в 3 слое. Иммуномаркер - цитокератин-8. Х200.

А



Б

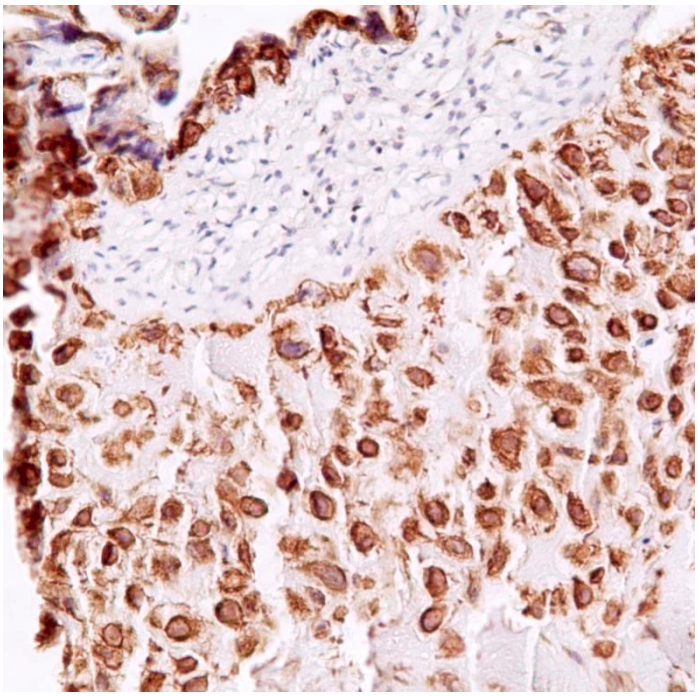


Рис. 14 Базальная пластинка плаценты на сроке 26-28 недель.А-Якорная ворсина со средней степенью ширины пролифератов цитотрофобласта из её основания. Частичное сохранение 1 и 2 зон. Гематоксилин-эозин. Х100. Б – Интенсивное рассеивание цитотрофобласта в 3 зоне. Иммуномаркер - цитокератин-8. Х200.

26-28 нед. Существенной особенностью строения ворсинчатого дерева стало доминирование промежуточных дифференцированных ворсин и появление первых генераций терминальных ветвей. В МПО выявляется непрерывный, ровный и широкий слой фибриноида. При анализе плотности распределения инвазирующего ЦТ из оснований ЯВ оказалось, что соотношения активности ЦТ резко изменились (табл.6) за счет достоверного уменьшения числа ЯВ с максимальной активностью и примерно равным числом ЯВ со средней и минимальной активностью (рис. 14 А,Б). ЯВ со средней активностью ЦТ уже не обладали плотными слоями этих клеток у основания ворсин, но сохраняли относительно равномерное рыхлое распределение инвазирующих клеток на значительную глубину эндометрия. В ворсинах с минимальной активностью ЦТ отмечен непосредственный контакт основания ЯВ со слоем фибриноида и лишь единичным инвазирующим ЦТ. В целом, в конце II триместра отмечается явное уменьшение числа и снижение интенсивности инвазии ЦТ вглубь эндометрия и миометрия, хотя встречались отдельные ЯВ с высокой активностью инвазивных клеток на большом протяжении параллельно идущей ворсины.

Анализируя полученные данные, следует подчеркнуть, что выявленные пики активности ЦТ из оснований ЯВ на 18-20 и, особенно, 22-24-ой нед. (п.м.) соответствуют максимуму интерстициальной и внутрисосудистой инвазии в радиальные артерии матки с перестройкой их стенок и последовательным расширением просветов в пяти ампутированных матках. В этих случаях интерстициальный цитотрофобласт обнаруживался не только в эндометрии, но и в миометрии. Многие радиальные артерии подверглись полной гестационной перестройке, возле них присутствует большое количество многоядерных гигантских клеток.

В конце II триместра количество ЯВ с максимальной активностью ЦТ существенно (в 7 раз) уменьшается при сохранении ворсин со средней активностью ЦТ и явной тенденцией к увеличению числа ЯВ с минимальной

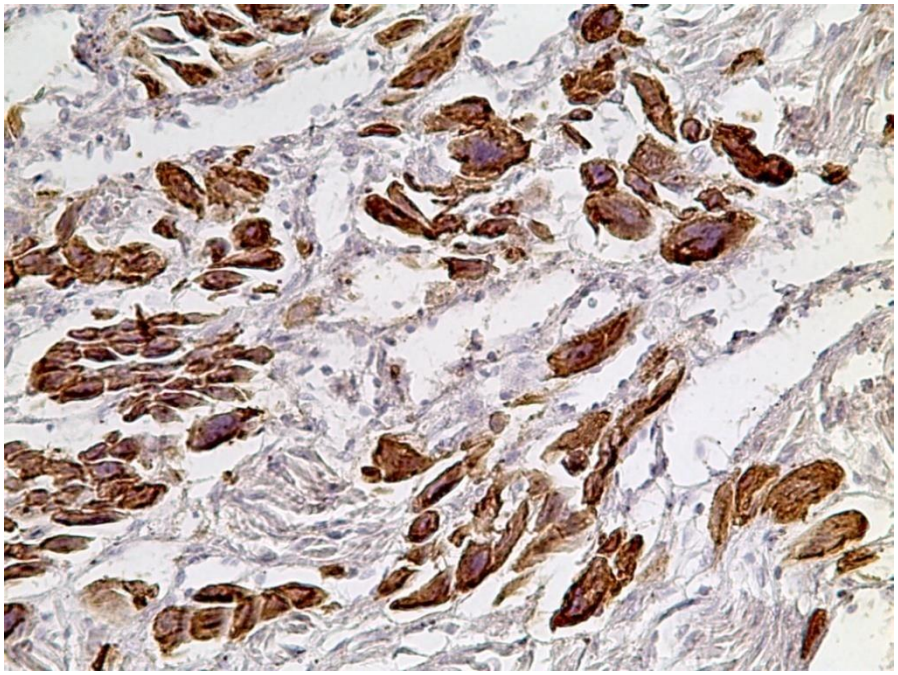
активностью инвазивных клеток. Иными словами, резко уменьшается количество источников инвазирующего ЦТ для проникновения его глубоко в миометрий, в зону радиальных артерий.

3.2.2 Особенности распределения и изменения величины инвазирующих клеток в маточноплацентарной области ампутированных маток на сроке 18 – 25 недель.

Объединив информацию, полученную при изучении МПО в пяти ампутированных матках (табл.1), выявлено снижение плотности распределения основных двух видов инвазивных клеток. Это касалось одновременно и интерстициального ЦТ, который выявлялся в виде небольших групп среди пучков миоцитов. В этих же местах определялись и, в меньшем количестве МГК (рис. 15А). В тех случаях, когда удавалось выявить радиальные артерии, в них четко был виден внутрисосудистый ЦТ, который располагался либо в виде чередующихся клеток в зоне эндотелия или как небольшие пролифераты, выступающие от стенки вглубь артерии (рис. 15Б). Следовательно, в течение II триместра интерстициальный ЦТ и МГК проникают вглубь, за пределы первых пучков миоцитов, и достигают радиальных артерий, расположенных во внутренней трети миометрия. Важно подчеркнуть, что мощным дополнительным механизмом инвазии становится внутрисосудистый ЦТ (рис. 15Б), который выявляется во многих радиальных артериях, частично или полностью замещает выстилающий их эндотелий и способствует расширению их просветов. Чаще всего определяется «двойная» или «встречная» атака интерстициального ЦТ со стороны адвентиции радиальных артерий и со стороны внутрисосудистого ЦТ (рис. 15Б).

Важная информация получена с помощью оценки плотности распределения и диаметров интерстициального ЦТ и МГК (табл. 7). Оказалось, что в период с 3 по 6-ой месяцы гестации интерстициальный ЦТ уменьшил свою плотность распределения (до 70%) в стандартной площади среза при относительно небольшом увеличении его размеров (112,2%). Более

А



Б

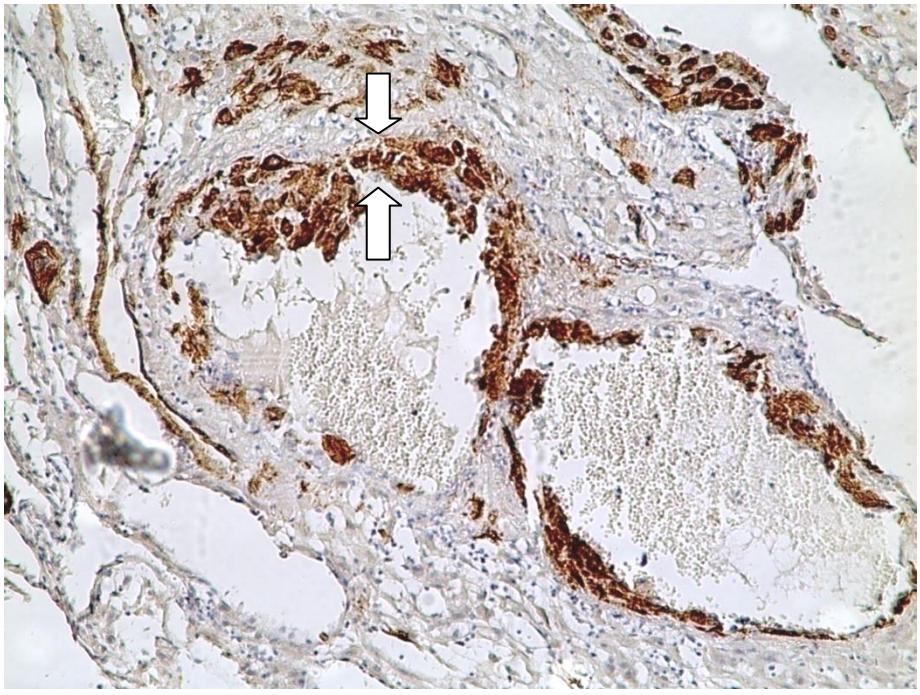


Рис. 15. Распределение отдельных типов инвазивных клеток в маточноплацентарной области. 18-20недель. Иммуномаркер - цитокератин-8. А – группа интерстициального цитотрофобласта и отдельные многоядерные гигантские клетки в прилежащем миометрии. х200. Б – внутрисосудистый цитотрофобласт на линии эндотелия с небольшим пролифератом, выступающим в просвет сосуда. Стрелками обозначено встречное движение ИЦТ и ЭВТ. х100

демонстративной оказалась динамика плотности распределения и диаметров МГК. За истекший гестационный отрезок плотность распределения этих клеток возросла до 186,5% при одновременном увеличении диаметра. МГК отличались от предыдущего срока увеличением количества центрально расположенных ядер (до 20-25) и большим объемом цитоплазмы (рис. 16). При окраске гематоксилином и эозином (рис. 16А) иногда наблюдается слияние отдельных одноядерных интерстициальных клеток в многоядерные. При использовании маркера (цитокератин-8) выявляется либо его интенсивная иммуноэкспрессия в общей цитоплазме, либо неравномерная, когда рядом выявляются клетки с различной иммуноэкспрессией. Иногда возле МГК определяются аналогичные клетки меньшего диаметра с 2-3 ядрами, которые тонким мостиком соединяются с основной МГК. Вероятно, подобные картины отражают динамический процесс слияния нескольких интерстициальных клеток в начале в 2-3х ядерные комплексы, а затем в истинные МГК (рис. 16 А,Б).

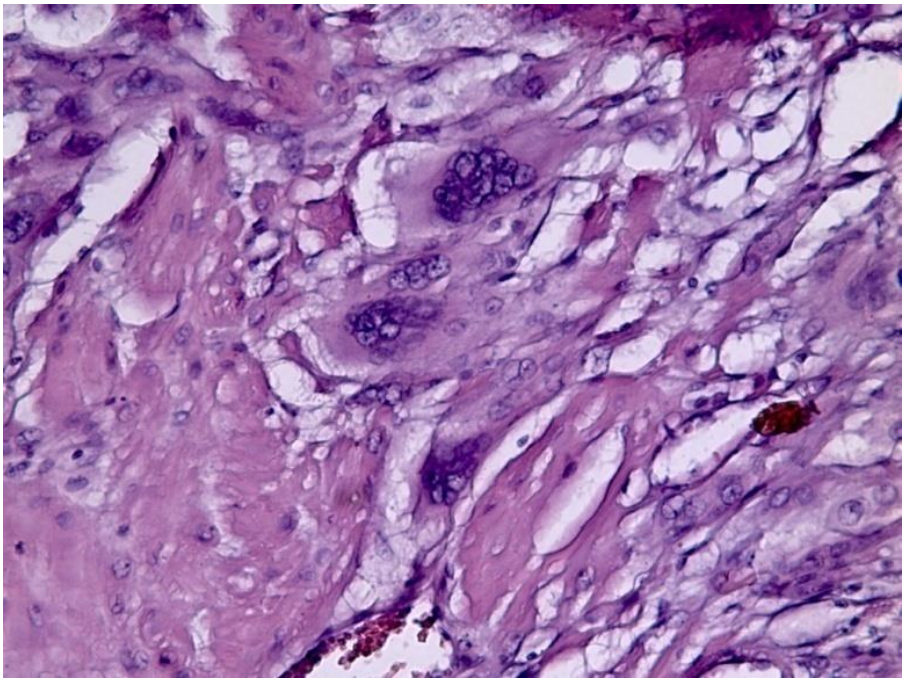
В отношении размеров внутрисосудистого ЦТ, нам не удалось определить его параметры из-за редкости выявления преформированных радиальных артерий.

Таблица 7

Абсолютное количество клеток в стандартной площади среза и размер поперечного диаметра инвазивных клеток (μм) на сроке 18-25 недель

Клетки	Абсолютное количество	Размер поперечного диаметра
ИЦТ	**192,36 (122,02-262,70)**	**24,63 (23,76-25,50)**
МГК	**24,64 (19,23-30,06)**	**39,89 (37,97-41,81)**

А



Б

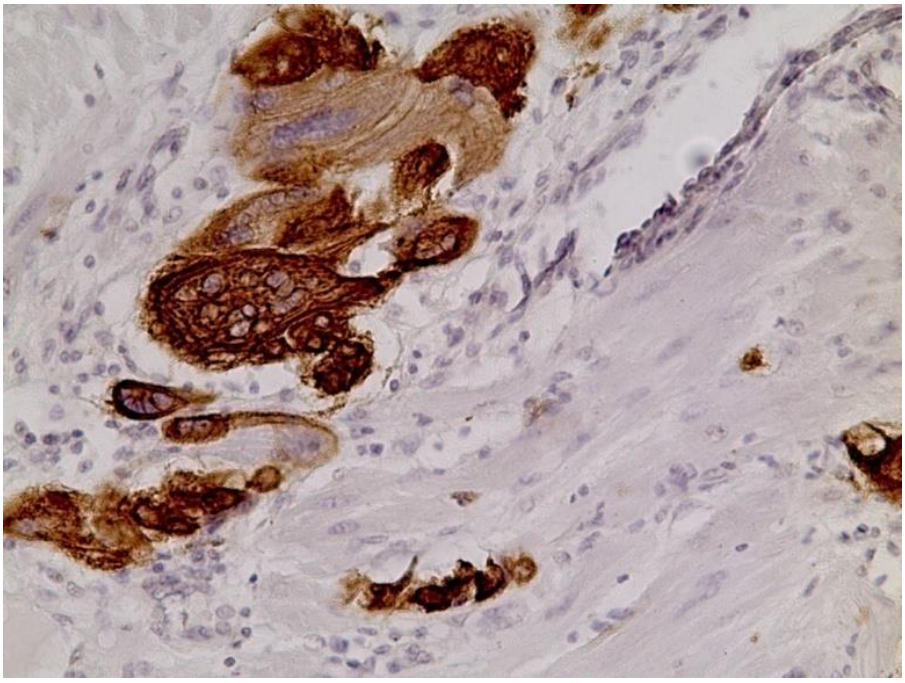


Рис. 16. Укрупнение многоядерных гигантских клеток в маточно-плацентарной области на 25 неделе беременности. А- несколько близрасположенных многоядерных гигантских клеток с разным количеством ядер. Гематоксилин-эозин. Б – Иммуновизуализация многоядерных гигантских клеток маркером цитокератин-8, разная интенсивность иммуноэкспрессии. Косвенные признаки процесса формирования многоядерных гигантских клеток. Х200.

3.2.3 Иммуноэкспрессия ММР-2 и ММР-9 во II триместре.

Для оценки активности ИЦТ, МГК и ЭВТ, помимо их плотности распределения и размеров, решающую роль играет полуколичественная оценка синтезируемых ими металлопротеиназ 2 и 9, особенно в сравнении с данными по I триместру (табл.8).

Таблица 8

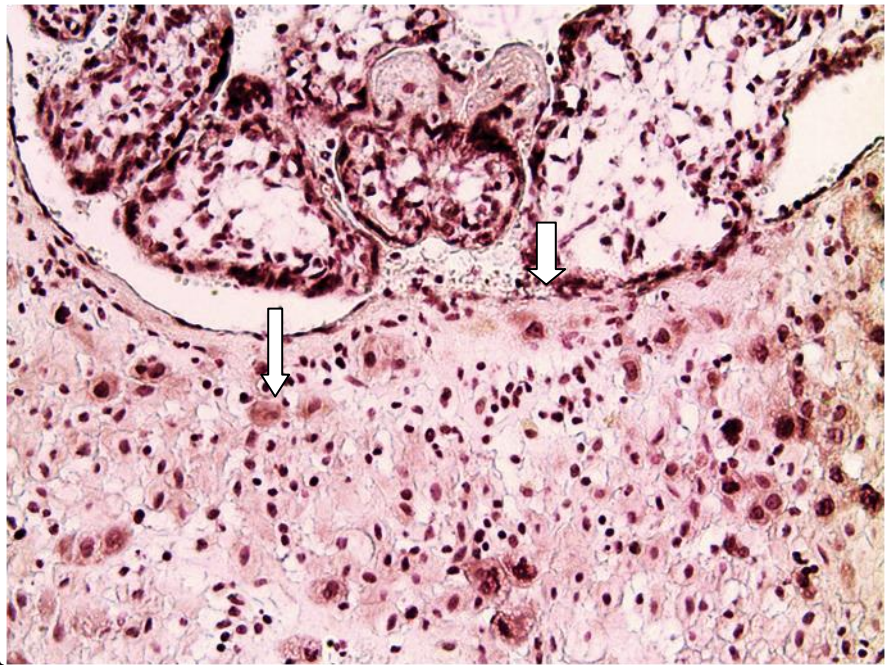
Оценка интенсивности экспрессии ММР-2 и ММР-9 в цитотрофобластических элементах различного типа на 18-25 нед.

ММР	Тип клеток		
	ИЦТ	МГК	ЭВТ
ММР-9	2,31 (2,17-2,45)	1,94 (1,81-2,08)	2,89 (2,82-2.96)
ММР-2	2,04 (1,89-2,19)	1,54 (1,39-1,69)	2,76 (2,67-2,86)

Возвращаясь к табл. 4 и 5 и сопоставляя её с табл. 8 (I триместр), видно, что на прежне низком уровне иммуноэкспрессии ММР-2 остаются МГК и ИЦТ. Чуть снижается экспрессия ММР-2 в ЭВТ, сохраняя более высокий уровень экспрессии ММР-2 в сравнении с другими типами инвазивных клеток.

На 18-20 неделях гестации в МПО даже в зоне ЯВ (Рис. 17А) с наличием стромальных каналов и клеток Кащенко-Гофбауэра видны единичные ИЦТ и МГК, а также децидуальные клетки с минимальной иммуноэкспрессией ММР-2. В дальнейшем умеренная экспрессия ММР-2 сохраняется только в отдельных клетках в зоне расположения эндотелия радиальных артерий и в отдельном интерстициальном ЦТ в её стенке (рис. 18, 19). На 25 неделе гестации интенсивность иммуноэкспрессии ММР-2 сохраняет тенденцию к снижению, выявляясь лишь в отдельных клетках ИЦТ (рис. 20А), будучи негативной в МГК и децидуальных клетках.

