

Морфофункциональные, молекулярные и иммунологические изменения в плаценте и периферической крови при патологическом прикреплении плаценты

И.А. Куликов¹, К.А. Артемьева², А.П. Алексанкин², Е.Р. Милютин¹,
И.И. Степанова², Н.В. Низяева², Л.М. Михалева²

¹ ГБУЗ МО Видновский перинатальный центр, Видное, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Вростанием плаценты называют аномальную инвазию ворсин трофобласта в миометрий. Вростание плаценты является одним из основных осложнений, приводящих к неблагоприятным исходам беременности. Целью работы была характеристика морфофункциональных, молекулярных и иммунных изменений в плаценте и периферической крови при различных типах вростания плаценты.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие беременные (n=45), у которых по данным УЗИ было выявлено приращение (placenta accreta) (n=15) или вростание (placenta increta) (n=15) плаценты в стенку матки, и женщины группы сравнения без вростания плаценты (n=15) с рубцом на матке после перенесенного кесарева сечения, на сроке гестации 35–38 недель.

Выполняли патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование плаценты с использованием мышинных моноклональных антител к плацентарному α_1 -микроглобулину, трофобластическому $\beta 1$ -гликопротеину, плацентарному лактогену, протеиназе 3 и фактору некроза опухоли α . Оценку уровня плацентарного лактогена, трофобластического $\beta 1$ -гликопротеина, плацентарного α_1 -микроглобулина и протеиназы 3 в сыворотке крови проводили методом количественного иммуноферментного анализа. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом многоцветной проточной цитометрии.

Результаты. Установлено, что вростание плаценты сопровождается достоверным увеличением экспрессии всех исследуемых нами маркеров в ней по сравнению с экспрессией в группе с рубцом на матке без вростания. Максимальная экспрессия плацентарного α_1 -микроглобулина выявлена в группе placenta increta. В сыворотке крови пациенток с вростанием плаценты обнаружено значимое увеличение концентрации протеиназы 3, снижение уровня плацентарного α_1 -микроглобулина, а также увеличение содержания лактогена в группе placenta increta.

Заключение. При патологическом прикреплении плаценты в ее ворсинах отмечается функциональная избыточность плацентарных белков, а также локальное и системное усиление провоспалительного статуса. Нарушение баланса между плацентарными факторами защиты и агрессии, вероятно, будет являться предпосылкой к развитию патологической инвазии ворсин плаценты.

Ключевые слова: вростание плаценты, иммунный статус, плацентарные белки, протеиназа 3

Для корреспонденции: Наталья Викторовна Низяева. E-mail: niziaeva@gmail.com

Для цитирования: Куликов И.А., Артемьева К.А., Алексанкин А.П., Милютин Е.Р., Степанова И.И., Низяева Н.В., Михалева Л.М. Морфофункциональные, молекулярные и иммунологические изменения в плаценте и периферической крови при патологическом прикреплении плаценты. Клини. эксп. морфология. 2024;13(3):42–52. DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.42-52.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (№ 123030700104-3).

Статья поступила 15.05.2024. Получена после рецензирования 06.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Placental and peripheral blood changes in functional morphology and immunology in patients with placenta accreta spectrum

I.A. Kulikov¹, K.A. Artemyeva², A.P. Aleksankin², E.R. Milyutina¹,
I.I. Stepanova², N.V. Nizyaeva², L.M. Mikhaleva²

¹ Vidnoye Perinatal Center, Vidnoye, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Placenta accreta spectrum is an abnormal invasion of villous trophoblast into the myometrium and one of the most severe complications of pregnancy. We aimed to study morphofunctional, molecular, and immunological changes in the placenta and peripheral blood in various types of placenta accreta spectrum. *Materials and methods.* The study involved 45 pregnant women who underwent ultrasound examination at weeks 35–38. According to the ultrasound data, 15 women had placenta accreta and 15 women developed placenta increta. The comparison group included 15 pregnant women without placenta accreta spectrum with a uterine scar after cesarean section. Histological and immunohistochemical studies were performed on paraffin sections of the placentas. We used mouse antibodies to insulin-like growth factor-binding protein-1, pregnancy-specific β -1 glycoprotein, and human placental lactogen, proteinase 3 and measured them using ELISA. We also studied tumor necrosis factor. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was performed using flow cytometry.

Results. Placenta accreta spectrum is accompanied by increased intensity of IHC staining of placental villi for all the studied markers, in contrast to those in the comparison group. The maximum intensity of insulin-like growth factor-binding protein-1 staining was found in placenta increta. Increased serum concentration of proteinase 3 and placental lactogen (placenta increta) and decreased level of insulin-like growth factor-binding protein-1 were found in placenta accreta spectrum.

Conclusion. In placenta accreta spectrum, there is a functional redundancy of placental proteins and an increased pro-inflammatory status. An imbalance between aggressive factors are likely to contribute to pathological villous invasion.

Keywords: placenta accreta spectrum, immune status, placental proteins, proteinase 3

For correspondence: Natalia V. Nizyaeva. E-mail: nizyaeva@gmail.com

For citation: Kulikov I.A., Artemyeva K.A., Aleksankin A.P., Milyutina E.R., Stepanova I.I., Nizyaeva N.V., Mikhaleva L.M. Placental and peripheral blood changes in functional morphology and immunology in patients with placenta accreta spectrum. Clin. exp. morphology. 2024;13(3):42–52 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.3.42-52.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery” (No. 123030700104-3).

Received 15.05.2024. **Received in revised form** 06.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

Патологическим прикреплением (приращением, вращением, прорастанием) плаценты (placenta accreta spectrum, PAS) называют аномальную инвазию ворсин трофобласта в миометрий. PAS является одним из основных осложнений, приводящих к серьезным неблагоприятным исходам беременности и в ряде случаев к материнской смертности. Ведущим фактором риска развития PAS служит повреждение децидуальной оболочки, в основном связанное с предшествовавшим кесаревым сечением (КС). Выделяют три гистологических подтипа нарушения инвазии ворсин хориона: приращение к миометрию – placenta accreta, прорастание мышечной оболочки – placenta increta, прорастание стенки матки с вовлечением соседних органов – placenta percreta. Наиболее часто встречаются первые два подтипа PAS [1].

Из-за связи PAS с острыми и хроническими гипоксическими поражениями плаценты [2], повышени-

ем количества клеток вневорсинчатого трофобласта (ВВТ) в хорионическом диске PAS следует рассматривать как нарушение имплантации плаценты и инвазии трофобласта, а не только как децидуальный дефицит вследствие повреждения матки [3]. Инвазивный трофобласт выполняет множество важных функций, необходимых для фетоплацентарного развития, включая прикрепление плаценты к матке, регулирование иммунной толерантности матери и преобразование материнских спиральных артерий, обеспечивающих адекватное кровоснабжение межворсинчатого пространства. Трофобластическая миграция и инвазия во время нормального развития плаценты должны находиться под ауто- или паракринным взаимовлиянием различных видов молекул, таких как факторы роста и их рецепторы, цитокины, гормоны, молекулы адгезии и ферменты. В то же время ряд биологических молекул, секретируемых плацентой, способствует фетоплацентарному взаимодействию и контролирует

функции как самой плаценты, так и отдаленных мишеней в материнском организме, адаптируя кровообращение матери, развитие молочных желез во время беременности и обеспечивая трофику плода [4]. Плацентарный лактоген (ПЛ) секретируется на протяжении всей беременности и способствует регуляции секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы. Нарушенная секреция ПЛ может привести к плацентарной дисфункции и нарушению роста и развития плода [5]. Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы [6]. Плацентарный α ₁-микроглобулин (ПАМГ, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGF)-1, IGFBP-1) принимает участие в имплантации и росте плода [7, 8]. Повреждение децидуальной оболочки способствует иммунному дисбалансу на границе матери и плода, что может вести к аномальной инвазии трофобласта и усилению васкуляризации плаценты [9].

Патогенез PAS до сих пор полностью не изучен, и данные об иммунной дисрегуляции при этой патологии отсутствуют. Физиологическое провоспалительное состояние, связанное с ранними сроками беременности, характеризуется активацией циркулирующих нейтрофилов и усиливается при осложненной PAS беременности [10, 11]. PAS опасно прежде всего массивным кровотечением, которое может привести к диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови, полиорганной недостаточности и смерти матери. Диагностика PAS в настоящее время проводится с помощью ультразвукового исследования с чувствительностью от 77 до 87% и специфичностью от 96 до 98% [12]. Тем не менее функциональное состояние самой плаценты сложно оценить с помощью инструментальных методов исследования. Необходим поиск маркеров, отражающих патогенез PAS, с целью улучшения антенатальной диагностики и возможной профилактики этого грозного заболевания. Цель работы – оценить морфофункциональные, молекулярные и иммунные изменения в плаценте и периферической крови при различных типах врастания плаценты.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие беременные, у которых при проведении УЗИ было поставлено заключение о наличии приращения (pl. accreta) (n=15) или врастания (pl. increta) (n=15) плаценты в стенку матки, согласно клиническим рекомендациям [1, 13], и женщины группы сравнения с рубцом на матке после перенесенного КС, без врастания плаценты (n=15) со сроками гестации 35–38 недель.

Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 231 от 28.08.2023).

Критерии включения в группу pl. accreta / pl. increta

1. Одноплодная беременность.
2. Возраст беременной от 18 до 40 лет.
3. Наличие УЗ-критериев pl. accreta / pl. increta, подтвержденный патоморфологический диагноз после родоразрешения.
4. Родоразрешение путем операции кесарева сечения.

Критерии включения в группу сравнения

1. Физиологическая беременность, наступившая в естественном цикле, после предшествующего КС.
2. Оперативное родоразрешение по акушерским показаниям.

Патоморфологическое исследование

Фрагменты ткани плаценты пациенток были взяты из краевой, парацентральной, центральной зон плацентарного диска и зоны приращения/врастания в стенку матки. Полученные фрагменты размерами 1,5×1,5×1 см фиксировали в 10% растворе формалина, pH 7,4 («Биовитрум», Россия), в течение 24 часов, затем заливали в парафин. Далее из них изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Исследовали не менее 10 фрагментов.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли на парафиновых срезах плаценты. В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела (МАТ) к ПАМГ, ТБГ, ПЛ, Пр3, полученные в лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», как описано Н.А. Старосветской с соавт. [14], и ФНО α (1:100; ab220210, Abcam, Великобритания). Применяли систему детекции PrimeVision (ООО «ПраймБиоМед», Россия). По окончании инкубации срезы докрасивали гематоксилином Майера.