А



Б

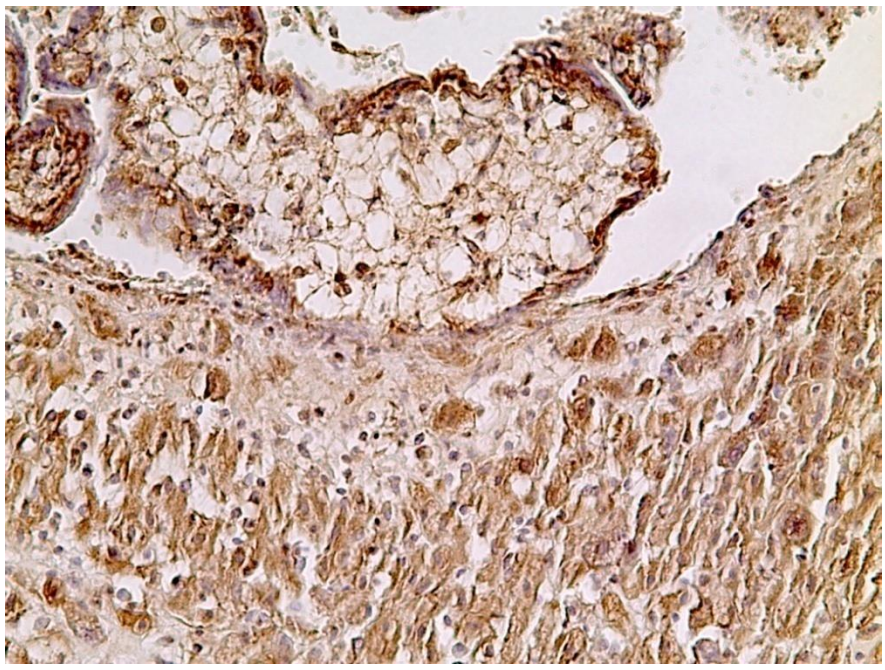
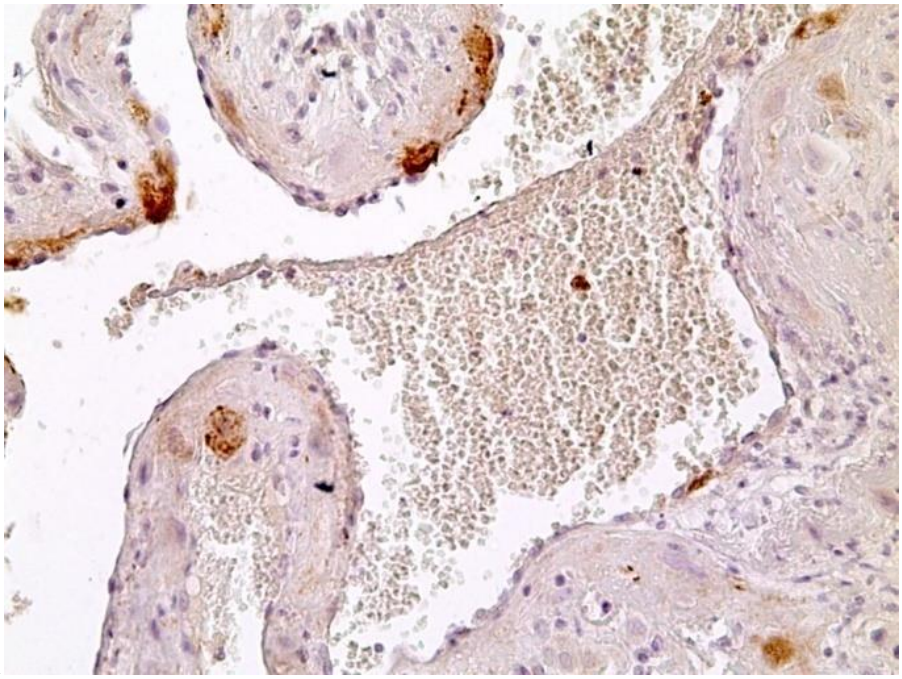


Рис. 17. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в зоне якорной ворсины на сроке 18-20 недель. Х200. А- близкая к минимальной экспрессия металлопротеиназы 2 типа в отдельных клетках(↓). Б – серийный срез, выраженная иммуноэкспрессия металлопрортеиназы 9 типа в эпителии, плацентарных макрофагах якорных ворсин и во 2 зоне цитотрофобластической инвазии.

А



Б

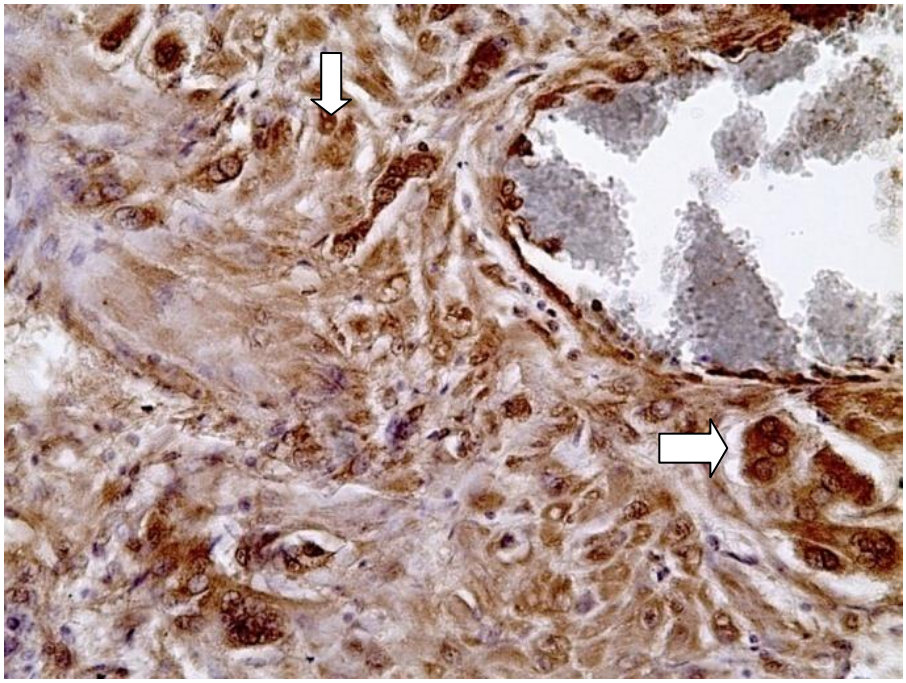
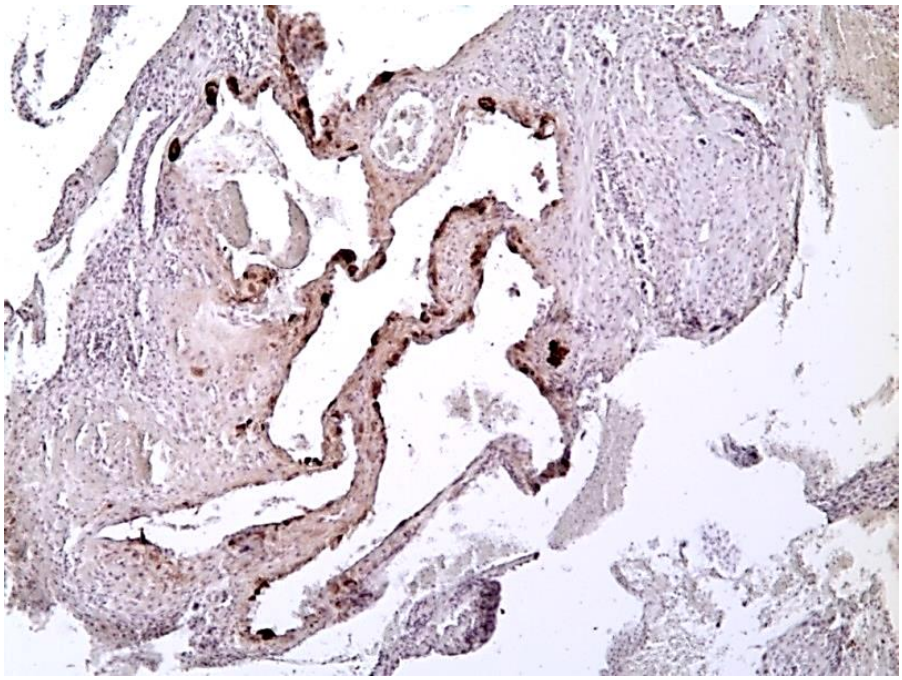


Рис. 18. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов на 25 неделе гестации. Х200. А – экспрессия металлопротеиназы 2 типа в отдельных клетках внутрисосудистого и интерстициального цитотрофобласта. Б – высокая иммуноэкспрессия металлопротеиназы 9 типа в интерстициальном цитотрофобласте(↓), многоядерных гигантских клетках (→) и во внутрисосудистом цитотрофобласте.

А



Б

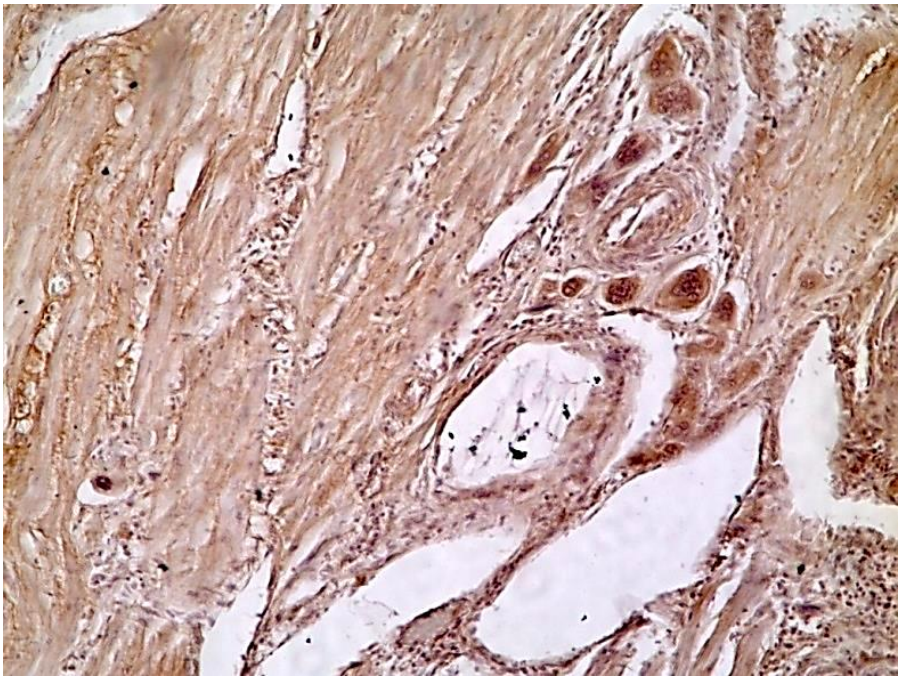
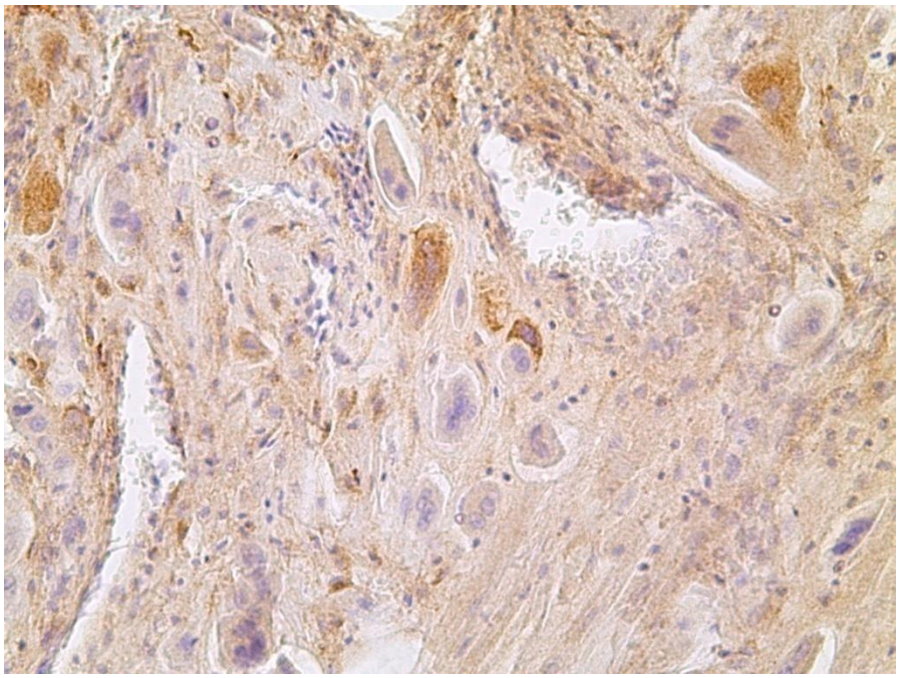


Рис. 19. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов на 25 неделе гестации. А – экспрессия металлопротеиназы 2 типа в отдельных клетках внутрисосудистого цитотрофобласта. х50 Б – высокая иммуноэкспрессия металлопротеиназы 9 типа в многоядерных гигантских клетках. X100

А



Б

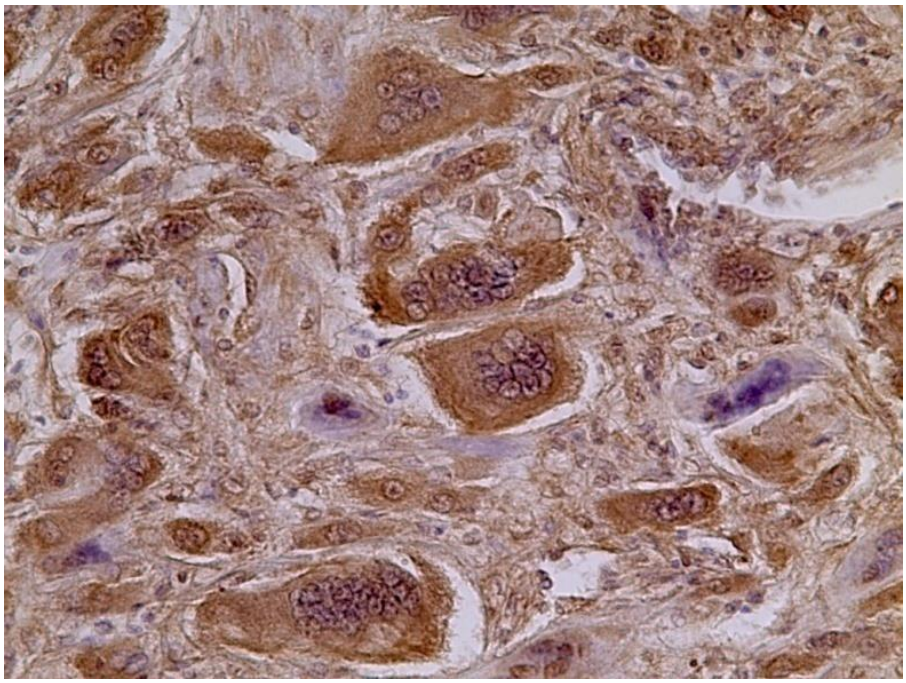


Рис. 20. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов на 25 неделе гестации. А – слабая экспрессия металлопротеиназы 2 типа в отдельных многоядерных гигантских клетках. х100 Б – интенсивная иммуноэкспрессия металлопротеиназы 9 типа в интерстициальном цитотрофобласте и в большинстве многоядерных гигантских клеток. Отдельные клетки негативны.х200

Вместе с тем, выявляется иная динамика экспрессии ММР-9 в эти же сроки гестации (табл. 8). Так, на рис. 17Б иммуноположительная реакция обнаружена в синцитиотрофобласте и плацентарных макрофагах ЯВ, а также в третьем слое ЦТ-инвазии, где соответствующая реакция в 2-3 балла выявляется в ИЦТ и МГК. На 25 неделе гестации усиление экспрессии ММР-9 сохраняется во всех инвазивных клетках, но в большей степени в ЭВТ, который полностью замещает эндотелиальный покров радиальных артерий (Рис 18Б). В этом же сроке выявляется достаточно высокая иммуноэкспрессия (≈2 балла) в ИЦТ, МГК (рис. 20Б) с максимальным её уровнем в ЭВТ.

Таким образом, в сравнении с I триместром на протяжении 18-28 недель беременности происходит смена активности ММР. Иммуноэкспрессия ММР-2 во всех типах инвазивных клеток уменьшается, а ММР-9, наоборот, нарастает с преобладанием во внутрисосудистом ЦТ. Прицельное изучение ЦТИ во II триместре выявило много новых важных фактов.

Во-первых, источником дополнительных инвазивных клеток становятся новые генерации якорных ворсин с большой площадью соприкосновения пролиферирующего ворсинчатого цитотрофобласта с материнским эндометрием.

Во-вторых, при явном снижении количества ИЦТ на стандартной площади среза, его средний диаметр увеличивается, также как средний диаметр МГК.

В третьих, сохраняется высокая инвазивная и протеолитическая активность (экспрессия ММР-2 и особенно ММР-9) в ЭВТ.

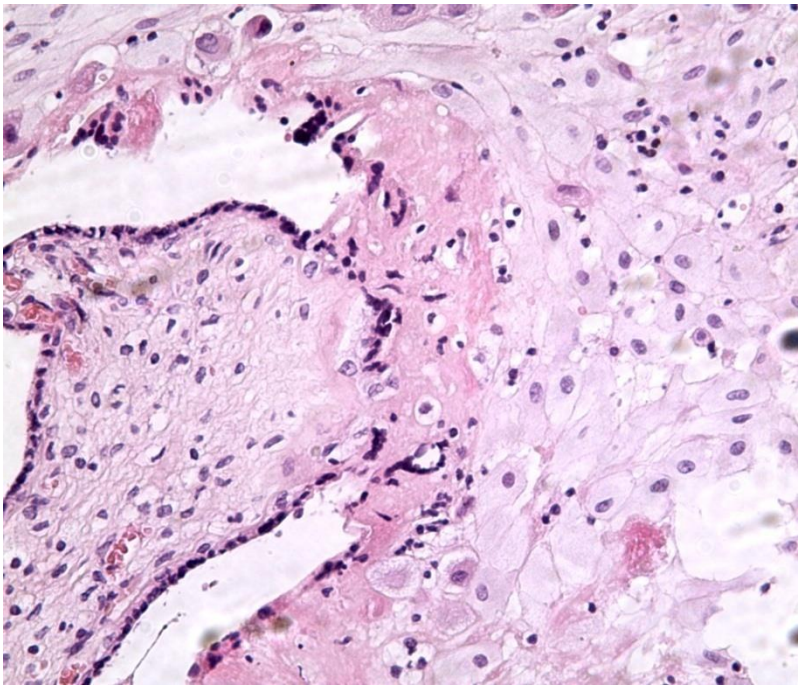
В четвертых, процесс инвазии полностью переходит в зону радиальных артерий, которые интенсивно преформируются в течение всего II триместра.

3.3.ОСОБЕННОСТИ ЦТИ И МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТЕЧЕНИЕ III ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ.

3.3.1 Ворсины, характерные для третьего триместра

В III триместре и особенно в доношенном сроке плацента представляет собой зрелый орган. Присутствуют все компоненты ворсинчатой части котиледонов. Опорные ворсины имеют три уровня ветвления, от них отходят промежуточные ветви, от них – преобладающие мелкие терминальные ветви. Терминальные ворсины покрывает синцитиотрофобласт, клетки цитотрофобласта встречаются редко, они единичны. Терминальные ворсины, в свою очередь, подразделяются на две разновидности. Некоторые из них имеют узкие капилляры по центру, а некоторые – синусоиды, контактирующие с участками синцитиотрофобласта. Эта важная структура – тончайший участок плацентарного барьера, через который осуществляется диффузионный обмен необходимыми веществами между матерью и плодом. По-видимому это основная функция ворсин плаценты в III триместре, так как из-за небольшого количества ворсинчатого цитотрофобласта в этом сроке ворсины нельзя рассматривать как источник инвазии. Изредка попадающиеся в микропрепаратах маточноплацентарной области ворсины, соприкасающиеся с материнским эндометрием, представляют собой бывшие активные якорные ворсины, завершившие свою деятельность. Они обычно замурованы в составе слоя фибриноида Рора, строма их склерозирована и, что важно, - в их основаниях отсутствуют пролифераты ЦТ (рис. 21).

А



Б

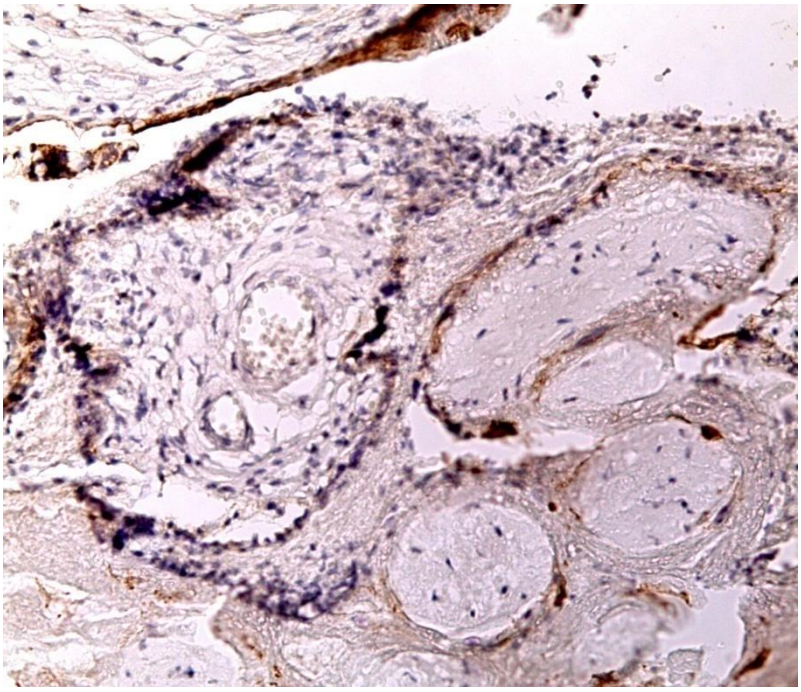


Рис. 21. Якорные ворсины. Доношенный срок. Ворсины в этом сроке не являются источником инвазивного цитотрофобласта, многие из них оказываются замурованными в массах фибриноида. А- гематоксилин-эозин, Б- иммуномаркер – цитокератин-8. х200.

3.3.2. Гистометрия инвазирующих клеток в маточноплацентарной области ампутированных маток и биоптатах плацентарного ложа на сроке 31 – 40 недель.