Интенсивность ИГХ окрашивания оценивали в единицах оптической плотности с применением светового микроскопа Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия) с цифровой фотокамерой при помощи программы ImageScoreM (Leica Microsystems, Германия) при \times 400 с анализом 20 полей зрения в каждом препарате, выделяя позитивно окрашенную зону и вычитая оптическую плотность фона пустого стекла и отрицательного контроля.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА для ПЛ, ТБГ и ПАМГ человека проводили согласно инструкциям производителя (ООО «Диатех-ЭМ», Россия). Концентрацию Пр3 выявляли в двухцентровом ИФА на 96-луночных полистирольных планшетах (Maxibinding, SPL Life Sciences, Республика Корея) с использованием мышинных МАТ (PR49, сорбированные в лунки планшета, PR45 в качестве конъюгата с пероксидазой хрена), полученных в лаборатории патоло-

гии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Использовалась цельная кровь из локтевой вены в объеме 2,7 мл, которую собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей ЭДТА в концентрации 1,6 мг/мл.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение процентного и абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+), естественных киллерных клеток (ЕКК) (CD56+) и В-клеток (CD19+), проводили методом многоцветной проточной цитометрии на анализаторе FC500 (Beckman Coulter, США). Использовались готовые коммерческие наборы мышиных МАТ: CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США) и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США). Для подсчета абсолютного количества Т-, В-лимфоцитов и ЕКК использовали набор реагентов для прямого определения лимфоцитов Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter, США). Подготовку лейкоцитов цельной крови к проточному цитометрическому исследованию проводили лизированием эритроцитов и фиксацией проб цельной крови с использованием набора реагентов IO TEST3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США). Для ежедневной проверки оптической системы и струйной автоматической проточного цитометра применяли Flow-Check™ Fluorospheres (Beckman Coulter, США).

Для каждой пациентки использовали две полипропиленовые пробирки Coulter (12×75 мм, Beckman Coulter, США). К 50 мкл (1×10^6 клеток) образцов крови добавляли 5 мкл меченых моноклональных антител и помещали в темное место при комнатной температуре на 15 минут. После инкубации лизировали эритроциты 1x IO TEST3 Lysing Solution в течение 15 минут в темноте. В полученную суспензию лимфоцитов вносили 50 мкл Flow-Count™ Fluorospheres и проводили оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов на анализаторе FC500. Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью проприетарного программного обеспечения: The jamovi project version 2.5 (Австралия, 2024). Нормальность распределения выборочных данных осуществляли согласно критерию Шапиро–Уилка. В связи с тем, что в большинстве групп данных распределение отличалось от нормального, результаты представляли в виде медианы и квартилей – Ме (Q25%; Q75%). Для оценки достоверности различий среди трех групп наблюдений использовали метод непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Апостериорные попарные сравнения осуществляли по методу Двасса–Стила–

Кричлоу–Флигнера (Dwass–Steel–Critchlow–Fligner, DSCF) с включенной поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Различия считали значимыми при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ отмечали тенденцию к значимости различий.

Результаты

В группе женщин с наличием приращения и вращающейся плаценты ворсинчатое дерево было в состоянии компенсации и соответствовало сроку гестации, значимые отличия в строении ворсинчатого дерева и соотношения типов ворсин не отмечены. Преобладали хорошо капилляризированные зрелые промежуточные ворсины, терминальные ворсины от единичных до 10–20% в зависимости от срока гестации. В группе PAS в области инвазии ворсин децидуальные клетки отсутствовали (рис. 1 А–С).

В результате исследования установлено, что в образцах плаценты от женщин с pl. accreta отмечалось достоверное повышение интенсивности ИГХ реакции с антителами к ТБГ, Пр3, ФНОα, ПАМГ и ПЛ, а в группе женщин с беременностью, осложненной pl. increta, наблюдали усиление ИГХ реакции на ФНОα, Пр3 и ПАМГ, а также тенденцию к ее усилению для ТБГ и ПЛ (рис. 2 А–О, табл. 1).

Интенсивность реакции на ПАМГ имела достоверные различия в группах с патологическим прикреплением плаценты и в контрольной группе с максимальной экспрессией в группе pl. increta, однако децидуальные клетки располагались неравномерно, присутствовали дистрофические изменения децидуальной оболочки, замещение ее депозитами фибриноида. Ввиду этого локальное повышение интенсивности реакции с антителами к ПАМГ, вероятно, носит компенсаторный характер.

В сыворотке крови беременных с диагнозом «патологическое прикрепление плаценты» обнаружили значимое повышение уровня Пр3 и снижение ПАМГ в обеих группах, снижение уровня ТБГ в группе pl. increta, тенденцию к увеличению содержания ПЛ в группе pl. accreta, а также значимое увеличение его уровня в группе pl. increta относительно группы несложненной беременности (табл. 2).

Методом проточной цитометрии определяли субпопуляции лимфоцитов периферической крови. При PAS в обеих группах выявили увеличение общего количества лимфоцитов, а также количества всех Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+) и В-клеток (CD3–CD19+). В группе pl. accreta было увеличено количество Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) и ЕКК (CD56+). Для оценки иммунорегуляторного баланса Т-клеток рассчитывали соотношение между хелперными (CD4+) и цитотоксическими (CD8+) Т-клетками. Выявили статистически значимое увеличение отношения Т-хелперов к Т-цитотоксическим клеткам в группе pl. accreta и тенденцию к его увеличению в группе pl. increta (табл. 3).