Финальная часть беременности характеризуется резким уменьшением количества ИЦ в стандартной площади срезов маточноплацентарной области (табл. 9) (рис. 22 А,Б), увеличением количества МГК (табл. 9) и их максимальными размерами (рис. 22 А), в широких радиальных артериях встречаются единичные ЭВТ (рис. 23 Б).

Таблица 9

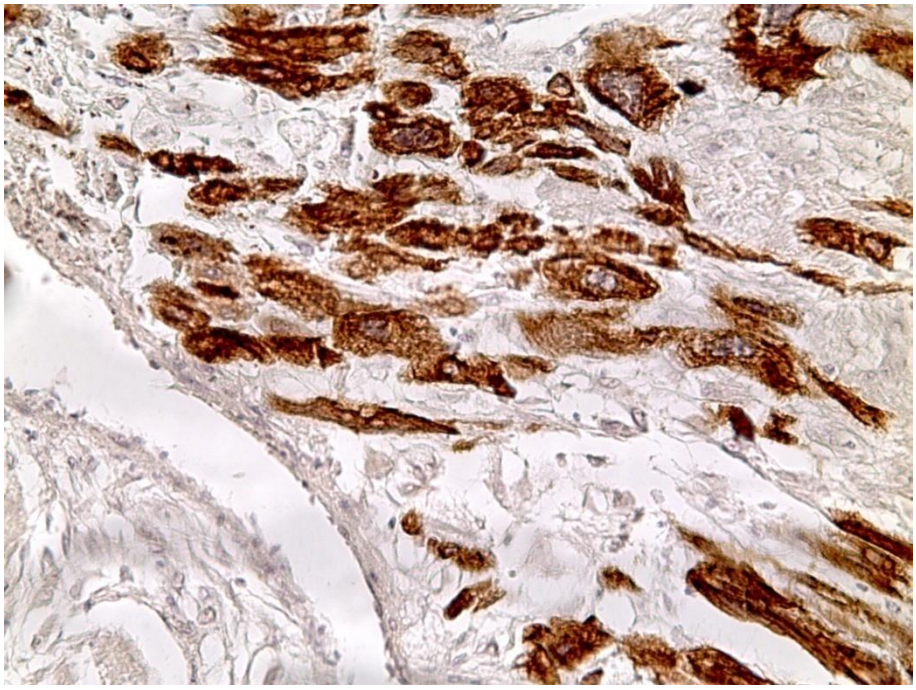
Абсолютное количество в стандартном поле зрения и размер поперечного диаметра (μм) инвазирующих клеток на сроке 31-40 недель

Клетки	Абсолютное количество	Размер поперечного диаметра
ИЦТ	**48,18 (16,64-79,72)**	**25,29 (24,42 – 26,16)**
МГК	**43,65 (29,66-57,63)**	**45,47 (44,02-46,92)**

Инвазирующие клетки, в частности ИЦТ, сохраняются в небольшом количестве до доношенного срока, преимущественно выявляются в зоне адвентиции или непосредственно в стенке радиальных артерий с полным замещением фибриноидом их эластомышечных элементов стенки (рис. 23А).

При анализе во всех биоптатах плацентарного ложа и ампутированных маток констатировано резкое уменьшение третьей разновидности инвазивного цитотрофобласта – ЭВЦ в целом и, особенно, в зоне эндотелиальной выстилки артерий, где удается определить лишь единичные клетки (рис 23Б).

А



Б

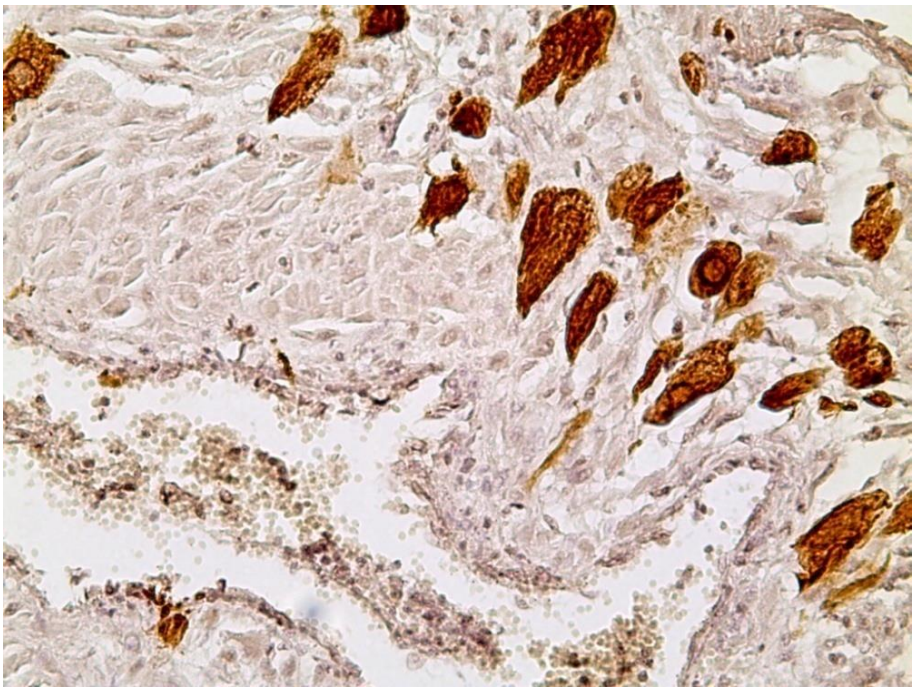
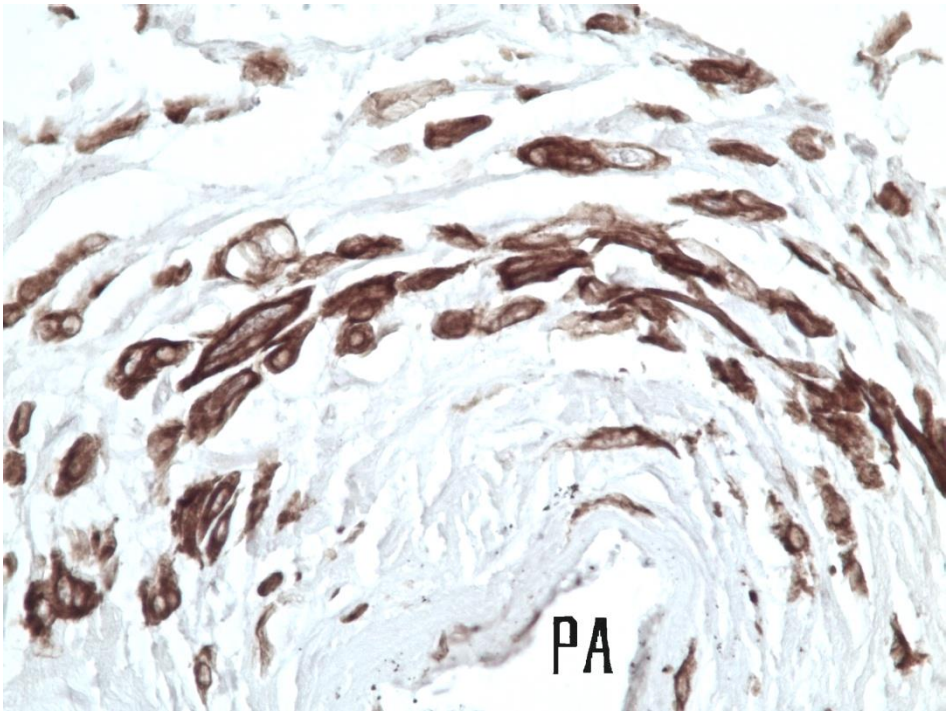


Рис.22. Беременность 38 нед. Биопсия плацентарного ложа, взятая при кесаревом сечении по поводу узкого таза. Маркер - цитокератин-8 Иммуноэкспрессия цитокератина в интерстициальном цитотрофобласте и многоядерных гигантских клетках среди пучков миоцитов. А - группа преимущественно интерстициального цитотрофобласта вытянутой формы. Б – многоядерные гигантские клетки разной величины. х200.

А



Б

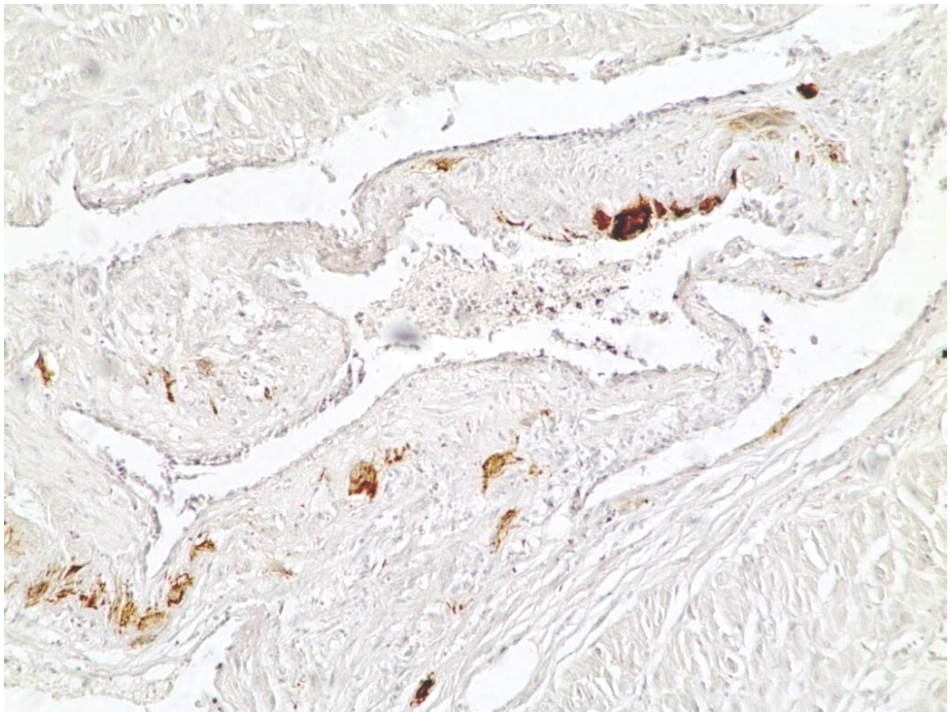


Рис. 23. Беременность 38 нед. Биопсия плацентарного ложа, взятая при кесаревом сечении по поводу узкого таза. Маркер - цитокератин-8. Иммуноэкспрессия маркера цитокератин-8 в интерстициальном цитотрофобласте, многоядерных гигантских клетках и в эндоваскулярных клетках А – скопление ИЦТ и МГК вокруг преформированной стенки радиальной артерии (РА – просвет артерии), х200. Б – единичные эндоваскулярные клетки по линии эндотелия артерии, х50

.

Таким образом, в течение III триместра, особенно к доношенному сроку гестационная перестройка спиральных и радиальных артерий матки закончена. Одноядерные клетки интерстициального цитотрофобласта уже немногочисленны, поскольку, необходимость цитотрофобластической инвазии отпадает. Особенно ярко это выражается в снижении количества ЭВЦ. Увеличивается количество и размеры многоядерных гигантских клеток. Возможно, их роль возрастает именно к доношенному сроку. Соответствует ли этим тенденциям протеолитическая способность сохранившихся ИЦТ и МГК?

3.3.3. Иммуноэкспрессия ММР-2 и ММР-9 во III триместре.

Анализируя табл. 4,5,8 и сопоставляя их с табл. 10, следует, что к доношенному сроку экспрессия фермента ММР-2 сохраняется только в редком ЭВТ, она резко снижается в ИЦТ и МГК (Рис.24А). К концу беременности экспрессия ММР-9 в многоядерных гигантских клетках не ослабевает, а становится сравнимой с интерстициальным цитотрофобластом (рис.24Б). В эндоваскулярном цитотрофобласте экспрессия этой металлопротеиназы по-прежнему высокая. Важно отметить, что гестационная перестройка радиальных артерий к этому сроку уже завершена и объем крови, поступающий через них в межворсинчатое пространство плода - максимальный (Рис. 25).

Таким образом, в доношенной плаценте в норме инвазивный процесс практически завершен, стоит отметить основные его результаты. К этому сроку и спиральные и радиальные артерии имеют широкий просвет. Все эластомышечные элементы их стенок замещены фибриноидом.

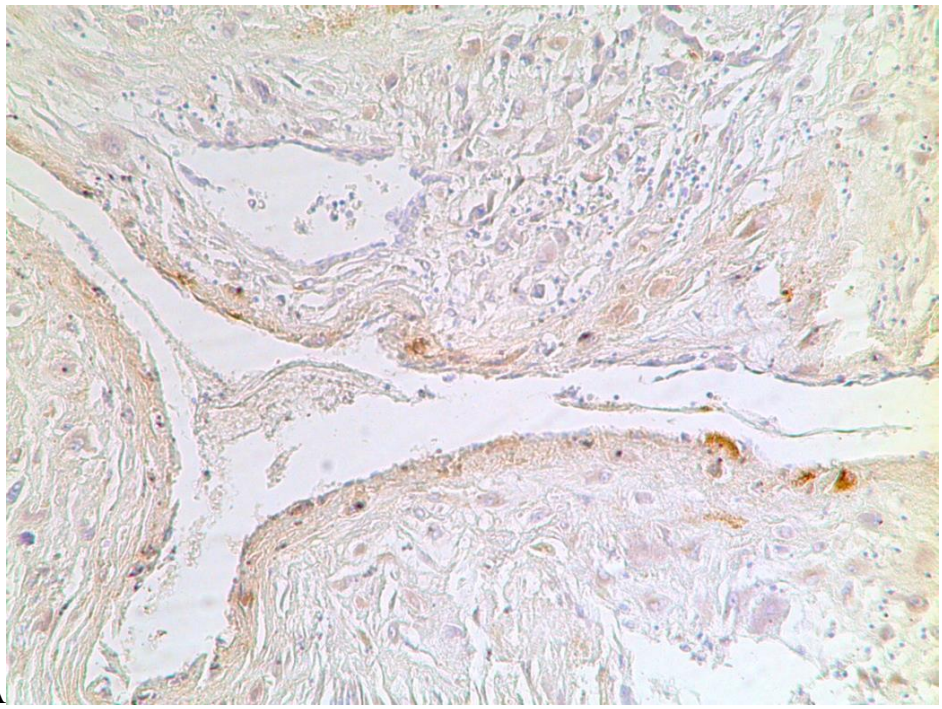
Количество одноядерных инвазивных элементов уменьшается, эндоваскулярный цитотрофобласт встречается редко. Экспрессия металлопротеиназы 2 типа снижается. Вместе с тем, увеличиваются количество и размеры многоядерных гигантских клеток. Во всех инвазивных элементах нарастает экспрессия металлопротеиназы 9 типа, возможно это связано с подготовкой матки к родам.

Таблица 10

Оценка интенсивности экспрессии ММР-2 и ММР-9 в цитотрофобластических элементах различного типа на 31-40 нед. гестации.

ММР	Тип клеток		
	ИЦТ	МГК	ЭВТ
ММР-2	0,89 (0,67-1,10)	0,7 (0,50-0,90)	2,99 (2,98-3,0)
ММР-9	2,11 (1,95-2,27)	2,04 (1,86-2,23)	2,99 (2,98-3,0)

А



Б

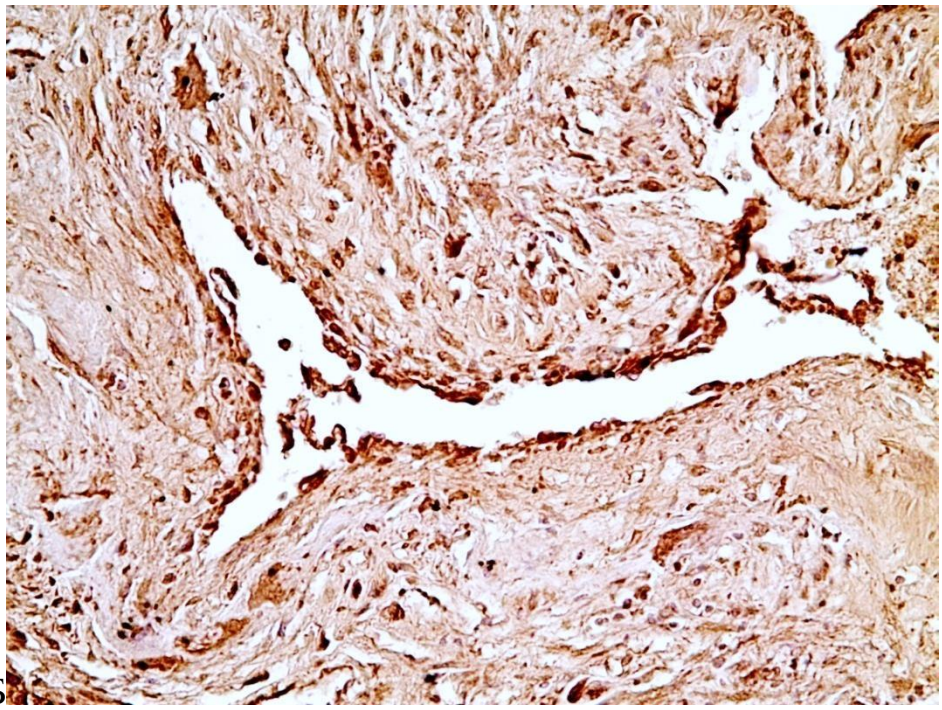


Рис. 24. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в доношенном сроке. А – слабая экспрессия металлопротеиназы 2 типа в отдельных клетках. х200 Б – умеренная иммуноэкспрессия металлопротеиназы 9 типа в интерстициальном цитотрофобласте, многоядерных гигантских и эндоваскулярных клетках. х200

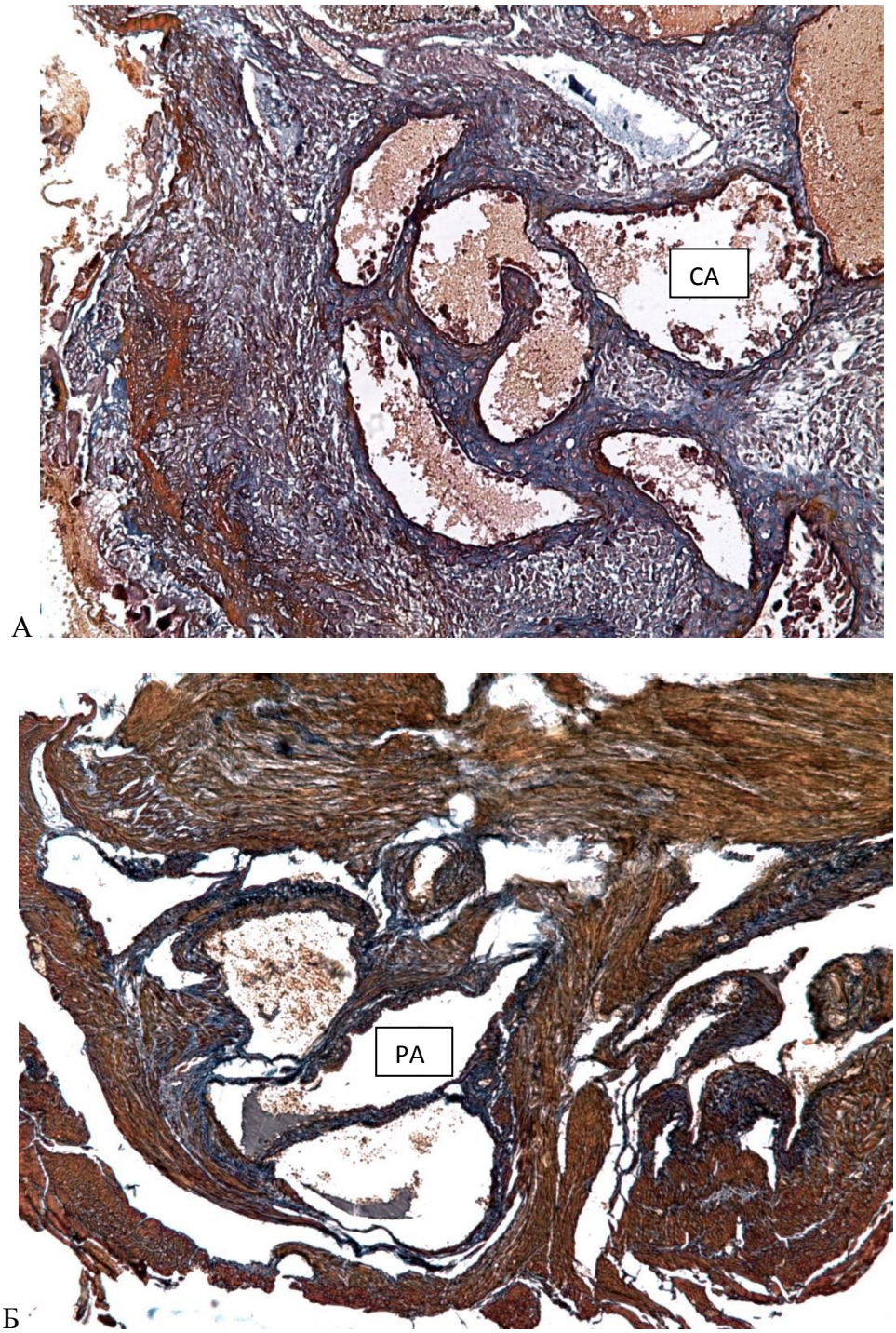


Рис. 25. Доношенный срок. Полная гестационная перестройка артерий при нормальной беременности с замещением эластомышечных элементов фибриноидом, широкий просвет артерий. Окраска по Маллори.

А – спиральная артерия в составе децидуальной оболочки (СА); Б – радиальная артерия среди пучков миоцитов (РА). Х50.

3.4. Редукция цитотрофобластической инвазии у женщин с преэклампсией.

Для оценки возможных изменений процесса цитотрофобластической инвазии материал от женщин, страдавших преэклампсией, был подразделен на две подгруппы по 5 гестационных недель в каждой (28-33 недели и 34-38 недель), так как показано, что ранняя и поздняя преэклампсия могут иметь различную патофизиологию **[3,22].**

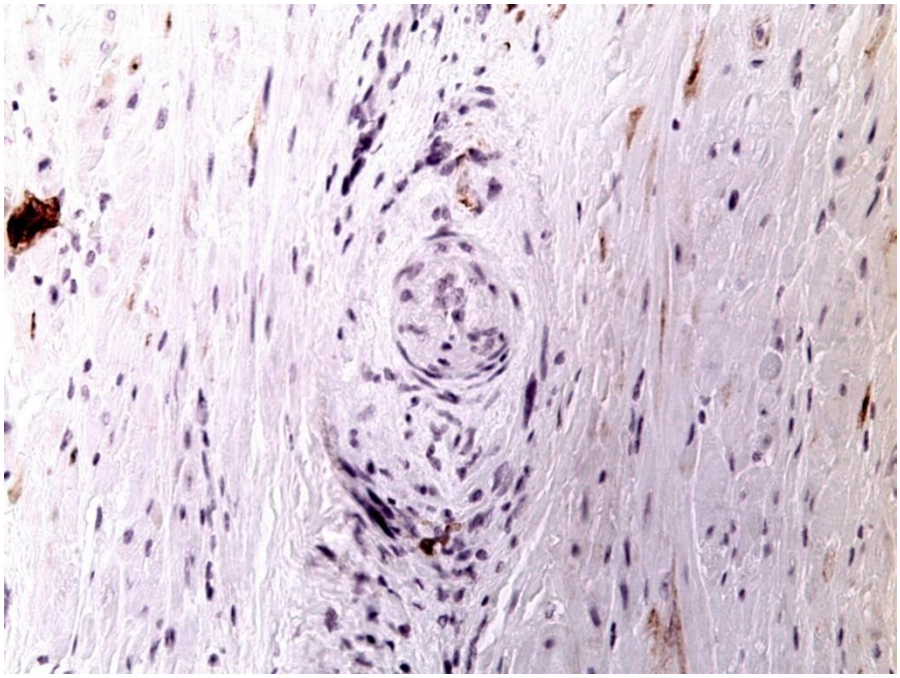
3.4.1 Особенности распределения и изменения величины инвазирующих клеток в маточноплацентарной области женщин, страдающих преэклампсией.

Группа V (28-33 недели гестации).

Данная группа биопсий плацентарного ложа характеризуется почти полным отсутствием признаков гестационной перестройки радиальных и спиральных артерий. Типичными картинами являются толстостенные артерии с узкими просветами, сохранной мышечной оболочкой (рис. 26 А) при том, что в отдалении от них видны инвазивные клетки. Чаще всего это интерстициальный цитотрофобласт, который присутствует в виде отдельных плотно расположенных скоплений. Иммуноэкспрессия маркера цитокератин-8 в нем представлена в виде мелкогранулярного распределения вокруг ядер, то есть без плотного венчика. Многоядерные гигантские клетки встречаются в достаточно большом количестве, но лишь в отдельных из них видна иммуноэкспрессия цитокератина-8, большинство из них иммунонегативны. Ни в одной из 11 биопсий плацентарного ложа матки не было видно признаков инвазии эндоваскулярного цитотрофобласта.

Создается общее впечатление, что степень зрелости элементов и выраженности инвазии не соответствует сроку гестации, эти показатели в разных случаях очень различны. Наблюдается т.н. мозаичность общей картины (рис. 27А,Б и рис. 28А,Б). Заметны некоторые затруднения в осуществлении инвазивного процесса. В некоторых случаях

А



Б

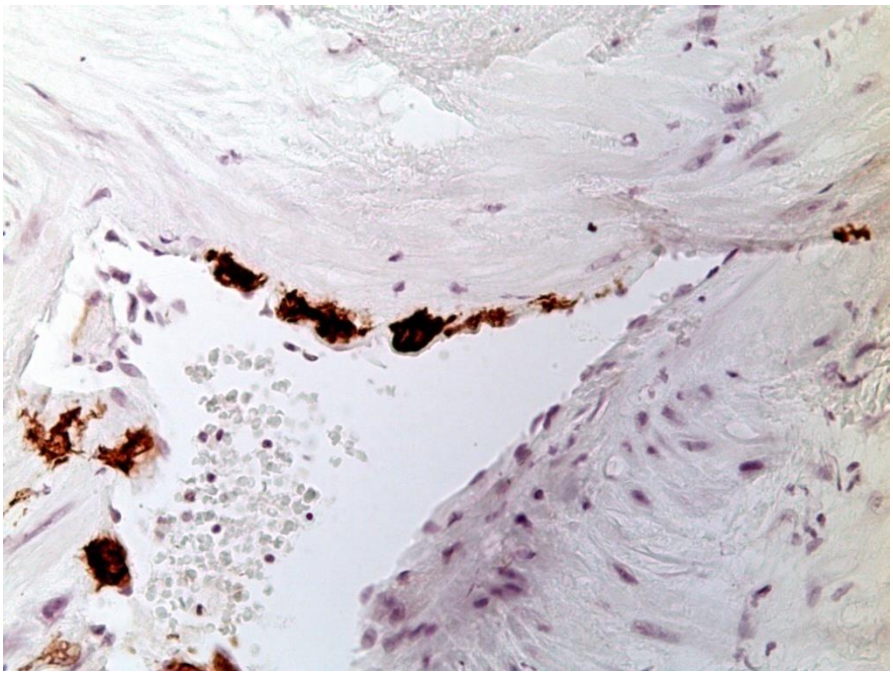
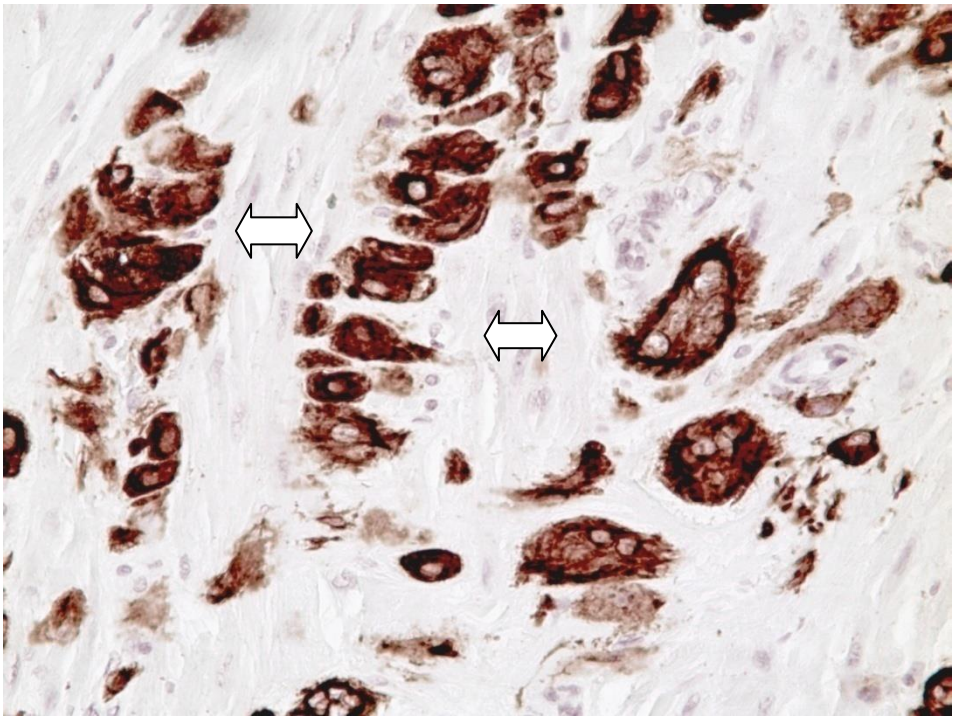


Рис. 26. Радиальные артерии при преэклампсии. А – мелкая радиальная артерия без признаков перестройки на сроке гестации 28-33 недели. Окраска гематоксилином и эозином. х200. Б – внутрисосудистый цитотрофобласт при сохранной стенке без признаков её перестройки на сроке гестации 34-38 недель. Иммуномаркер – цитокератин-8. х200.

А



Б

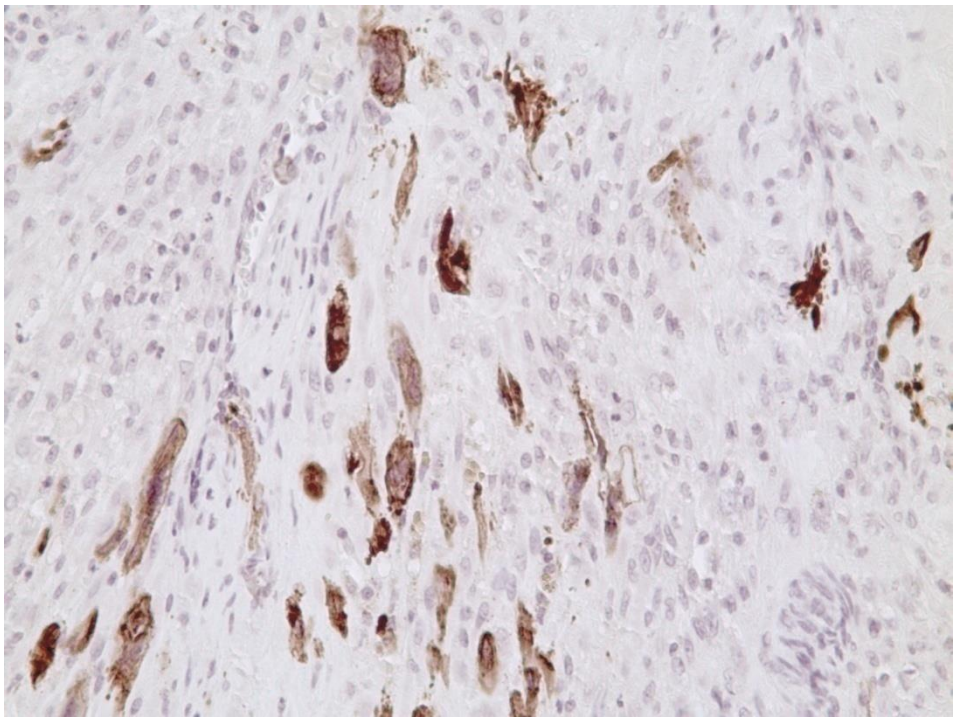
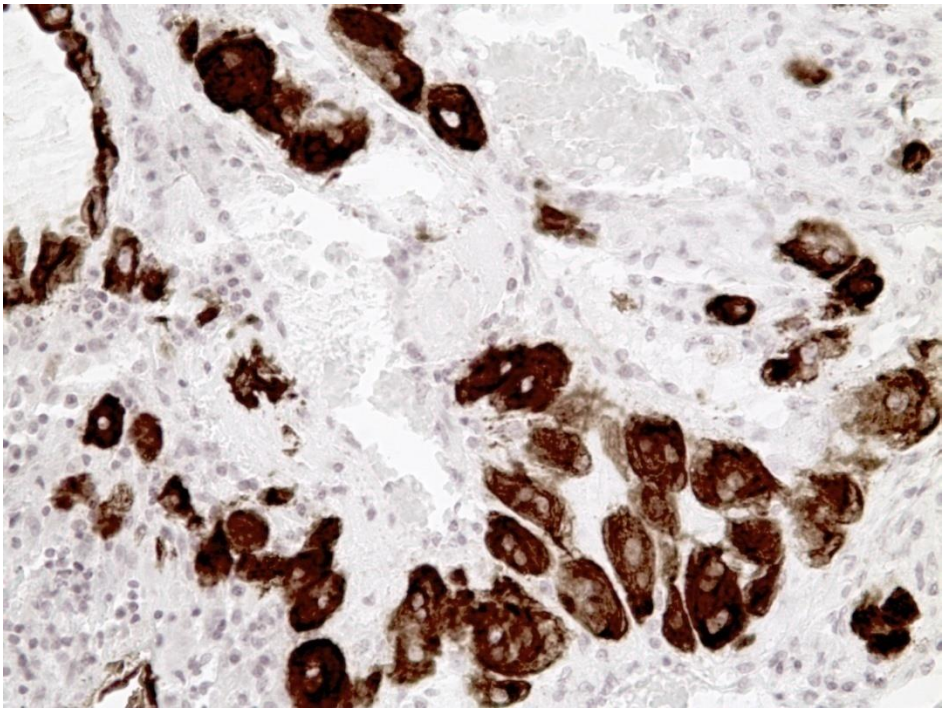


Рис. 27. Иммуноэкспрессия цитокератина-8 в инвазивных клетках на 30 нед. гестации. Биопсия плацентарного ложа, взятая при кесаревом сечении, выполненном по поводу тяжелого течения преэклампсии. А- ряды интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток между пучками миометрия (↔). Выраженная иммуноэкспрессия цитокератина-8. Б – редкое расположение интерстициального цитотрофобласта с явно слабой экспрессией. х200.

А



Б

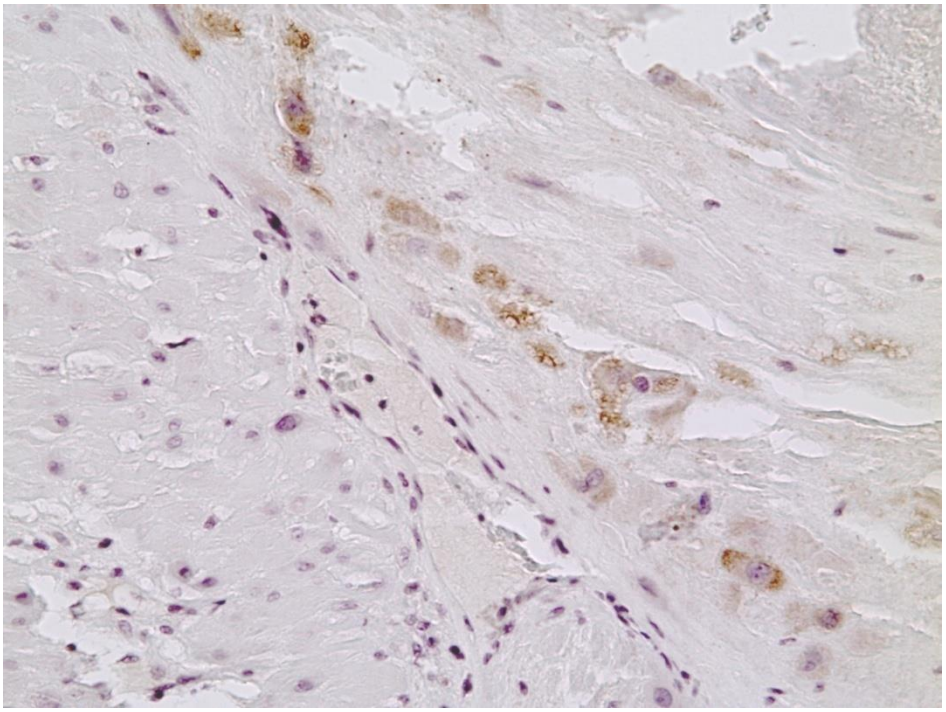
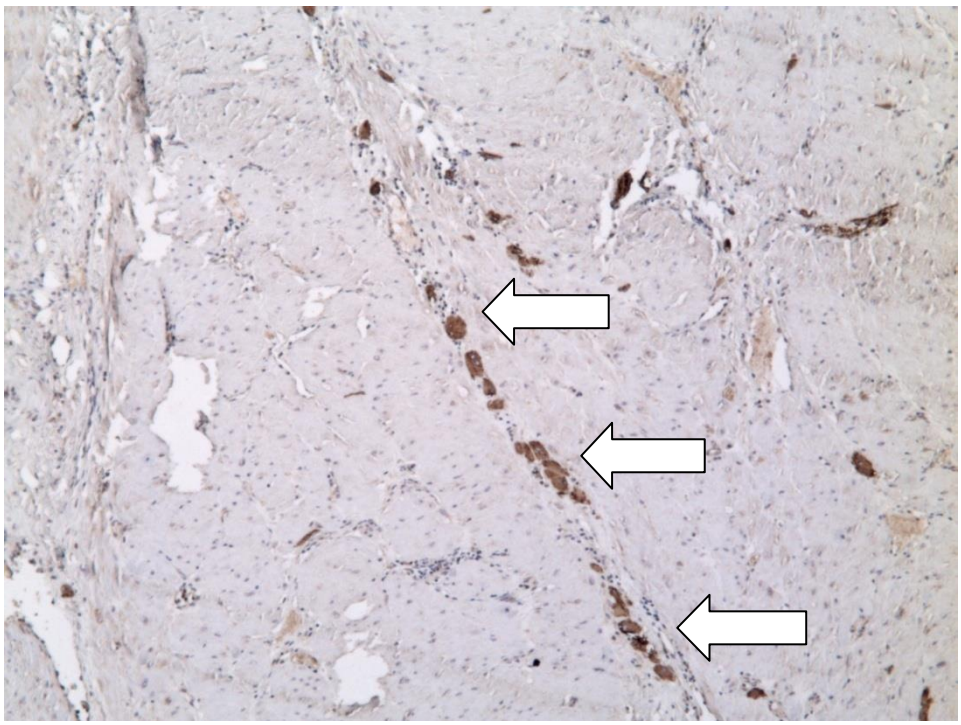


Рис. 28. Особенности распределения иммуноэкспрессии маркера цитокератин-8 в биоптате плацентарного ложа матки, взятом при кесаревом сечении, выполненном по поводу преэклампсииА – выраженная иммуноэкспрессия цитокератина-8 в многоядерных гигантских клетках. Б – участок с небольшим количеством инвазивных клеток и слабой иммуноэкспрессией. . х200.

А



Б

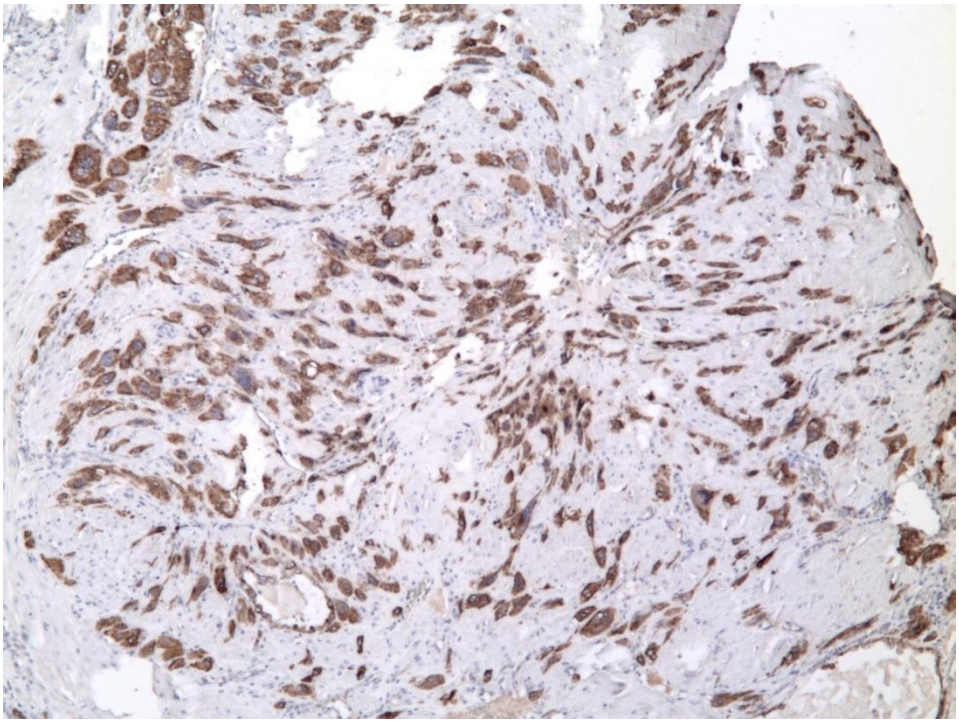


Рис. 29. Иммуновизуализация инвазивных клеток плацентарного ложа. Биопсия плацентарного ложа, взятая во время кесарева сечения по поводу тяжелой преэклампсии. Иммуномаркер - цитокератин-8. А – прерывистая «дорожка» инвазирующих клеток между пучками миоцитов.(→) х50 Б – хаотичное распределение инвазивных клеток без проникновения их в стенки радиальных артерий. Х100

интерстициальный цитотрофобласт передвигается только по межмышечным пространствам, выстраиваясь в виде прерывистой «дорожки» (рис. 29А), лишь единичный ИЦТ виден в соседнем миометрии. В отдельных участках плацентарного ложа заметно беспорядочное распределение ИЦТ и МГК, которые рассеяны вокруг просветов артерий, но не проникают в их стенки (рис. 29Б). По распределению инвазивных клеток в маточноплацентарной области, можно сделать вывод о том, что отсутствует их ориентация на радиальные артерии матки. Практически не представлен такой важный компонент, как внутрисосудистый цитотрофобласт.

Группа VI (34-38 недель гестации).