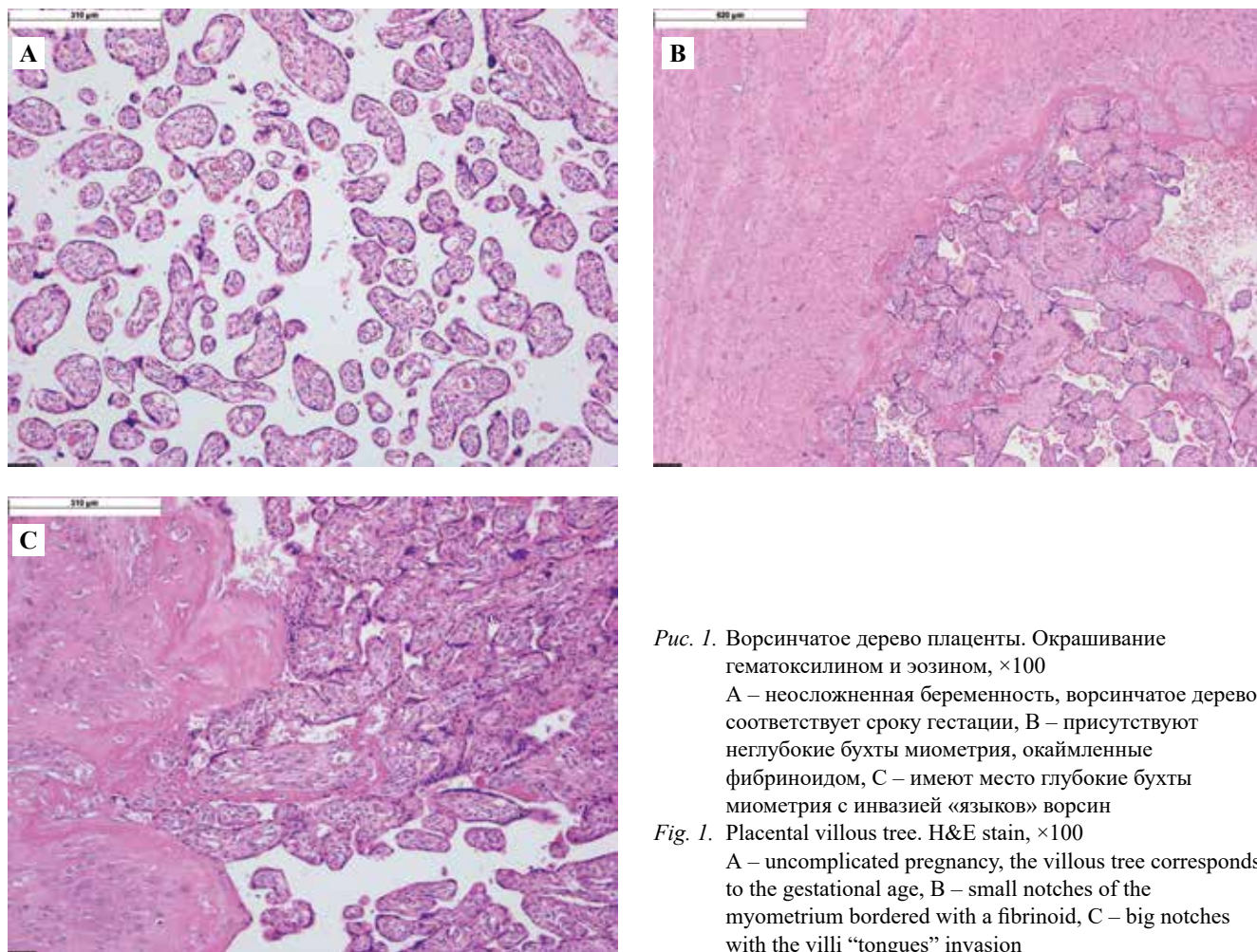


Рис. 1. Ворсинчатое дерево плаценты. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$

А – неосложненная беременность, ворсинчатое дерево соответствует сроку гестации, В – присутствуют неглубокие бухты миометрия, окаймленные фибриноидом, С – имеют место глубокие бухты миометрия с инвазией «язычков» ворсин

Fig. 1. Placental villous tree. H&E stain, $\times 100$

А – uncomplicated pregnancy, the villous tree corresponds to the gestational age, В – small notches of the myometrium bordered with a fibrinoid, С – big notches with the villi “tongues” invasion

Таблица 1 | Table 1

**Интенсивность ИГХ реакции на исследуемые маркеры в плаценте, ЕОП* |
Immunohistochemical expression of the tested markers in the placenta, ODU***

Группы Groups	ТБГ TBG	Пр3 PR3	ПАМГ IGFBP-1	ПЛ HPL	ФНО α TNF
Рубец на матке Scar on the uterus 1	54,96 (32,40; 84,00)	33,64 (29,83; 37,50)	61,48 (54,00; 64,00)	64,30 (58,18; 77,53)	29,40 (21,00; 35,04)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	72,24 (62,00; 79,00)	68,50 (52,70; 73,23)	85,28 (63,93; 94,47)	78,87 (73,00; 82,00)	35,46 (29,50; 41,42)
Врастание плаценты Placenta increta 3	64,28 (52,89; 72,93)	70,06 (63,83; 73,23)	99,61 (90,43; 107,70)	73,59 (65,29; 81,53)	36,81 (25,95; 42,00)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}=0,039$ $p_{1-3}=0,057$ $p_{2-3}=0,073$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,938$	$p_{1-2}=0,0002$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,001$	$p_{1-2}=0,019$ $p_{1-3}=0,055$ $p_{2-3}=0,057$	$p_{1-2}=0,017$ $p_{1-3}=0,022$ $p_{2-3}=0,98$