В сравнении с предыдущей, более ранней группой биопсий плацентарного ложа, замечено, что в радиальных и артериях при наличии неполной их гестационной перестройки выявляется начальная стадия проникновения эндоваскулярного цитотрофобласта в слой эндотелия (рис. 26Б). Однако не наблюдалось полного замещения эндотелиальной выстилки артерий и, как правило, отмечалось слабое, неглубокое проникновение интерстициального цитотрофобласта со стороны адвентиции. Было отмечено небольшое количество радиальных артерий и артериол без признаков гестационной перестройки и в этом отношении данная подгруппа женщин была схожа с предыдущей.

При преэклампсии в доношенном сроке количество клеток в стандартной площади маточноплацентарной области снижено: интерстициальный цитотрофобласт составил лишь 28,93% от нормы, многоядерные гигантские клетки - 73,04% от нормы (Табл. 11). Процесс постепенного прироста величины клеток также нарушен. Размеры клеток в доношенном сроке при преэклампсии значительно меньше (ИЦТ 37,56% от нормы, а МГК - 59,01%) (Табл. 12).

Следует отметить, чем тяжелее протекало заболевание, тем раньше женщины были родоразрешены, поэтому недостаточная перестройка сосудов заметнее в группе 28-33 недели. Вместе с тем, во многих случаях на ранних сроках затянувшийся и неэффективный процесс цитотрофобластической инвазии был ещё в разгаре. Суммарное количество инвазивных клеток ИЦТ может быть выше, но его очаговое распределение вдали от радиальных артерий было неэффективным. Многоядерных гигантских клеток в обоих группах меньше, чем должно быть в норме. По –видимому процесс их образования также нарушен. Важен тот факт, что размеры элементов цитотрофобластической инвазии у женщин, страдающих преэклампсией, достоверно уменьшены. В более поздних сроках беременности компенсаторные возможности истощаются и они оказываются ещё меньше, чем в ранних сроках.

Таблица 11

Абсолютное количество инвазивных клеток в стандартной площади среза при преэклампсии

СРОК ГЕСТАЦИИ	МГК	ИЦ
28-33 недели	32,65	31,42
34-38 недель	31,88	13,94
	$p<0,05^{**}$	p<0,05**

**Различия достоверны (критерий Манна-Уитни).

Таблица 12

Размеры диаметров инвазивных элементов при преэклампсии в (μм)

СРОК ГЕСТАЦИИ	МГК	ИЦТ
28-33недели	37,50 (норма=44,00)	13,64 (норма=23,67)
34-38 недель	26,83 (норма=46,27)	9,50 (норма=24,41)
	p<0,05**	p<0,05* **

Различия достоверны(t-критерий Стьюдента.*), (критерий Манна-Уитни**).

3.4.2.Оценка интенсивности иммуноэкспрессии ММР-2 и -9 в цитотрофобластических элементах при преэклампсии.

Данные по оценке интенсивности иммуногистохимической экспрессии металлопротеиназ 2 и 9 типов в элементах цитотрофобластической инвазии у женщин, чья беременность была осложнена преэклампсией, отражены в таблице 13 и 14 (табл. 13,14).

Таблица 13

Оценка интенсивности экспрессии ММР-2 в компонентах ЦТИ при преэклампсии

ММР-2				
№ группы	срок	ИЦТ	МГК	ЭВТ
V	28-33нед.	1,48 (1,34-1,62)	0,84 (0,72-0,95)	-
IV	34-38 нед.	1,20 (1,09-1,31)	1,02 (0,86-1,18)	-
			p<0,05*	

* Различие достоверно при сравнении групп Vи VI (критерий Манна-Уитни).

Таблица 14

Оценка экспрессии ММР-9 в цитотрофобластических элементах при преэклампсии

ММР-9				
№ группы	срок	ИЦТ	МГК	ЭВТ
V	28-33нед.	1,27 (1,18-1,37)	1,40 (1,27-1,54)	-
IV	34-38 нед.	1,02 (0,90-1,14)	1,06 (0,87-1,25)	-
		p<0,05*	p<0,05**	

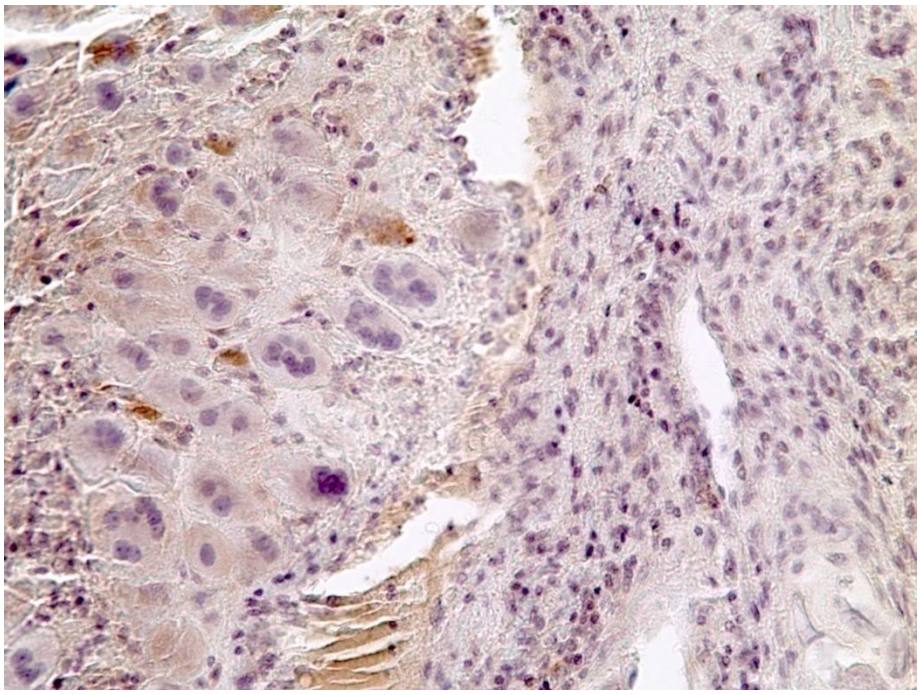
* Различие достоверно при сравнении групп Vи VI (критерий Манна-Уитни).

Интенсивность экспрессии ферментов по сравнению с нормой низкая, как для металлопротеиназы 2 типа, так и для металлопротеиназы 9 типа (рис.

30 А,Б). К моменту родов она держится на том же уровне, может даже немного возрасти в клетках МГК. На рисунке 30А видно, что интенсивность экспрессии ММР-2 при преэклампсии низкая. Вместе с тем процесс инвазии, который практически завершен, не приносит желаемых результатов: стенка артерии недостаточно перестроена и содержит большое количество эластомышечных элементов (рис. 31А,Б). Инвазивные элементы уже малоактивны и перестройка радиальной артерии не произошла.

Таким образом, подтверждается тот факт, что преэклампсия – серьезное, часто смертельное для матери и плода осложнение беременности. Процесс инвазии в этом случае сильно нарушен, она недостаточно интенсивная и эффективная: не происходит перестройки сосудов в достаточном объеме (рис.32). При данной патологии лишь единичные клетки цитотрофобласта могут встроиться в стенку сосуда, изменить её ригидность, расширить просветы и обеспечить надлежащий объем крови, поступающей к плоду, существенно не увеличивается. Оценка клеток эндоваскулярного цитотрофобласта в этом случае затруднена, так как интенсивность инвазии патологически снижена и в большинстве просмотренных радиальных артерий эндоваскулярный цитотрофобласт отсутствует.

А



Б

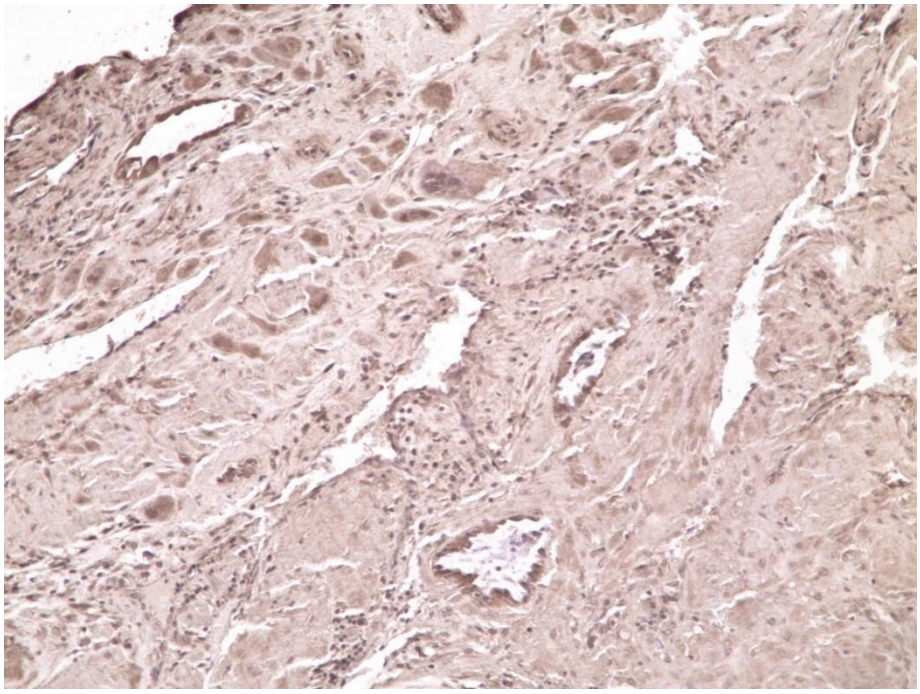
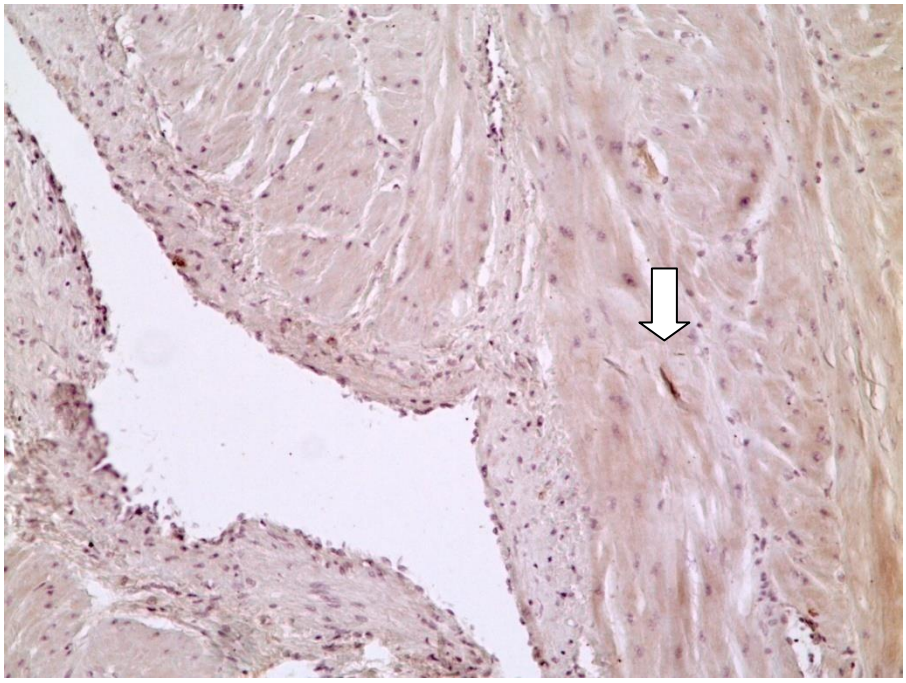


Рис. 30. Иммуноэкспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов в биоптатах плацентарного ложа при преэклампсии. А- среди большинства негативных многоядерных клеток видны отдельные инвазивные клетки со слабой иммуноэкспрессией металлопротеиназы 2 типа. х200 Б – слабоположительне многоядерные клетки, экспрессирующие металлопротеиназу 9 типа. х100.

А



Б

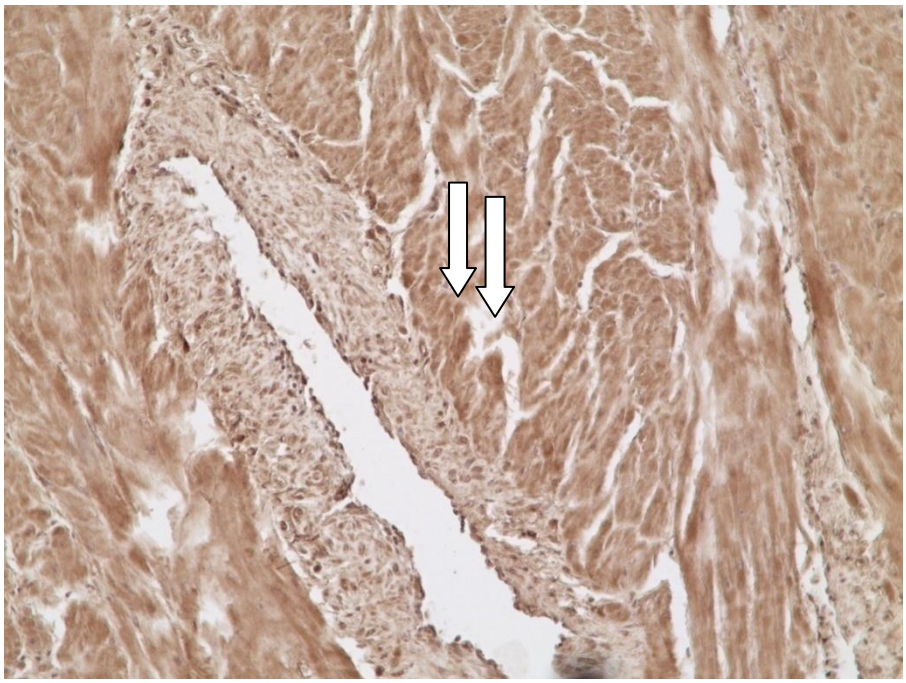
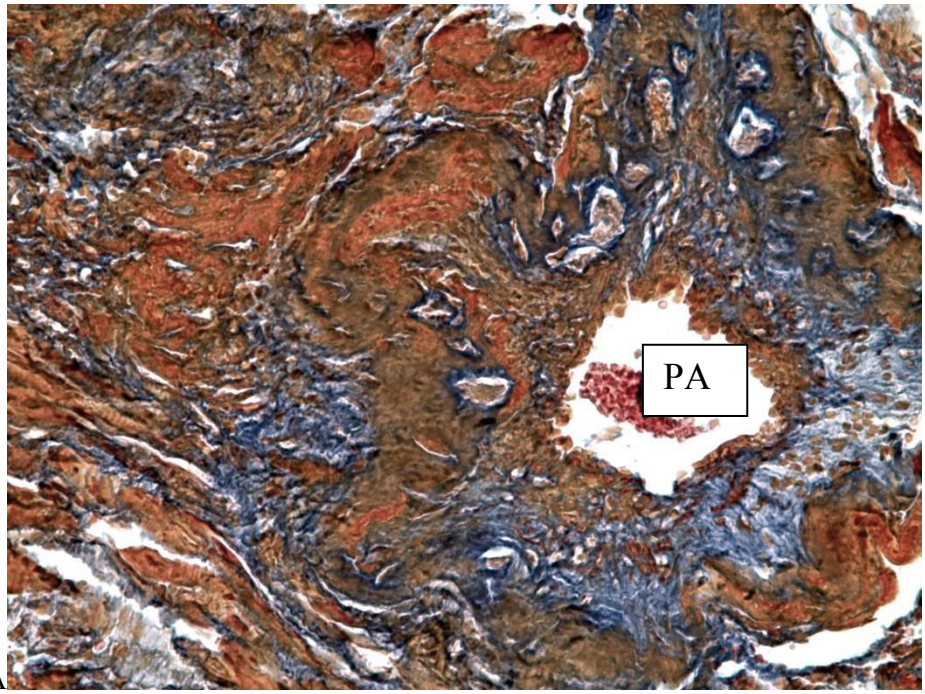


Рис. 31. Иммуногистохимия с применением маркеров к металлопротеиназам 2 и 9 типов. Отсутствие гестационной перестройки стенок радиальных артерий в биоптатах плацентарного ложа у женщин с преэклампсией, единичные вытянутые клетки интерстициального цитотрофобласта (↓) вдали от стенок радиальных артерий . А – Иммуногистохимия с применением маркера к металлопротеиназе 2 типа. Б - Иммуногистохимия с применением маркера к металлопротеиназе 9 типа. Х200.

А



Б

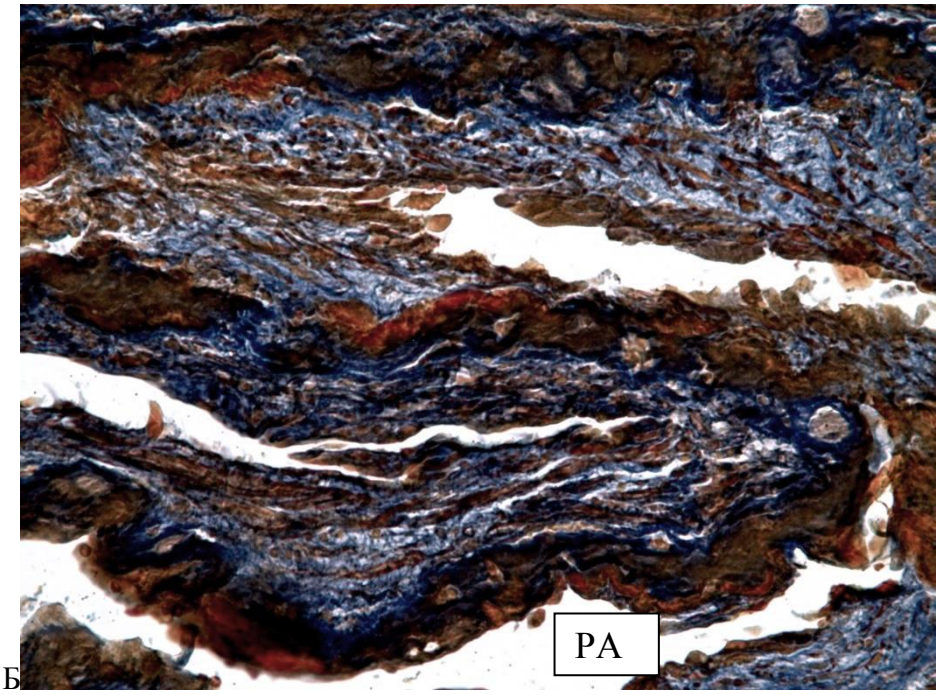


Рис. 32. Неполная гестационная перестройка радиальной артерии при беременности, осложненной преэклампсией. Сохранение эластических и мышечных компонентов, узкий просвет артерии. Окраска по Маллори. Х50.

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотрофобластическая инвазия – специфический процесс физиологической беременности, одна из форм взаимодействия компонентов системы «мать-плацента-плод». В ходе инвазии цитотрофобласт мигрирует из плаценты в эндометрий, там они проникают в стенки маточноплацентарных артерий, перестраивают их, превращая в мешкообразные структуры, которые приносят значительно большее количество материнской крови к плаценте, а затем к плоду **[14]**. Процесс возникновения новых форм и структур в онтогенезе и филогенезе организмов носит название «морфогенез». Процесс морфогенеза контролирует организованное пространственное распределение клеток во время эмбрионального развития организма. От объема маточноплацентарного кровообращения зависит рост и развитие эмбриона и плода. Значение инвазии цитотрофобласта в процессе физиологической беременности трудно переоценить, так как ранние нарушения его ведут к спонтанным абортам, неразвивающейся беременности, могут быть причиной задержки внутриутробного развития или внутриутробной смерти плода. Поверхностная, т.е. неэффективная цитотрофобластическая инвазия рассматривается как причина такого осложнения, как преэклампсия, которое угрожает жизни матери и оказывает влияние на её здоровье в будущем, как и на здоровье ребенка, если его удается сохранить.

Фактическое изучение цитотрофобластической инвазии началось с создания коллекций ампутированных маток и внедрения в акушерскую практику биопсий плацентарного ложа и их патоморфологического анализа. Уже в первых публикациях I. Brosens **[35]** были отмечены как физиологические изменения спиральных артерий, так и детализированы признаки патологии их у женщин, страдающих преэклампсией.

Следующей фундаментальной работой стало исследование инвазии в I триместре беременности, которое было проведено Pijnenborg R. и коллегами в 1981 году **[120]** на материале ампутированных маток в сроке беременности

от 6 до 18 недель. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, изучался процесс цитотрофобластической инвазии с морфометрией интерстициального компонента. Было отмечено наличие многоядерных гигантских клеток, но подсчет их не проводился. Отмечено волнообразное течение инвазивного процесса, сходство его с опухолевым ростом, скопление инвазивных клеток в центральной зоне плацентарного ложа. Условно были выделены так называемые волны инвазии – пики максимально активной перестройки стенок спиральных артерий. Это происходило на 6-8 неделе п.о. и на 16-18-й неделях п.м. Однако использование срезов, окрашенных гематоксилином-эозином, когда трудно дифференцировать интерстициальный цитотрофобласт и децидуальные клетки промежуточного типа, давало лишь общее впечатление о распределении инвазивных клеток.

В конце 80-х годов в диагностике инвазивных процессов большую популярность приобрёл иммуногистохимический метод. Для верификации инвазивных клеток стали использоваться антитела к белкам промежуточных филаментов. Эти белки имеют несколько разновидностей, чаще других используются цитокератины. Нейтральные имеют порядковые номера от 1 до 8, а кислые от 9 до 20. В частности цитокератин-8 визуализирует не только клетки эпителия эндометриальных желез и ворсин, но и все типы инвазивных клеток. Появились первые работы по количественной оценке распределения элементов цитотрофобластической инвазии, главным образом в доношенном сроке нормальной беременности и у женщин, страдающих преэклампсией. Единственным материалом для таких обобщений были биопсии плацентарного ложа. В 2002 году выполнена морфометрия интерстициального цитотрофобласта, визуализированного с помощью маркера – цитокератина 8, на серийных срезах в стандартном объеме МПО в доношенном сроке у женщин с преэклампсией и анемией беременных **[87]**. В последующем морфометрическая оценка инвазии осуществлялась на небольших сериях материала медицинских абортов и базальной пластинки

рожденных плацент. В работе А.П.Милованова и А.К.Кириченко в 2010году **[8]** удалось охарактеризовать качественную сторону процесса цитотрофобластической инвазии на протяжении условно нормальной беременности при использовании главным образом материала удаленных маток. Однако в данной работе не производилась морфометрия инвазивного процесса. Нами предпринята попытка сбора собственной коллекции из разнообразного операционного материала маток при неосложненной беременности и у женщин с преэклампсией.

Для исследования процесса инвазии в I триместре решено использовать материал медицинских абортов, сделанных по желанию здоровых пациенток. Существенным их недостатком является то, что такой материал сильно фрагментирован, нарушена анатомическая последовательность отдельных структур. Вместе с тем, количество и относительная доступность абортного материала позволяет выбрать пригодные для исследования случаи.

Во II триместре искусственное прерывание беременности по медицинским показаниям делается значительно реже. Среди таких случаев условно нормальная беременность встречается нечасто. Большую часть таких абортов составляет патология, связанная с соматическими заболеваниями матери, психическими отклонениями, социальными причинами. Многие аборты делаются с применением гипертонического раствора: через шейку матки пунктируют амниотическую полость, удаляют 200мл жидкости и вводят аналогичное количество гипертонического раствора, что делает материал непригодным для изучения. Более удачным был вариант внутривенного применения препарата «энзапрост», стимулирущего родовую деятельность, рождение плаценты и плода. Он имеет свои ограничения: возможно изучение инвазии только в пределах базальной пластинки. Этот очевидный недостаток был компенсирован исследованием 5 удаленных маток, что позволило оценить проникновение инвазивных элементов в миометрий по направлению к радиальным артериям.

Материал III триместра состоял из 5 удаленных маток (табл. 1) и 5 биопсий плацентарного ложа матки, взятых во время Кесарева сечения при нормальной, неосложненной беременности, что позволило собрать эту коллекцию для последующего изучения цитотрофобластической инвазии на протяжении всей беременности.

В нашем исследовании впервые с помощью морфометрии интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток в стандартном поле зрения маточноплацентарной области удалось детализировать клеточный состав цитотрофобластической инвазии. Оказалось, что максимальная плотность инвазивных клеток со значительным преобладанием интерстициального цитотрофобласта регистрируется в I триместре беременности, то есть в период гестационной перестройки спиральных артерий в составе децидуальной оболочки (первая условная волна цитотрофобластической инвазии). При сравнении групп 7-8 недель и 9-12 недель выявлено, что к концу I триместра количество клеток интерстициального цитотрофобласта в стандартной площади среза возрастает, но статистически оно недостоверно. Количество многоядерных гигантских клеток во много раз меньше, чем ИЦТ в том же стандартном поле зрения маточноплацентарной области.

Наши данные подтверждают вывод о том, что в I триместре количество интерстициальных клеток цитотрофобласта максимально. Вместе с тем, удалось оценить содержание многоядерных гигантских клеток в количественном отношении в стандартной площади среза, что до нас сделано не было. Кроме того, были измерены размеры клеток в поперечном диаметре (срез, проходящий через ядерную зону). В течение I триместра средний диаметр интерстициального цитотрофобласта достоверно увеличивался с 15,77 μм до 21,95 μм, а диаметр многоядерных гигантских клеток соответственно с 23,89 μм до 29,66 μм. И в том и в другом случае при

сравнении групп 7-8 недель и 9-12 недель по методу Стьюдента и Манна-Уитни выявлен достоверный прирост их размеров.

Исследование функциональной активности клеток показало, что металлопротеиназа 2 типа в I триместре начинает экспрессироваться раньше, чем металлопротеиназа 9 типа. Это соотносится с данными, отраженными в литературном обзоре **[77,154]**. У обезьян на ранних сроках беременности экспрессия металлопротеиназы 2 типа начинается раньше, чем металлопротеиназы 9 типа. По нашим данным, в начале I триместра беременности металлопротеиназа 2 типа синтезируется во всех инвазивных клетках: лучше всего в эндоваскулярных (2,99 балла), слабее - в интерстициальных(1,81 балла), еще слабее – в многоядерных гигантских клетках (1,42 балла). Металлопротеиназа 9 типа в этом сроке хорошо экспрессируется только в эндоваскулярных клетках (2,47 балла), хотя и слабее, чем металлопротеиназа 2 типа. В интерстициальных и многоядерных гигантских клетках до 8-9 недели гестации синтез металлопротеиназы 9 типа остается на минимальном уровне (1,0 балл). Известно, что на 8-9 неделе гестации плод переходит на аэробный обмен веществ с использованием кислорода. Гистиотрофный тип питания плода меняется на гемохориальный транспорт кислорода через плаценту, после чего инвазия постепенно начинает набирать темп: клетки становятся крупнее, возрастает число ядер в многоядерных гигантских клетках, постепенно усиливается экспрессия металлопротеиназы 9 типа. Возможно, именно кислород является тем фактором, который стимулирует этот процесс. Наблюдается прирост массы эмбриона и плаценты (табл. 14), начиная с 6-ой нед. (п.о.) и быстро увеличиваясь на 8-10-ой нед. Этот гестационный отрезок преобладающего роста плаценты соответствует появлению первой генерации якорных ворсин с пролифератами цитотрофобласта и дальнейшим его продвижением вглубь децидуальной оболочки матки за счет экспрессии металлопротеиназ и лизиса матрикса стромы эндометрия.

Таблица 14

Средняя длина, масса эмбрионов и их плацент в I триместре нормальной беременности (А.П.Милованов, 1999)

Гестационный возраст (недели) /лунные месяцы	Теменно-крестцовый размер, мм	Масса эмбриона, г	Масса плаценты, г	Диаметр зародышевого мешка, мм
3/II	2,5			5-12
4/II	5			13-21
5/II	9			22-28
6/II	14	1	6	29-34
7/III	20	2	8	35-42
8/III	26	5	14	43-58
9/III	33	11	19	59-64
10/III	40	17	26	65-68

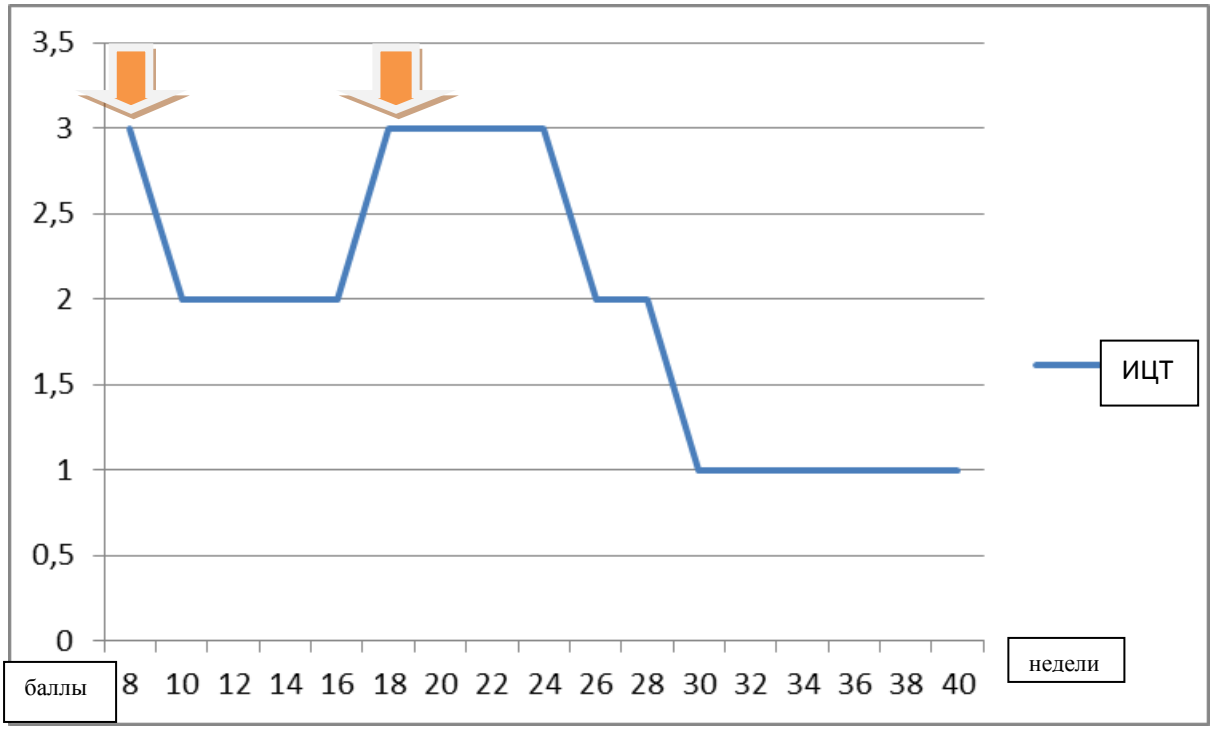
В проведенном исследовании при сравнении гестационных групп 7-8 недель и 9-12 недель по методу Манна-Уитни выявлено, что интенсивность экспрессии металлопротеиназы 9 типа в эндоваскулярном цитотрофобласте и в интерстициальном вневорсинчатом цитотрофобласте достоверно возрастают ($p<0,05$).

В какой же степени полученные морфометрические данные иммуновизуализированных инвазивных клеток можно соотнести с ранее полученными материалами? Среди них в большей степени подходит фундаментальное исследование R. Pijnenborg с колл. **[120]** на материале 49 ампутированных маток в сроке от 8-18 недель п.м. В условно выделенных ими волнах цитотрофобластической инвазии первый пик приходился на 6-8

недели гестации, то есть на 4-6 нед. п.о. Если учитывать, что первые наши случаи относились к 7-8 нед. п.о., то в сопоставимом отрезке максимальное количество интерстициального цитотрофобласта в стандартном поле маточноплацентарной области совпадает отчасти с данными R.Pijnenborg. Следовательно, упомянутый им пик инвазии нужно продолжить до конца I триместра, поскольку максимальная плотность ИЦТ отмечена на 9-12 нед. (п.о.). К сожалению, в работе R. Pijnenborg не анализировались отдельно многоядерные гигантские клетки. По нашим данным, в рассматриваемом п.о. сроке их количество самое малое за весь период гестации. В целом представленные данные совпадают с максимумом цитотрофобластической инвазии, по оценке А.П.Милованова, А.К.Кириченко **[8]**, использующего бальную шкалу (табл.15).

Таблица 15

Интенсивность интерстициальной цитотрофобластической инвазии в I, II и III триместре беременности (А.П.Милованов, А.К.Кириченко,2010г)



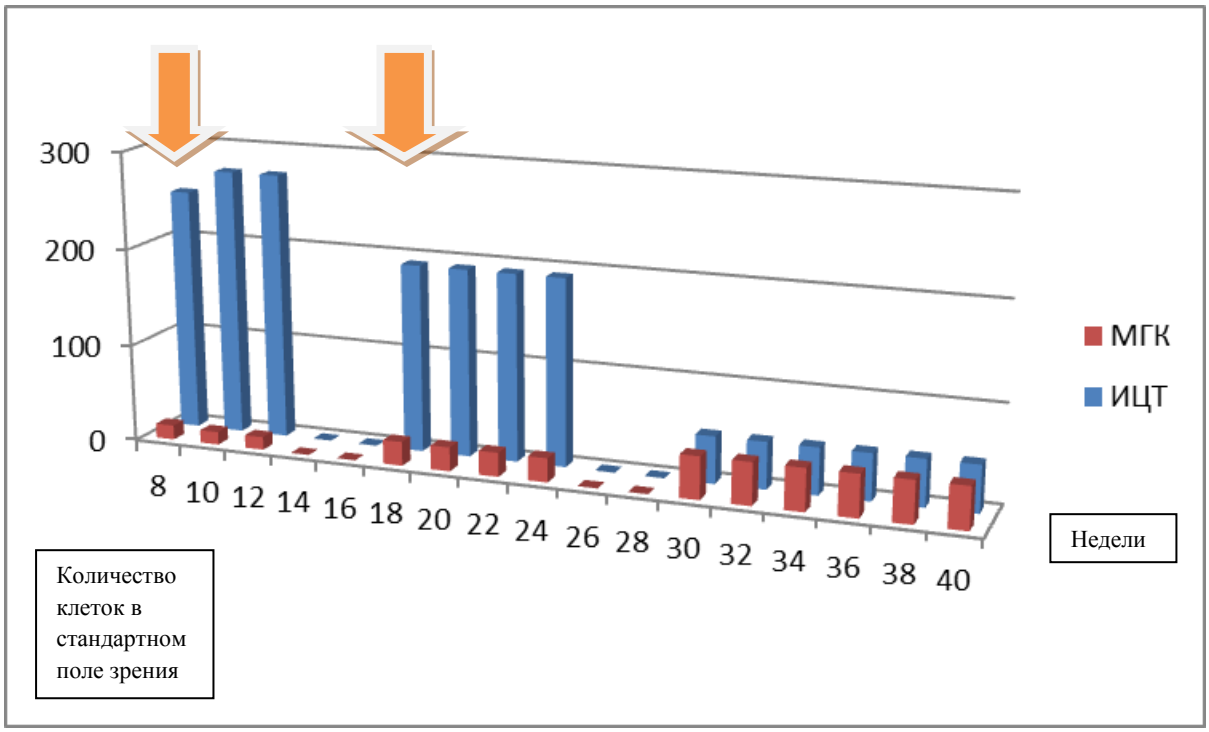
Стрелками (↓) показаны пики активности инвазии по наблюдениям R.Pijnenborg (1980)

В исследовании А.К.Кириченко был изучен только интерстициальный и эндоваскулярный компонент инвазии, многоядерные гигантские клетки не рассматривались. На табл. 16 представлены наши данные (количество клеток ИЦТ и МГК в поле зрения).

Таблица 16

Количество интерстициального цитотрофобласта и многоядерных гигантских клеток в поле зрения при неосложненной беременности.

(А.П.Милованов, И.М.Расстригина, Е.И.Фокина, 2013г)



Стрелками (↓) показаны пики активности инвазии по наблюдениям R.Pijnenborg (1980)

Иными словами, речь идет о наибольшем количестве инвазирующего интерстициального цитотрофобласта в небольшом поле соприкосновения плаценты и децидуальной оболочки матки в I триместре беременности. Этого оказывается достаточно для гестационной перестройки пока малочисленных спиральных артерий, которые теряют эластомышечные компоненты стенок, но сохраняют относительно узкий их просвет. Главное влияние третьего инвазивного типа - внутрисосудистого цитотрофобласта направлено на

формирование цитотрофобластических пробок, которые призваны задерживать форменные элементы крови матери, но способствовать проникновению плазмы и других полезных веществ в межворсинчатое пространство **[6]** до тех пор, пока не начнется гемохориальный тип обмена плода. Следовательно, гистометрия разных типов инвазивных клеток позволила продлить время первой волны ЦТИ до конца I триместра, а также уточнить сроки второй волны, продолжив её до 25 нед. (п.м.).

О функциональной активности инвазивных клеток можно с уверенностью говорить по степени экспрессии ими ММР-2 и -9. В ранних исследованиях подробно описан металлопротеиназный каскад во время погружения бластоцисты через маточный эпителий вглубь эндометрия **[61].** В то же время иммуноэкспрессия этих металлопротеиназ во время первой волны ЦТИ описана фрагментарно, в основном на обезьянах и рассматривается в целом без экстраполяции на отдельные инвазивные типы клеток. По нашим данным, максимальная иммуноэкспрессия ММР-2 при бальной её оценке выявляется во внутрисосудистом цитотрофобласте, который составляет основную массу цитотрофобластических пробок в просветах спиральных артерий эндометрия. На втором месте оказываются многочисленный интерстициальный цитотрофобласт и лишь минимальная иммуноэкспрессия ММР-2 видна в многоядерных клетках, что вероятно отражает основные направления или пути распространения ЦТИ в I триместре.

Иммуноэкспрессия ММР-9 выявляется иначе: умеренная её интенсивность в баллах обнаружена только в составе цитотрофобластических пробок и лишь в минимальной степени обнаруживается в ИЦТ и МГК, достоверно увеличиваясь к концу I триместра.

Таким образом, в I триместре беременности интерстициальный вневорсинчатый цитотрофобласт является самым многочисленным

элементом цитотрофобластической инвазии, определяющим её ход в пределах децидуальной оболочки. Наибольшее количество этих инвазивных клеток в стандартной площади маточноплацентарной области наблюдается на 9-12 неделе гестации, то есть в самый ответственный момент перехода на гемохориальный тип обмена «плацента-плод». Гистометрия размеров инвазивных клеток показала, что самым крупным инвазивным типом служат многоядерные гигантские клетки. Функционально активным элементом инвазии I триместра являются клетки эндоваскулярного цитотрофобласта, причем определяющим ферментом I триместра оказывается металлопротеиназа 2 типа, так как металлопротеиназа 9 типа в этом сроке экспрессируется не во всех инвазивных элементах и не столь активно.

Во II триместре инвазирующие клетки рассеиваются, занимают все больше и больше площади, переходят из эндометрия в миометрий. Количество интерстициального цитотрофобласта в стандартной площади среза в связи с этим несколько уменьшается. Если вновь обратиться к таблице 15, можно заметить, что по данным Кириченко А.К. на 18 неделю гестации второго триместра приходится пик инвазии, на те же сроки указывает и R. Pijnenborg **[120]**. Мы наблюдали интенсивную инвазию без спадов с 18 по 24 неделю гестации (п.м.) В размерах интерстициальный цитотрофобласт увеличивается незначительно, но по-прежнему происходит увеличение размеров и количества ядер в гигантских клетках. Металлопротеиназа 2 типа экспрессируется во всех клетках: лучше всего - в эндоваскулярных, слабее в интерстициальных, еще слабее – в многоядерных гигантских клетках. Последовательно увеличивается экспрессия металлопротеиназы 9 типа. Во II триместре идет активная перестройка радиальных артерий в составе нижней трети миометрия, увеличение просветов, истончение стенок. Важно отметить содружественное действие эндоваскулярного и интерстициального компонента инвазии. Для успешной

перестройки необходим лизис эластических и мышечных компонентов как снаружи, так и изнутри сосудистой стенки.

В структурном отношении плацента II триместра готова утилизировать постоянный маточно-плацентарный кровоток и обеспечивать быстрый прирост массы раннего плода (табл. 17).

Таблица 17

Данные антропометрии, масса плода и плаценты во II триместре нормальной беременности (BenirschkeK., KaufmannP., 1990)

(цит. по Милованову А.П.[6])

Гестационный возраст (pm), нед / лунные месяцы		Теменно-крестцовый размер, мм	Масса плода, г	Масса плаценты, г
13	IV	48	23	30
14		56	30	42
15		65	40	50
16		75	60	65
17	V	88	90	80
18		99	130	90
19		112	180	100
20		126	250	115
21	VI	137	320	130
22		150	400	150
23		163	480	170
24		176	560	185
25	VII	188	650	195
26		200	750	210
27		213	870	230
28		226	1000	250

На 16 неделе масса плаценты и плода приблизительно равны (≈ 60-65г). На 17-20 неделе плод интенсивно прибавляет в массе по сравнению с плацентой (плод – с 90 до 250г, а плацента с 80 до 115-120г). Поразительной оказывается эффективность второй волны ЦТИ (по нашим данным с 18 по 25-ую нед. беременности), когда к концу II триместра масса плаценты прибавляет после 18-ой нед. в 2,5 раза, достигая 250г, а плод – почти в 7 раз (со 130г до 1000г).

Для таких значительных изменений, несомненно, необходимы и энергия и питательные вещества, которые несет материнская кровь. Ремоделирование сосудов матери – необходимое условие для нормального развития плода. Перестройка спиральных артерий эндометрия завершается, они достигают предела своих возможностей и необходима перестройка более глубоких и крупных по калибру радиальных артерий в нижней трети миометрия.

Закономерно возникает вопрос, каковы источники новых инвазивных клеток, необходимых для продвижения в зону, расположения радиальных артерий? Служат ли якорные ворсины плаценты функционально активными элементами инвазии именно I триместра, а в дальнейшем появляются иные источники инвазии или клетки цитотрофобласта по-прежнему отделяются во II и III триместре от первичных якорных ворсин?

Ответить на эти важные вопросы позволила группа плацент после поздних медицинских абортов. В начале II триместра беременности в маточноплацентарной области зафиксированы новые якорные ворсины с несколькими слоями интерстициального цитотрофобласта в их основаниях. Они были единственным источником этих клеток на протяжении дальнейших двух триместров беременности. Впервые показано, что имеет значение не только количество новых якорных ворсин, но и значительное увеличение площади соприкосновения их с материнской тканью. Основания якорных ворсин могут быть распластаны по границе с эндометрием, иметь подковообразную форму, то есть задействованы различные механизмы,

позволяющие увеличить зону контакта и возможность проникновения инвазивных клеток вглубь материнской ткани.