*ЕОП – единицы оптической плотности | ODU – optical density units

Таблица 2 | Table 2

Уровень плацентарных белков и протеиназы 3 в плазме крови | Serum levels of placental proteins and proteinase 3

Группы Groups	Пр3, нг/мл PR3, ng/ml	ТБГ, мкг/мл TBG, mkg/ml	ПАМГ, нг/мл IGFBP-1, ng/ml	ПЛ, мг/л HPL, mg/l
Рубец на матке Scar on the uterus 1	7,14 (5,03; 8,25)	237,15 (144,10; 349,20)	33,35 (26,65; 59,4)	10 (7,2; 12)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	13,1 (9,18; 16,43)	310,4 (164,20; 345,48)	15,25 (7,15; 21,53)	13 (5,9; 16,4)
Врастание плаценты Placenta increta 3	15,6 (9,65; 31,5)	202,6 (139,60; 244,08)	24,1 (16,9; 31,98)	18 (14,25; 19,75)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}=0,013$ $p_{1-3}<0,0001$ $p_{2-3}=0,022$	$p_{1-2}=0,144$ $p_{1-3}=0,22$ $p_{2-3}<0,001$	$p_{1-2}=0,012$ $p_{1-3}=0,017$ $p_{2-3}=0,22$	$p_{1-2}=0,09$ $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,18$

Таблица 3 | Table 3

Иммунофенотипирование клеток | Immunophenotyping

Группы Groups	Общее количество лимфоцитов ($\times 10^9/л$) Total number of T cells ($\times 10^9/l$)	(CD3+) Т-клетки, ($\times 10^9/л$) T cell, ($\times 10^9/l$)	(CD3+CD4+) Т-хелперы, ($\times 10^9/л$) T-helpers ($\times 10^9/l$)	(CD3+CD8+) Т-цитотоксические клетки, ($\times 10^9/л$) T-killers ($\times 10^9/l$)	Т-хелперы / Т-киллеры T-helpers / T-killers	В-клетки, ($\times 10^9/л$) B-cells (CD3-CD19+, ($\times 10^9/l$))	(CD56+) ЕКК, ($\times 10^9/л$) NK-cells, ($\times 10^9/l$)
Рубец на матке Scar on the uterus 1	0,80 (0,71; 0,88)	0,6 (0,5; 0,7)	0,3 (0,2; 0,33)	0,2 (0,1; 0,21)	1,4 (1,2; 1,6)	0,07 (0,05; 0,1)	0,08 (0,04; 0,1)
Приращение плаценты Placenta accreta 2	1,10 (1,03; 1,76)	0,9 (0,8; 1,5)	0,4 (0,35; 0,5)	0,3 (0,3; 0,55)	1,6 (1,33; 2,06)	0,1 (0,09; 0,15)	0,1 (0,1; 0,2)
Врастание плаценты Placenta increta 3	1,0 (1,07; 1,10)	0,80 (0,6; 0,93)	0,45 (0,35; 0,47)	0,2 (0,18; 0,28)	1,83 (1,0; 2,47)	0,09 (0,06; 0,2)	0,09 (0,07; 0,1)
Значимость различий p-value	$p_{1-2}<0,001$ $p_{1-3}=0,0022$ $p_{2-3}=0,59$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}=0,0004$ $p_{2-3}=0,59$	$p_{1-2}=0,0053$ $p_{1-3}=0,054$ $p_{2-3}=0,89$	$p_{1-2}<0,0001$ $p_{1-3}=0,062$ $p_{2-3}=0,01$	$p_{1-2}=0,02$ $p_{1-3}=0,061$ $p_{2-3}=0,92$	$p_{1-2}=0,047$ $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,970$	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,427$ $p_{2-3}=0,03$

Обсуждение

Известно, что риск врастания плаценты ассоциирован с увеличением частоты диагностических выскабливаний, операций кесарева сечения с формированием неполноценного рубца [1], однако проведенное патоморфологическое исследование показало, что плацента не имела значимых патологических отличий и соответствовала сроку гестации.

Установлено, что PAS сопровождается достоверным снижением сывороточного содержания ПАМГ в сыровотке крови и тенденцией к увеличению содержания

ПЛ в группе pl. increta, а также большей интенсивностью реакции в ворсинках на ТБГ и ПЛ в сравнении с группой неосложненной беременности. Наши данные согласуются с результатами работ А. Kawashima et al. и J. Li et al., показавшими, что медиана мРНК ПЛ в материнской плазме на сроке от 28 до 32 недель беременности была выше у женщин с предлежанием плаценты и PAS по сравнению с нормальной беременностью [12, 15]. Предположительно во время формирования плаценты клетки ВВТ имеют решающее значение для прикрепления плаценты к стенке матки;