В III триместре цитотрофобластическая инвазия резко замедляется за счет снижения количества интерстициального цитотрофобласта (табл. 15). Этот факт отмечают в своей работе Милованов А.П. и Кириченко А.К (2010) **[8]**. Наша работа подтвердила это наблюдение – количество ИЦТ в поле зрения резко снижается, хотя их размеры изменяются незначительно. Количество и величина многоядерных гигантских клеток, напротив, постепенно растут и достигают максимума на 31-40 неделе.

К концу беременности экспрессия металлопротеиназы 9 типа в многоядерных гигантских клетках не ослабевает, а становится сравнимой с интерстициальным цитотрофобластом. Эндоваскулярный цитотрофобласт в III триместре встречается значительно реже, в виде единичных клеток в просветах радиальных артерий. Экспрессия металлопротеиназы 9 типа в них по-прежнему высокая. Важно отметить, что гестационная перестройка радиальных артерий к этому сроку уже завершена и объем крови, поступающий через них в межворсинчатое пространство плода максимальный. Этот ресурс к началу III триместра практически исчерпан. В то же время плод интенсивно растет, об этом можно судить по антропометрическим данным (табл. 18)

Если в III триместре масса плаценты увеличилась лишь в 2 раза (до 450-470 гг), то за это же время масса плода - в 3 раза (с 1003 г до 3400 г), такой интенсивный рост плода уже нельзя объяснить продолжающейся ЦТИ.

Возможно, для обеспечения потребностей плода включаются другие механизмы, например начинают функционировать синцитиокапиллярные мембраны в терминальных специализированных ворсинах **[6]**. В этих участках маточно-плацентарный барьер предельно истончается до размеров уплощенного синцитиотрофобласта, ядра которого отходят на периферию.

Таблица 18

Масса плаценты, плода в зависимости от срока гестации (А.К.Кириченко, М.И.Базина 2001год) [5].

Неделя гестации	Масса плода (г)	Масса плаценты (г)
28	1003	251
30	1218	286
32	1486	315
34	1700	355
36	2312	390
38	2750	400
40	3419	470

Такие мембраны могут обеспечивать более интенсивные обменные процессы между капилляром и эндотелием за счет ускоренной диффузии. Многоядерные гигантские клетки, которые непосредственно не участвуют в перестройке артерий, активно синтезируют металлопротеиназу 9 типа и количество их к концу беременности возрастает. По данным некоторых исследователей **[158],** металлопротеиназа 9 типа – ведущий фермент, задействованный в процессе родов, ответственный за желатинолитическую активность плодных оболочек **[156].** В доношенных случаях по сравнению с более ранними сроками беременности ММР-9 значительно повышена в плодных оболочках. Ворсины плаценты также имеют более высокий уровень ММР-9, чем в недоношенном сроке. В то время как между уровнями ММР-2 в доношенном и недоношенном сроке были найдены незначительные различия **[158].** Имеет большое значение, прошла ли плацента через роды. В этой ситуации в плодных оболочках регистрируется более высокий уровень ММР-9, чем в плаценте, не прошедшей через роды, например, при родоразрешении путем кесарева сечения. Подъем ММР-9 может упрощать

отделение плаценты от материнских тканей в родах. Возможно, увеличение количества многоядерных гигантских клеток в конце беременности – дополнительный источник этого фермента.

Исследования биопсий МПО, взятых во время кесарева сечения при тяжелой преэклампсии уже были проведены раньше **[87]**. Известно, что в основе преэклампсии лежит незрелость либо функциональная недостаточность инвазивных клеток. Это подтверждают работы последних лет Roberts J.M. (2012) **[134]** и Stark M. (2013) **[147].** Наши данные также наглядно свидетельствуют: количество и размеры ИЦТ достоверно ниже, чем в норме. Исследования показывают, что клетки эндоваскулярного цитотрофобласта при преэклампсии обнаруживаются редко. Следовательно, отсутствует второй компонент инвазии, участвующий в перестройке сосудистой стенки радиальных артерий. Эти данные позволяют судить о том, как важен эндоваскулярный компонент в процессе цитотрофобластической инвазии, поскольку при недостаточном лизисе эластического и мышечного компонента существует большая вероятность присутствия в составе стенки материнских сосудов мышц и нервов, сохраняющих регуляцию со стороны материнского организма, в том числе реакции с сосудорасширяющим и сосудосуживающим эффектами. Это неблагоприятная ситуация для развивающегося плода, поскольку для него важен стабильный маточноплацентарный кровоток.

Нами была исследована функциональная активность металлопротеиназ 2 и 9 типов у женщин, страдающих преэклампсией, в сроке 28-33нед. и в сроке 34-38нед. При сравнении между собой двух групп по методу Манна-Уитни наблюдается отсутствие снижения активности металлопротеиназы 2 типа (в норме в доношенном сроке она постепенно падает). В многоядерных гигантских клетках при этом заболевании в более позднем сроке она достоверно возрастает. Аналогичное сравнение двух групп патологии показало, что активность металлопротеиназы 9 типа достоверно снижается

($p<0,05$) к более позднему сроку и в интерстициальном цитотрофобласте и в многоядерных гигантских клетках. В норме к доношенному сроку она постепенно возрастает. Активность металлопротеиназ 2 и 9 типов в эндоваскулярном компоненте инвазии можно считать сниженной, поскольку при преэклампсии этот элемент практически отсутствует. Мы сравнили показатели группы доношенного срока при преэклампсии с группой нормы аналогичного срока. Выявлено достоверное ($p<0,05$) снижение активности экспрессии металлопротеиназы 9 типа в группе патологии по сравнению с нормой (метод Стьюдента, метод Манна-Уитни).

Нужно отметить, что в исследованиях последних лет **[3]** принято различать раннюю преэклампсию (до 34 недель гестации) и позднюю преэклампсию (после 34 недели гестации). Отмечается, что причиной в первом случае является неспособность цитотрофобласта осуществить гестационную перестройку спиральных и радиальных артерий (к этому есть генетическая предрасположенность), а во втором случае – причиной является состояние здоровья матери: возраст, метаболические нарушения и др. Во втором случае плод страдает меньше, но имеются препятствия для успешной инвазии. Наши данные подтверждают эту концепцию: в многих случаях ранней преэклампсии отмечено отсутствие инвазии цитотрофобласта в артерии эндометрия и миометрия. В случаях поздней преэклампсии инвазия была, но недостаточная.

Согласно литературным данным, данные об экспрессии фермента, полученные при исследовании сыворотки крови беременной, не несут в себе информации о функциональной активности клеток. Металлопротеиназы синтезируются в виде неактивных проферментов и их активация зависит от множества факторов.**[97,129,136,158].** Есть много работ, посвященных исследованию сыворотки крови беременных и оценке содержания ферментов в ней, но не стоит забывать, что в крови ферменты присутствуют в виде форм, инактивированных специфическими ингибиторами TIMP **[106],**

функционально они неактивны. Эти исследования показывают, что у женщин, страдающих преэклампсией, в крови повышен уровень инактивированной металлопротеиназы 2 типа **[95,106,108,111,114],** а также инактивированной металлопротеиназы 9 типа **[63,70,96,106].** Это говорит о том, что таким женщинам эти ферменты необходимы, они выявляются в большом количестве в крови, но не свидетельствует о том, что они «работают» в тканях.

Морфологических исследований относительно мало. Есть попытки оценить эффективность металлопротеиназ по скоплениям нелизированного ими коллагена в тканях. **[33,62,63]**. Для нас наибольшую ценность представляли данные иммуногистохимических исследований тканей плацент **[126,144].** Согласно им, при преэклампсии содержание всех форм металлопротеиназы 9 типа в тканях плацент низкое **[124,126].** Исследование клеток цитотрофобласта с помощью ПЦР и Вестерн-блоттинга показывают, что при преэклампсии синтез металлопротеиназы 9 типа в этих клетках снижен. Наши результаты подтверждают эти данные, с необходимой детализацией функциональной активности каждого элемента цитотрофобластической инвазии.

Таким образом, комплексная морфометрия в стандартной площади маточноплацентарной области, в частности количества её элементов, размеров, оценка иммуноэкспрессии различных металлопротеиназ в них позволила выделить два пика активности ЦТИ: в течение I триместра, а также во II триместре (18-25недель). Эти данные важны для теоретических рассуждений о значении ЦТИ в патогенезе преэклампсии, а также и для выбора оптимального времени профилактики и возможного лечения этого тяжелого акушерского осложнения. Это следует учитывать при разработке новых способов лечения этого тяжелого акушерского осложнения.

ВЫВОДЫ

1. Цитотрофобластическая инвазия – важнейший связующий и инициирующий процесс в репродуктивной системе «мать-плацента-плод»; для её реализации важны соотношения основных клеточных элементов, их металлопротеиназной активности в процессе неосложненной беременности и у женщин, страдающих преэклампсией.
2. В I триместре определяющим инвазивным типом клеток является интерстициальный цитотрофобласт с максимальным его количеством в стандартном поле зрения маточноплацентарной области на 9-12 неделе (п.о.) и последующим уменьшением этого показателя на 28,8% во II триместре, а затем - 75% к доношенному сроку. Одновременно отмечено достоверное увеличение диаметров его срезов через ядерную зону в конце I триместра.
3. Количество многоядерных гигантских клеток минимально в I триместре (в 20 раз меньше интерстициального цитотрофобласта), их число и размеры их постепенно возрастают во II и III триместрах и они становятся значимым инвазивным элементом к доношенному сроку.
4. Основным источником цитотрофобластической инвазии во II триместре служит новая генерация якорных ворсин с пластами цитотрофобласта в их основаниях. На 18-20 неделе (п.м.) отмечено увеличение зоны контакта с децидуальной оболочкой матки до максимума на 22-24 нед. и дальнейшим ослаблением этого процесса в III триместре с атрофией эпителия и склерозом стромы ворсин.
5. Металлопротеиназа 2 типа является существенным протеолитическим ферментом инвазии, она непрерывно экспрессируется во всех инвазивных клетках, начиная с I триместра и до 25 недели гестации, наиболее интенсивно в эндоваскулярном, слабее в интерстициальном цитотрофобласте, минимальная

иммуноэкспрессия – в многоядерных гигантских клетках. К концу беременности во всех инвазивных клетках интенсивность экспрессии ММР-2 снижается.

6. Металлопротеиназа 9 типа экспрессируется на высоком уровне во всех сроках беременности только в эндоваскулярном цитотрофобласте. Остальные инвазивные элементы до 18 нед. малоактивны и только в III триместре интенсивность экспрессии этого протеолитического белка в интерстициальном цитотрофобласте и многоядерных гигантских клетках возрастает.
7. У женщин, страдаюших преэклампсией, интерстициальный цитотрофобласт распределен в маточноплацентарной области неравномерно, суммарное количество его значительно ниже, чем в при неосложненной беременности (28,93%), для многоядерных гигантских клеток (73,04%). Размеры клеток в доношенном сроке при преэклампсии значительно меньше (интерстициальный цитотрофобласт 37,56%, а многоядерные гигантские клетки - 59,01%).
8. Экспрессия металлопротеиназ 2 и 9 типов при преэклампсии близка к минимальным значениям как в интерстициальном цитотрофобласте, так и в многоядерных гигантских клетках. В случаях ранней преэклампсии отмечена поверхностная инвазия цитотрофобласта в артерии миометрия. В случаях поздней преэклампсии наблюдалась недостаточная цитотрофобластическая инвазия.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Горбачева, Ю.В. Апоптоз клеток трофобласта при нормально развивающейся беременности. / Ю.В. Горбачева, И.Н.Волощук, М.А.Пальцев // Молекулярная медицина. – 2007. - №2. – с.3-8.
2. Воднева, Д.Н. Роль маркеров инвазии трофобласта в развитии преэклампсии и опухолевой прогрессии./ Д.Н.Воднева ,Р.Г.Шмаков, А.И. Щеголев// Акушерство и гинекология. – 2013. - №11.- с 9-12
3. Воднева Д.Н. Клинико-морфологические особенности ранней и поздней преэклампсии / Д.Н.Воднева и др.// Акушерство и гинекология. – 2014. - №2 –стр.35-40.
4. Волощук, И.Н. Патология спиральных артерий матки и её значение в патогенезе нарушений маточно-плацентарного кровообращения./ Вестн. АМН СССР. – 1991 - №5. – с.22-26.
5. Кириченко, А.К. Морфогенез цитотрофобластической инвазии при маточной и трубной беременности: автореф. дис… д-р.мед. наук: 14.00.33/ Кириченко Андрей Константинович – М., 2005 - с.
6. Милованов, А.П. Патология системы мать-плацента-плод: Руководство для врачей./ А.П. Милованов – Москва:Медицина, 1999 – 448с.
7. Милованов, А.П. Цитотрофобластическая инвазия – ключевой механизм развития нормальной и осложненной беременности: Монография./ А.П.Милованов, А.К. Кириченко - Красноярск:ГОУ ВПО КГМУ, 2009.-161с.

8. Милованов, А.П. Морфологическая характеристика второй волны цитотрофобластической инвазии. /А.П.Милованов., А.К. Кириченко //Архив патологии. - 2010. – том72. - №1.-с.3-6.
9. Милованов, А.П.Строение плаценты человека во IIи III триместрах беременности./А.П.Милованов, Л.П.Ерофеева, Н.В.Александрович, И.А. Золотухина//Морфология. – 2012. – том 142. - №5.
10. Милованов, А.П. Якорные ворсины – источники цитотрофобластической инвазии во IIтриместре физиологической беременности./ А.П.Милованов, И.М.Расстригина, Т.В. Фокина //Арх.пат. – 2012. – Вып.2 – с. 26-28.
11. Милованов, А.П. Качественная оценка интенсивности экспрессии металлопротеиназ 2 и 9 типов в клетках интерстициальногоцитотрофобласта, многоядерных гигантских клетках и клетках эндоваскулярногоцитотрофобласта на отдельных сроках условно неосложненной беременности и при преэклампсии./ А.П.Милованов, И.М.Расстригина, Т.В. Фокина.//Архив патологии - 2013 - №3 – с.18-21
12. Пальцев, М.А. Введение в молекулярную медицину: руководство для врачей / М.А.Пальцев - Москва: ОАО «Издательство «Медицина», 2004. - 465с.
13. Побединский, Н.М. Изучение кровотока в спиральных артериях центральной и периферической областей плацентарного ложа в III триместре нормально протекающей беременности. / Н.М. Побединский, И.Н.Волощук, Е.С.Ляшко // Вестник Российской ассоциации акушеров и гинекологов. – 2000. - №1. – с.15.

14. Расстригина, И.М. Интенсивность иммуноэкспрессии 2 и 9 металлопротеиназ в инвазивном цитотрофобласте в отдельных сроках неосложненной беременности и при преэклампсии. / Расстригина И.М. и др.// Арх. пат. – 2014. - №3 - с.24-29.
15. Сидорова И.С. Тяжелая преэклампсия – критическое состояние для матери и плода / И.С.Сидорова и др.// Акушерство и гинекология – 2013 -№12 – с.34-40.
16. Соболева, Г.М. Семейство матриксных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль./Г.М. Соболева,Г.Т.Сухих// Акушерство и гинекология. – 2007. - №1- с5-7.
17. Стрижаков, А.Н. Декомпенсированная форма плацентарной недостаточности: Избранные лекции по акушерству и гинекологии./ А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдова, Л.Д.Белоцерковская - Москва: Медицина, 1998 – с. 115-128.
18. Стрижаков, А.Н. Ультразвуковая диагностика в акушерской практике. / А.Н. Стрижаков, А.Т.Бунин, М.В.Медведев – Москва: Медицина, 1990. – 239с.
19. Стрижаков, А.Н. Сравнительный анализ доплерометрии и морфологического исследования плаценты и спиральных артерий в оценке гемодинамических нарушений в системе мать-плацента-плод/ А.Н. Стрижаков и др.// Акуш. игинек. – 1991. - №3. – с.24-31.
20. Стрижаков, А.Н. Дифференцированный подход к профилактике гестоза и плацентарной недостаточности у беременных группы высокого риска. / А.Н. Стрижаков и др.// Акуш. игинек. – 2000. - №3. – с14-17.

21. Стрижаков, А.Н. Потеря беременности./А.Н.Стрижаков, И.В. Игнатко//– Москва: МИА, 2007.-223с.

22. Ходжаева З.С. Ранняя и поздняя преэклампсия: парадигмы патобиологии и клиническая картина./З.С.Ходжаева, А.М.Холин, Е.М.Вихляева// Акушерство и гинекология -2013. - №10. – с.4-11.

23. Ходжаева З.С. Плацентарное ложе и преэклампсия./Ходжаева и др.// Акушерство и гинекология. – 2013. - №12 –с10-15.

24. Цыганов, С.Е Роль матриксных металлопротеиназ при протоковойаденокарциноме поджелудочной железы./ С.Е. Цыганов и др.// Арх. пат. -2012.-№1-с.16

25. Anteby,E.Y. Vascularendothelialgrowth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloprotemase-9./ E.Y. Antebyetal.// Mol. Hum. Reprod. -2004. - Apr;10(4) - c229-35

26. Anumba, D.O. Circulating levels of matrix proteases and their inhibitors in pregnant women with and without a history of recurrent pregnancy loss./D.O.Anumba et al.//ReprodBiolEndocrinol. - 2010 - Jun 16;8:62.

27. Apte, S.S. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22 / Apte SS, Mattei MG, Olsen BR.// Genomics. - 1994.- 19(1), Jan 1- p.86-90.

28. Ashton, S.V. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravilloustrophoblasts through Fas/FasL

interactions./ Ashton SV, Whitley GS, Dash PR et al. // J Arterioscler Thromb Vasc Biol.- 2005.- 25(1),Jan; p.102-8.

29. Bauer, S. Tumor necrosis factor- alpha inhibitor trophoblast migration thought elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explants cultures/S.Bauer et al.// J ClinEndocrinolMetab. – 2004 - Feb; 89(2) – c.812-22.

30.. Bellon,G.Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis./G. Bellon, L. Martiny, A. Robinet. //Crit. Rev.Oncol.Hematol. – 2004. - Mar;49(3) – c.203-20.

31. Biron-Shental, T. Hypoxia enhances the expression of follistatin-like 3 in term human trophoblasts/ Biron-Shental T. et al. // Placenta.- 2008. -29(1), Jan, p.51-7.

32. Bishhof, P. Amniotic fluid and plasma concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) throughout pregnancy: comparison with other fetoplacental products./ P. Bishhof et al // Br. J ObstetGynaecol -1982.- 89 (5) – p.358-63.

33. Bishop, J.E. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload./J.E.Bishop et al//Cardiovasc Res.-1994 -Oct;28(10) –p.1581-5.

34. Boyd, J.D. The giant cells of the pregnant human uterus / J.D.Boyd, W.J.Hamilton// J ObstetGynaecol Br Emp.- 1960. - Apr;67- p.208-18.

35. Brosens, I. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy/ I.Brosens, W.B.Robertson,H.G. Dixon // J PatholBacteriol. -1967.- Apr;93(2)- p.569-79.

36. Brosens, I. The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders? / I.Brosens et al.// Hum. Reprod. – 2010. – Mar; 25 (3): 569-74.

37. Bryant-Greenwood, G.D. Control of peripartalcollagenolysis in the human chorion-decidua. / G.D.Bryant-Greenwood, S.Y.Yamamoto// Am J Obstet Gynecol. -1995 Jan;172(1 Pt 1)-p.63-70.

38. Bulla, R. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries / R.Bulla et al. // J Exp Cell Res.- 2005. - Feb 1;303(1) – p.101-13.

39. Burton, G.J. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy / G.J. Burton et al //J ClinEndocrinolMetab. -2002. - Jun;87(6)- p.2954-9.

40. Burton, G.J. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function/ G.J.Burton et al//J Anat.- 2009. - Jul;215(1)- p.27-35.

41. Burton, G.J. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy / G.J.Burton, A.W.Woods, E. Jauniaux // Placenta.- 2009.- Jul;30(6)- p473-82.

42. Caluwaerts S. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. /S. caluwaerts et al. // Placenta. – 2005. – Aug; 26(7) – p.574-84.

43. Carmeliet, P. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis / P.Carmeliet et al//.- Nature.- 1998. - Jul 30;394(6692) – p.485-90.

44. Carter, A.M. Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies--a review. / A.M.Carter et al // Placenta.-2000. - Mar-Apr;21- Suppl A – p.31-7.

45. Cavicchia, J.C. Junctional complexes in the trophoblast of the human full term placenta / Cavicchia J.C. et al//J. Anat. -1971.- Feb;108(Pt 2) - p339-46.

46. Chen, Q. Interaction of Jar choriocarcinoma cells with endothelial cell monolayers / Q. Chen et al. // Placenta.- 2005. - Sep-Oct;26(8-9) – p.617-25.

47. Cockle, J.V.Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications./J.V.Cockleet al.//Reprod Sci.2007 Oct;14(7) – p.629-45.

48. Coussens, L.M.Matrix metalloproteinases and the development of cancer./L.M.Coussens, Z.Werb//Chem Biol. – 1996. - Nov;3(11). p.895-904.

49. Cronier, L. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin / L.Cronier, B.Bastide, J.C.Hervé // Endocrinology. – 1994. - Jul;135(1) – p.402-8.

50. Damsky,C.H. Distribution Patterns of Extracellular Matrix Components and Adhesion Receptors Are Intricately Modulated during First Trimester Cytotrophoblast Differentiation along the Invasive Pathway, In Vivo./ – C.H. Damsky//J. Clin. Invest.-1992.- Vol. 89.- p.210-222.

51. Demir-Weusten, A.Y. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta./A.Y. Demir-Weusten et al.// ActaHistochem. -2007. - 109(5) – p.403-12.

52. De Wolf, F. The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries./F. De Wolf et al.// Am. J. Obstet. Gynaecol. – 1980. – May 1; 137(1): 58-70.

53. De Wolf, F. Ultrastructure of uteroplacental arteries./ F. De Wolf, I. Brosens, W.B. Robertson // Contrib. Gynecol. Obstet. – 1982. – 9 –p.86-99.

54. Dimo, B,.Comparative study of the immunohistochemical expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 between clearly invasive carcinomas and "in situ" trophoblast invasion/ B. Dimo et al// Med. Oncol – 2012. Sep;29(3) –p.2270-5.

55. Dixon, H.G. A study of vessel of the placental bed in normotensive and hypertensive women. // J. Obstet. Gynaecol. Brit. Emp. – 1958. - №65, p.803-809.

56. Doridot, L. Trophoblasts, invasion and microRNA. / L. Doridot, Miralles F., Barbaux S., Vaiman D. // Front Genet. – 2013. – Nov21; 4 – p. 248.

57. Eastabrook G. The role of decidual natural killer cells in normal placentation and in the pathogenesis of preeclampsia./ G.Eastabrook, Y.Hu, Dadelszen P.// J. Obstet. Gynaecol. Can. -2008. – Jun; 30(6). – p.467-76.

58. Enders A.C. Interstitial trophoblast cells: an enigmatic and variable component of the developing macaque placenta. / A.C. Enders, T.N.Blankenship // Placenta. – 2012. – Sep; 33(9) – p.672-6.

59. Fernandez P.L. Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. An integrated view./P.L.Fernandes et al.// Lab.Invest. – 1992. – May; 66(5): 572-9.

60. Fournier T. PPARgamma and early human placental development./ T. Fournier et al. // Curr. Med. Chem. – 2008. – 15(28). – p.3011-24.

61. Fuller E.G. Migration of intravascular trophoblast cells in uterine arteries of the golden hamster: a scanning electron microscopic study. / E.G. Fuller et al. // J. Morphol. – 1994. – Jun;220(3). – p.307-13.

62. Galewska, Z. Pre-eclampsia (EPH-gestosis)-induced decrease of MMP-s content in the umbilical cord artery./Z. Galewskaet al.//ClinChimActa. - 2003. - Sep;335(1-2). – p.109-15.

63. Galewska,Z.Gelatinase matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 of the umbilical cord blood in preeclampsia./Z. Galewskaet al.//ClinChem Lab Med . – 2008- 46(4). – p.517-22.

64. Galliano, M.F. Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha -

actinin-2, is required for myoblast fusion. / M.F.Galliano et al. // J Biol Chem.- 2000. - May 5;275(18) – p.13933-9.

65. Genbacev, O. In vitro differentiation and ultrastructure of human extravilloustrophoblast cells./ O. Genbacev et al.// Placenta. – 1993. – Jul.-Aug; 14(4): 463-75.

66. Geusens, N. Endovascular trophoblast invasion, spiral artery remodeling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of preeclampsia. /N.Geusens et al.// Placenta. – 2008. – Jul; 29(7). – p.614-23.

67. Geusens, N. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodeling at term in a transgenic preeclamptic rat model. / N.Geusens et al.// Placenta. – 2010. – Apr; 31(4). – p.320-6.

68. Green, D.R. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 / D.R.Green, G.Kroemer // Nature.- 2009. - Apr 30;458(7242) – p.1127-30.

69. Goldberg, G.I. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin /G.I.Goldberg et al. // JBiol Chem. – 1992. - Mar 5;267(7) – p.4583-91.

70. Hamid, J. Ab. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 as potential biomarkers for gestational hypertension. / J. Ab. Hamid et al.// Singapore Med. J. - 2012. - 53 (10). – p.681.

71. Harris, L.K. Adhesion Molecules in Human Trophoblast – A Revew. II Extravillous Trophoblast. / L.K.Harris, Jones G.J., Aplin J.D. // Placenta. – 2009. – Apr;30(4). – p.299-304.

72. Harris, L.K. Trophoblast and vascular smooth muscle cell – derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodeling. / L.K.Harris et al. // Am J. Pathol. – 2010. – Oct.; 177(4) – p.2103-15.

73. Helige, C. Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: a quantative evaluation./ C. Helige et al// Hum. Reprod. – 2014. – Jan, 29(1). –p.8-17.
74. Hu, C. Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated with a higher expression and physical interaction of p53 and Bak / C. Hu, S.D.Smith, L.Pang // Placenta. - 2006. - Sep-Oct;27(9-10) – p.978-83.
75. Hu, Y. Decidual NK-cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. / Y.Hu et al.//J. Immunol. – 2006. – Dec. 15; 117(12). – p.8522-30.
76. Huisman, M.A. Matrix-metalloproteinase activity in first trimester placental bed biopsies in further complicated and uncomplicated pregnancies./Huisman M.A. et al.//Placenta.-2004.- Apr;25(4). – p.253-8.
77. Huppertz, B. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. /B.Huppertzet al. // Cell Tissue Res. – 1998. - Jan;291(1) – p.133-48.
78. Huppertz, B. Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia / B.Huppertz, et al.// Fetal DiagnTher. – 2008. - 24(3) – p.230-6.
79. Huppertz, B. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. / B. Huppertz, G. Weiss, G. Moser // J. Reprod. Immunol. – 2014. – Mar.; 101-102. – p.74-9.
80. Hurskainen, T. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization/T.Hurskainenet al. //J HistochemCytochem. -1996. - Dec;44(12) – p.1379-88.
81. Husslein, H. Expression, regulation and functional characterization of matrix metalloproteinase-3 of human trophoblast./ H. Husslein et al// Placenta. – 2009. – Mar.30(3). – p.284-91.

82. Jager, C.A. Matrix metalloprotease-9, placental syncytiotrophoblast and the endothelial dysfunction of pre-eclampsia./de Jager C.A. et al.// Placenta. -2003. - Jan;24(1). –p.84-91.

83. James J.L. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravilloustrophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model/ J.L.James, P.R.Stone, L.W.Chamley // Hum. Reprod.- 2006. - Oct;21(10)- p.2699-705

84. Jauniaux, E. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies./J.Hempstock et al. //Amer. J. Pathol. – 2003- v.162 - №1: p.115-125.

85. Ji L. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. / L. Ji et al // Mol. Aspects Med. – 2013. – Oct. 34(5). – p.981-1023.

86. Kadyrov, M. Increased fetoplacental angiogenesis during first trimester in anaemic women / M.Kadyrov, et al. // Lancet.- 1998. - Nov 28;352(9142) – p.1747-9.

87. Kadyrov, M. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravilloustrophoblast./ M. Kadyrov et al.// Placenta.- 2002.- Vol.24.-P.540-548.

88. Kadyrov, M. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction / Kadyrov M., Kingdom J.C., Huppertz B. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2006. - Feb;194(2) – p.557-63.

89. Kajihara T. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. / T. Kajihara, I. Brosens, O. Ishihara // Med. Mol. Morphol. – 2013. – Jun;46(2). – p.61-8.

90.Kaufmann P. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. / P. Kaufmann, S. Black, B. Huppertz // Biol. Reprod. – 2003. – Jul; 69(1). –p.1-7.

91.Kemp, B. Invasive depth of extravilloustrophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra and extrauterine implantation sites./B.Kemp et al.// Histochem. Cell. Biol. – 2002. – May; 117(5): 401-14.

92.Khong, T.Y. An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin./ T.Y. Khong, E.B.Lane, W.B.Robertson // Cell Tissue Res. – 1986. – 246(1): 189-95.

93.Kolben,M .Measuring the concentration of various plasma and placenta extract proteolytic and vascular factors in pregnant patients with HELLP syndrome, pre-/eclampsia and highly pathologic Doppler flow values./M. Kolbenet al.// Gynakol.GeburtshilflicheRundsch .- 1995. - 35 Suppl1. – p.126-31.

94. al-Lamki, RS.Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study/ R.S.al-Lamki, J.N.Skepper, G.J.Burton // Hum Reprod.- 1999. - Feb;14(2) – p.496-504.

95.Lavee, M. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia./M.Lavee et al.//ReprodBiolEndocrinol. -2009.- Aug 23.7. –p.85.

96. Li, J.K. Differences between the expression of matrixmetalloproteinase-2, 9 in preeclampsia and normal placental tissues./J.K. Li et al //Zhonghua Fu Chan KeZaZhi.-2007.- Feb;42(2). –p.73-5.

97.Lockwood, C.J. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor

alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells./Lockwood, C.J. et al// BiolReprod. -2008. - Jun;78(6).-p.1064-72.

98. Loke, Y.W. Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody / Y.W.Loke et al. // Tissue Antigens. – 1997. - Aug;50(2) – p.135-46.

99. Luizon, M.R.Epistasis among eNOS, MMP-9 and VEGF maternal genotypes in hypertensive disorders of pregnancy./M.R. Luizon et al.//Hypertens Res. -2012.- Sep;35(9). –p.917-21.

100. Lyall, F. Priming and remodeling of human placental bed spiral arteries during pregnancy – a review. / F. Lyall //Placenta. – 2005. – Apr:26 supl A: s31-6.

101. Majmundar, A.J. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress / A.J.Majmundar, W.J.Wong, M.C. Simon // Mol Cell. – 2010. - Oct 22;40(2) – p.294-309.

102. Maymon,E. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. /E.Maymon et al//Am. J. Obstet. Gynecol.-2000.- Oct;183(4).-p.914-20.

103. Mc Elrath, T.F. Blood protein profiles of infants born before 28 weeks differ by pregnancy complication./ Mc Elrath T.F. et al.//Am. J. Obstet.Gynecol . -2011.- May;204(5). –p.418

104. Meekins, J.W. A study of placental bed spiral arteries and trophpblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. / J.W. Meekins et al //J. Obstet. Gynaecol.-1994.- V.101.-p.669-674.

105. Merchant, S.J. Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction./S.J. Merchant et al.//J. Soc. Gynecol.Investig. – 2004.-Feb;11(2). –p.97-103.

106. Montagnana, M. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy./M.Montagnana et al.//J Clin Lab Anal. -2009.-23(2).-p.88-92.

107. Moser, G. Endovascular trophoblast an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models./ G. Moser et al.// Hum.Reprod. -2010. – May.25(5). – p.1127-36.

108. Myers, J.E.MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia./Myers, J.E. et al//Hypertens Pregnancy.- 2005. - 24(2).-p.103-15.

109. Nagase, H. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation./H.Nagase et al//Adv. Exp. Med. Biol.- 1996.-389.-p.23-31.

110. Naiker, T. Qantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia./T.Naiker et al.// Act. Obstet. Gynecol. Scand. – 2003. – Aug; 82(8): 722-9.

111. Narumiya H. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia./H.Narumiya et al//Hypertens Pregnancy.- 2001- 20(2).-p.185-94.

112. Naruse, K.Localisation of matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy./K.Naruse, G.E.Lash, B.A Innes.//Hum.Reprod.- 2009.- Mar; 24(3).-p.553-61.

113. Palei, A.C. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension./A.C. Palei et al// Clin. Diochem. -2008.-Jul; 41 (10-11).-p.875-80.

114. Palei, A.C. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy./A.C. Palei et al// Exp.Mol.Pathol. -2012.- Apr; 92(2).-p.217-21.

115. Palei, A.C. Effects of matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms on responsiveness to antihypertensive therapy of women with hypertensive disorders of pregnancy./A.C. Palei et al.// Basic Clin Pharmacol Toxicol. -2012.- Oct;111(4).-p.262-7.

116. Peng M. [Trophoblast cells invading the placenta bed and change of spiral arteries and microvessels in pre-eclampsia] / M. Peng et al.// Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2008. – Feb.; 33(2). – p.121-9.

117. Pereira, L. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity/ L.Pereira, E.Maidji, S.McDonagh // J Virol. – 2003. - Dec;77(24) – p.13301-14.

118. Pereza, N. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion./ N.Pereza et al.//Reprod Biomed Online.-2012.- May;24(5).-p.567-75.

119. Pijnenborg, R. Trophoblastic invasion of human deciduas from 8 to18 weeks of pregnancy./ R. Pijnenborg et al //Placenta.-1980. – V.1.-p.3-19.

120. Pijnenborg, R. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy / R.Pijnenborg, J.M.Bland, W.B. Robertson // Placenta. – 1981. - Oct-Dec;2(4) – p.303-16.

121. Pijnenborg, R. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. / R.Pijnenborg, L.Vercruysse, M.Hanssens // Placenta. – 2006. – Sep.-Oct.; 27(9-10). – p.939-58.

122. Pijnenborg, R. In vivo analysis of trophoblast cell invasion in the human. ./ R. Pijnenborg et al // Methods Mol. Med. – 2006. – 122. – p.11-44.

123. Pijnenborg, R. Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia and the red queen. / R.Pijnenborg, L.Vercruysse, M.Hanssens // Hypertens Pregnancy. – 2008. – 27(2). – p.183-96.

124. Plaks, V. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction./V.Plaks et al.//PNAS. – 2013. – July 2. – Vol.110 – no27 – 11109-11114.

125. Premuro F. Decreased endovascular trophoblast invasion in first trimester pregnancies with high-resistance uterine artery Doppler indices./ F. Premuro, N.J. Sebire, B. Thilaganathan // Hum. Reprod. – 2004. – Jan.; 19(1). – p.206-9.

126. Prochazkova, J.Monitoring of endothelial activation markers during physiological pregnancy./J.Prochazkova et al//Ceska Gynecol. -2010.- Apr; 75 (2).-p.92-100.

127. Qiao,C. Clinical significance of KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome of neonates./C.Qiao et al.// Zhonghua Fu Chan KeZaZhi. – 2005.- Sep;40(9).-p.585-90.

128. Qiu, Q. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPKsignalling pathways. /Qiu, Q. et al//Reproduction. -2004.- Sep;128(3).-p.355-63.

129. Raffero,J.D.Mairixmetalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease./ J.D. Raffero and R.A. Khalil//Biochemical Pharmacology.- 2004.- vol. 40.- pp. 56-59.

130. Rahimi, Z. MMP-9 (-1562 C:T) polymorphism as a biomarker of susceptibility to severe pre-eclampsia./ Z.Rahimi et al.//Biomark Med. -2013.- Feb;7(1).-p.93-8.

131. Red-Horse, K. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface / K.Red-Horseet al. // Clin Invest.- 2004. - Sep;114(6) – p.744-54.

132. Red-Horse, K. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation / K.Red-Horse, M.Kapidzic, Y.Zhou // Development. – 2005. - Sep;132(18) – p.4097-106.

133. Red-Horse, K. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation / K. Red-Horse et al. // Lymphat. Res. Biol. -2006. - 4(4) – p.229-42.

134. Roberts J.M. The placenta in preeclampsia. / J.M.Roberts, C.Escudero// Pregnancy Hypertens. – 2012 – Apr.1. – 2(2) – p.72-83.

135. Robson, S.C. Endovascular Trophoblast Invasion and Spiral Artery Tranformation: “tho wave” theory Revisited./ S.C. Robson et al//Placenta.- 2001.-V22.-A.25.

136. Romanowicz, L.Extracellular matrix remodeling of the umbilical cord in pre-eclampsia as a risk factor for fetal hypertension./ Romanowicz L., Galewska Z.//J Pregnancy. -2011.-p.542695.

137. Rosario, G.X. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion / G.X.Rosario, T.Konno, M.J. Soares// Dev Biol. – 2008. - Feb 15;314(2) – p.362-75.

138. Salafia, C.M. Morphometry of the basal plate superficial uteroplacental vasculature in normal midtrimester and at term / C.M.Salafia, J.C.Pezzullo, A.K. Charles // Pediatr. Dev.Pathol. – 2005. - Nov-Dec;8(6) – p.639-46.

139. Schiessl, B. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. / B. Schiessl et al // Placenta. – 2009. – Jan:30(1). – p.79-87.

140. Seeho, S.K. Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: the effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration./S.K.Seeho, J.H.Park, J.Rowe // Hum Reprod.- 2008. - May;23(5) –p.1170-9.

141. Seval, Y. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy./Y.Seval et al//ActaHistochem.-2004.-106(5).-p.353-62.

142. Sheppard, B.L. The ultrastructury of the arterial supply of the human placenta in early and late pregnancy. / B.L. Sheppard, J.Bonnar// J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. – 1974. – Jul; 81(7): 497-511.

143. Sheppard, B.L. An ultrastructural study of utero-placental spiral arteries in hypertensive and normotensive pregnancy and fetal growth retardation/ Brit. J. Obstet. Gynaecol // - 1981. – Vol.88. - №7. – p.695-705.

144. Shokrv M. Expression of matrixmetalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings. /M.Shokrv et al//ExpMolPathol. - 2009 - Dec;87(3).-p.219-25.

145. Sinai Talaulikar, V. Differences in collagen ultrastructure of human first trimester deciduasbasalis and parietalis: implications for trophoblastic invasion of the placental bed./ V. Sinai Talaulikar., et al// J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2014. – Jan; 40 (1). -p.80-8.

146. Soothill, P.W. Effect of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy / P.W.Soothill, K.H.Nicolaides, C.H. Rodeck // Fetal Ther. – 1986. - 1(4) – p.168-75.

147. Stark M. Histologic differences in placentas of preeclamptic/eclamptic gestations by birthweight, placental weight

and time of onset. / M. Stark, L.Clark, R.D.Craver//Pediatr. Dev. Pathol. – 2014. – Mar.13

148. Strongin,A.Y. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease./A.Y.Stronginet al//J. Biol. Chem. -1995.- Mar 10;270(10).-p.5331-8.

149. Suman, P. LIF-STAT signaling and trophoblast biology./ P. Suman, S.S. Malhotra, S.K. Gupta// Landes Bioscience. – 2013. – Oct./Nov./Dec; 214.- e25155.

150. Tuuli, M.G. Review: Oxygen and trophoblast biology-a source of controversy /M.G.Tuuli, M.S.Longtine, D.M. Nelson // Placenta. – 2011. - Mar;32Suppl 2 – p.109-18.

151. Vicovac, L. Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a modelof the early human placenta in vitro./ L. Vicovac, C.J. Jones, J.D.Aplin // Placenta. – 1995. – Jan; 16(1): 41-56.

152. deVirgiliis, G. The junctional pattern of the human villous trophoblast. A freeze-fracture study / G.de Virgiliis, M.Sideri, G.Fumagalli // GynecolObstet Invest. -1982. -14(4)- p.263-72.

153. Wang, G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia / G.L.Wang, G.L. Semenza // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. - May 1;90(9) – p.4304-8.

154. Wang, H. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2**,** -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (Macaca mulatto) during early pregnancy./H.Wang et al//BiolReprod. -2001.- Jul;65(l).-p.31-40.

155. Wang, Y. Placental trophoblast-derived factors diminish endothelial barrier function / Y.Wang et al.// J.Clin. Endocrinol. Metab.- 2004. - May;89(5) – p.2421-8.

156. Weiss, A. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. /AWeiss, Goldrnan S, Shalev E.//Front.Biosci. - 2007.- Jan 1;12.-p.649-59.

157. Xu, P.Expression of matrix metalloproteinase -2**,** -9 and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and matrix proteins in human placenta during the first trimester./P. Xu et al.//Biol. Reprod.- 2000.- Apr; 62(4).-p.988-94.

158. Xu, P.Expression of matrix metalloproteinase MMP-***2***and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor./P. Xu, N.Alfaidy, J.R.Challts// J.Clin.Endocrinol.Metab. - 2002 - Mar;87(3) –p.1353-61**.**

159. Yamamoto-Tabata, T. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro / T.Yamamoto-Tabataet al. //J.Virol. – 2004. - Mar;78(6) – p.2831-40.

160. Yang, Z.M. [Expression of KLF-8 and MMP-9 in placentas and their relationship with the pathogenesis of hreeclampsia]/ Z.M.Yang, et al// ZhonghuaTu Chan KeZaZhi. – 2013. – Ост; 48 (10): 755-8.

161. Yeh, I.T. Functional and morphological expression of trophoblast./ I.TYeh., R.J.Kurman// Lab. Invest. – 1989. – 61 – p.1-4

162. Zhou, Y. Increased depth of trophoblast invasion after chronic constriction of the lower aorta in rhesus monkeys / Y.Zhou et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1993 - Jul;169(1) – p.224-9.

163. Zhou, Y. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome / Y.Zhou et al. // Am. J.Pathol. -2002. - Apr;160(4) – p.1405-23.

164. Zhou, Y. Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and

VEGF-C / Y.Zhou., et al. //J. Dev. Biol. – 2003. - Nov 1;263(1) - p.114-25.