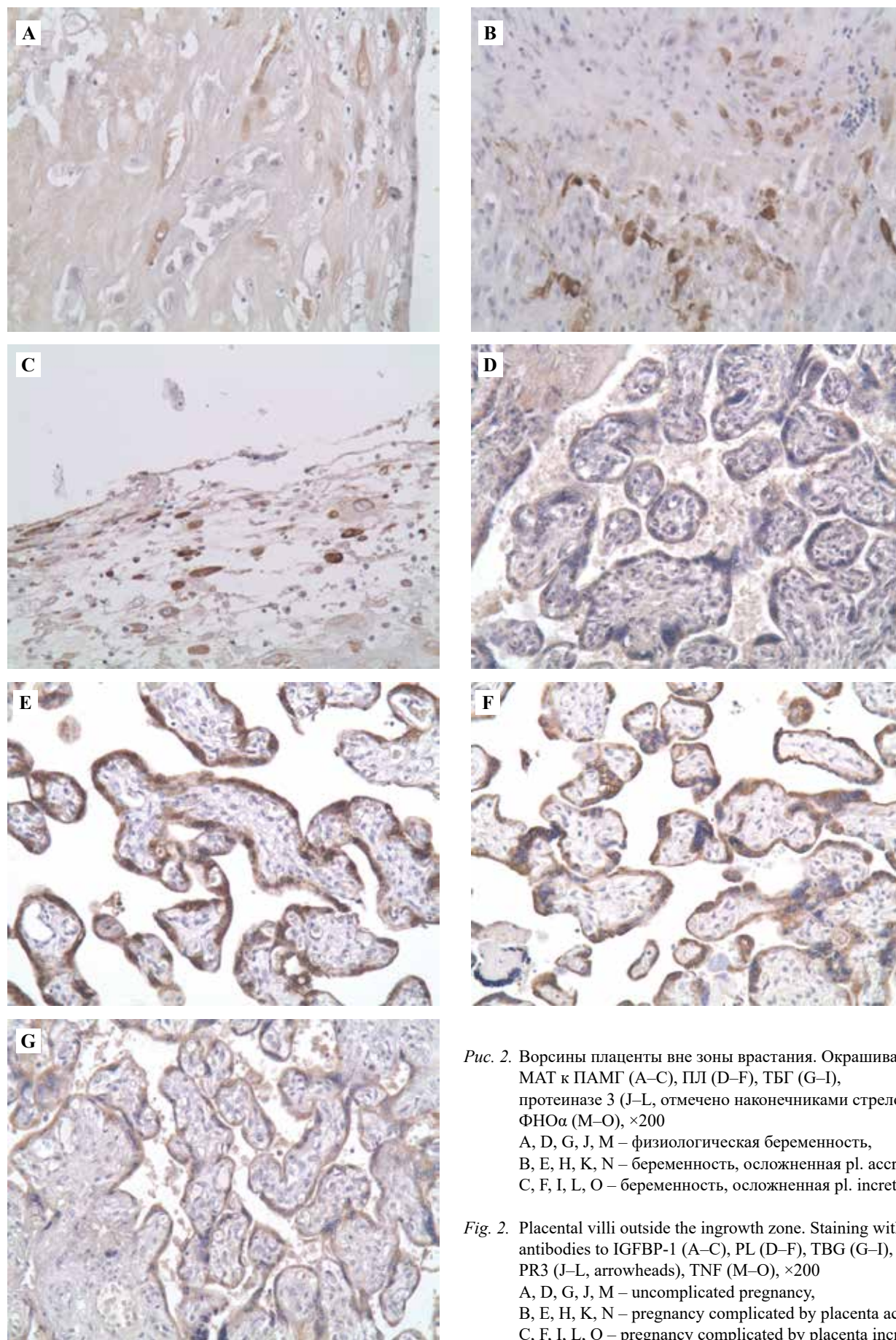
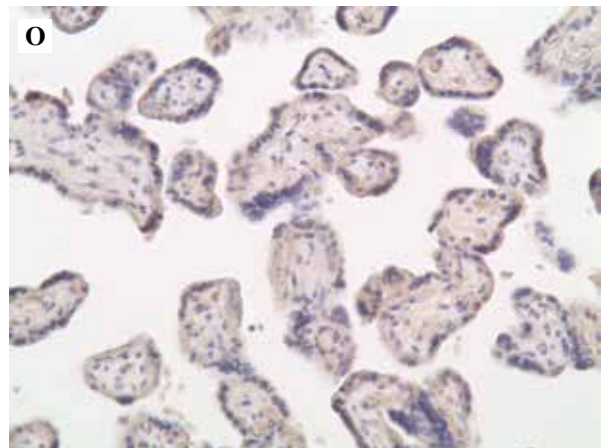
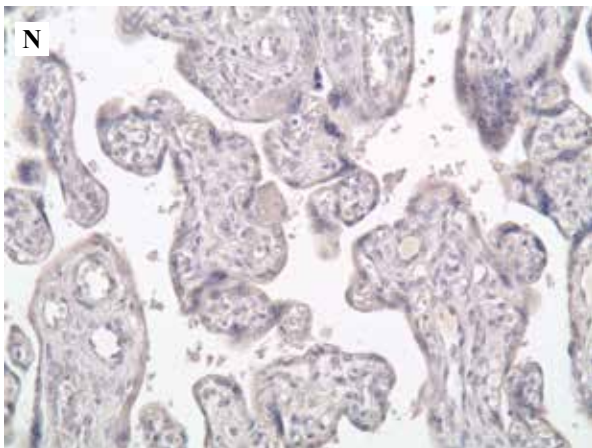
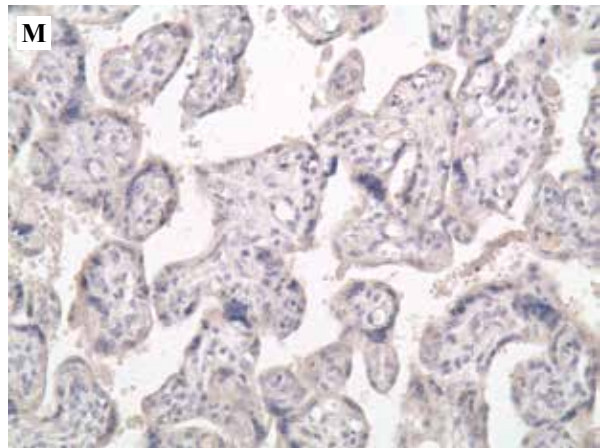
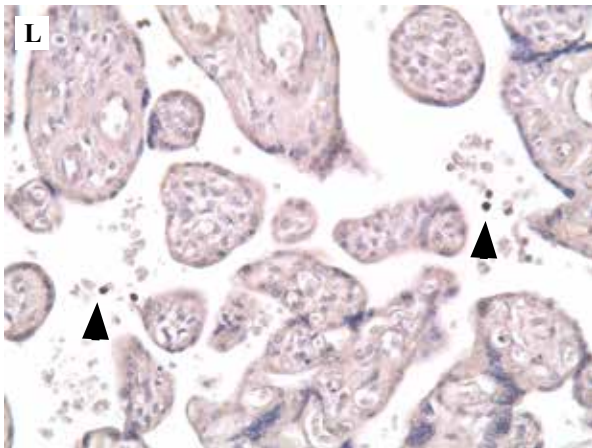
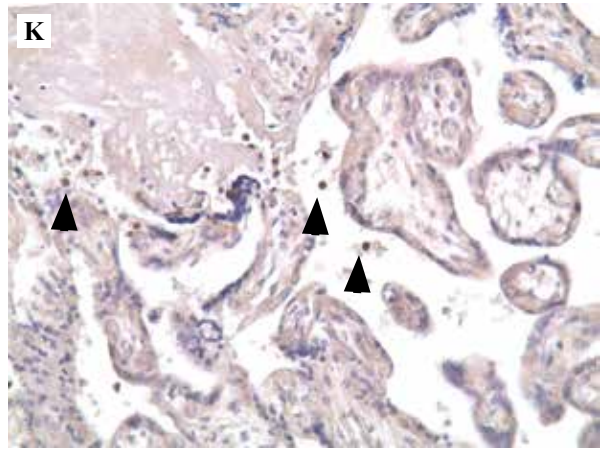
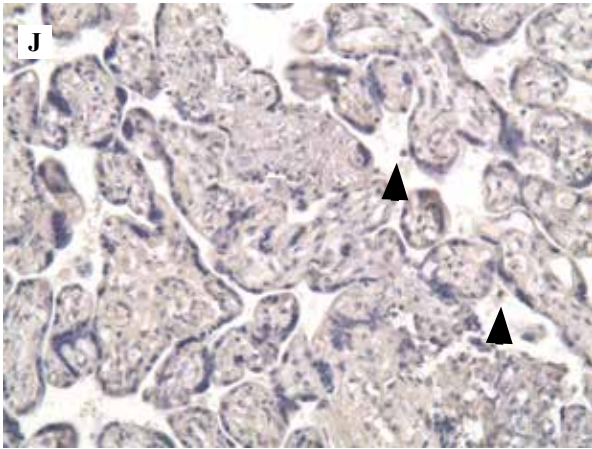
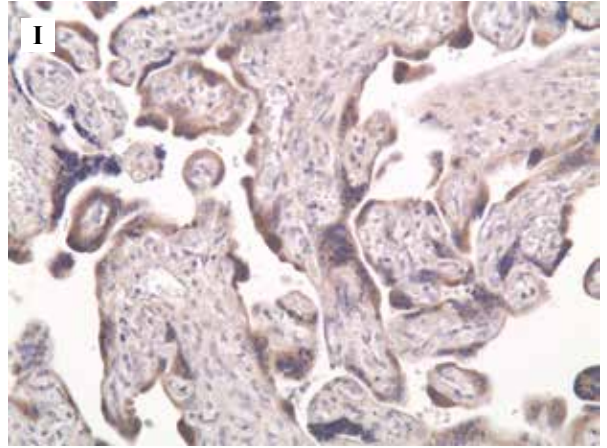
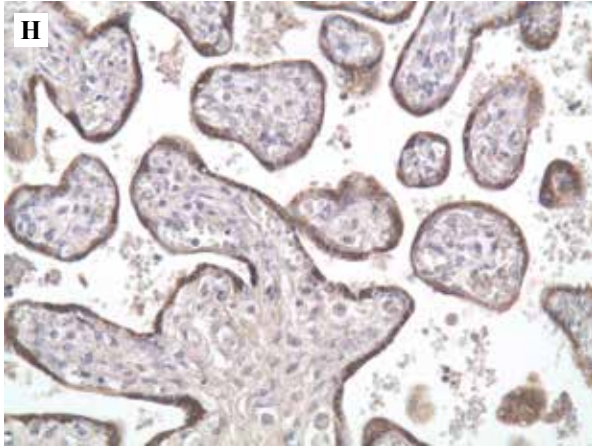


Рис. 2. Ворсины плаценты вне зоны вставания. Окрашивание МАТ к ПАМГ (А–С), ПЛ (D–F), ТБГ (G–I), протеиназе 3 (J–L, отмечено наконечниками стрелок), ФНО α (M–O), $\times 200$
 А, D, G, J, M – физиологическая беременность,
 В, E, H, K, N – беременность, осложненная pl. accreta,
 C, F, I, L, O – беременность, осложненная pl. increta

Fig. 2. Placental villi outside the ingrowth zone. Staining with antibodies to IGFBP-1 (A–C), PL (D–F), TBG (G–I), PR3 (J–L, arrowheads), TNF (M–O), $\times 200$
 A, D, G, J, M – uncomplicated pregnancy,
 B, E, H, K, N – pregnancy complicated by placenta accreta,
 C, F, I, L, O – pregnancy complicated by placenta increta



считается, что эти клетки продуцируют высокие уровни ПЛ. Вероятно, повышение уровня ПЛ у женщин с предлежанием плаценты или PAS может отражать патологическую активность этого процесса [12].

Усиление интенсивности реакции на ТБГ в ворсинах плаценты при PAS, возможно, носит компенсаторный, адаптивный характер. ТБГ известен как один из немногих биологических активаторов трансформирующего фактора роста (ТФР)- $\beta 2$ и, как предполагается, обладает противовоспалительными функциями [16]. В период беременности ТБГ участвует в становлении иммунной толерантности, стимулируя продукцию ИЛ-10 Т-регуляторными лимфоцитами с одновременным угнетением продукции ИЛ-17А Тх17-лимфоцитов [6]. Хотя в нашем исследовании отмечалась повышенная экспрессия ПАМГ в децидуальных клетках, само расположение их в децидуальной пластинке было неравномерным, децидуальная пластинка характеризовалась дистрофическими изменениями, замещением депозитами плодного фибриноида, поэтому, наиболее вероятно, локальное повышение экспрессии ПАМГ носило компенсаторный характер. В плазме крови уровень ПАМГ был снижен.

Известно, что ПАМГ стимулирует миграцию клеток ВВТ, по-видимому, путем связывания его домена Arg-Gly-Asp (RGD) с интегрином $\alpha 5 \beta 1$, что приводит к фосфорилированию киназы фокальной адгезии (ФАК) и MAPK (ERK-1 и ERK-2). Децидуальный ПАМГ может взаимодействовать с трофобластом, экспрессирующим IGF-II и секретирующим протеазу, для модулирования инвазии. Аутокринно-паракринное действие IGF-II может быть важно как для процесса инвазии, так и для нормального функционирования трофобласта и децидуальной оболочки [7, 8].

Мы выявили, что при PAS значимо увеличены как сывороточное содержание Пр3, так и интенсивность ИГХ на Пр3 и ФНО α в сравнении с группой физиологической беременности. Показано, что повышение уровня ФНО- α может способствовать миграции и инвазии клеток трофобласта. ФНО- α усиливает окислительный стресс и увеличивает количество TUNEL-положительных ядер, соотношение Вах/Vcl-2 и соотношение расщепленной каспазы-3/каспазы-3, одновременно снижая жизнеспособность клеток в первичной культуре трофобласта человека [17, 18]. Наряду с этим при гиперактивации нейтрофилы высвобождают в местах воспаления большое количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), включающих нити ДНК и сериновые протеазы, в том числе протеиназу 3. NET принимают участие в патогенезе различных заболеваний, связаны с нарушением свертывания крови, ассоциированы с тромботическими осложнениями, в том числе способствуют распространению метастазов [19]. Недавние исследования показали, что эти протеазы способны активировать провоспалительные цитокины, включая ИЛ-1 β и ФНО- α [20]. Таким образом, активация нейтрофилов при PAS формирует порочный

круг: воспаление–высвобождение NET–дальнейшая миграция и инвазия трофобласта.

В нашей работе выявлено увеличение абсолютного количества всех Т-клеток и Т-хелперов при PAS, включая увеличение Т-цитотоксических, В-клеток и ЕКК в группе pl. accreta. В процентном отношении было увеличено количество Т-клеток и уменьшено количество В-клеток (pl. accreta) и ЕКК (CD3–CD56+) (pl. increta) по сравнению с этими показателями в группе физиологической беременности. О. El-Badawy et al. и S. AbdelFattah et al. также показали в своих исследованиях, что случаи PAS связаны с низким уровнем ЕКК [21, 22]. Известно, что В-1b-лимфоциты вырабатывают антитела в ответ на идентификацию антигена, обеспечивая защиту от вторжения патогенов. С другой стороны, клетки В-1a секретируют естественные антитела IgM с низким средством, полиреактивностью и самореактивностью, независимо от антигенных стимулов. Эти естественные антитела помогают в клиренсе апоптотических клеток, влияя на иммунный ответ во время ремоделирования тканей [23, 24]. Возможно, уменьшение количества В-клеток, выявленное в нашем исследовании, свидетельствует о недостаточной функции либо истощении механизма «очистки» от поврежденных окружающих тканей и клеточного дебриса при вращении ворсин. Мы выявили статистически незначимое увеличение отношения Т-хелперов к Т-цитотоксическим клеткам. G. Makrydimas et al. показали, что увеличение этого соотношения наблюдалось у женщин с внематочной беременностью [25]. Очевидно, выявленные нами изменения носят как патологический характер, объясняющий усиление инвазии трофобласта на фоне снижения ПАМГ децидуальных клеток, так и компенсаторно-приспособительный, направленный на сохранение беременности и улучшение трофики развивающегося плода.

Заключение

Число исследований, результаты которых внесли вклад в понимание молекулярной биологии вращающейся плаценты, остается недостаточным. В результате нашей работы установлено, что вращение плаценты сопровождается усилением провоспалительного статуса, а также функциональной избыточностью плацентарных белков как в самой плаценте вне зоны вращающейся, так и в системном кровотоке. В настоящее время надежного сывороточного биомаркера вращающейся плаценты нет, однако данные, которые будут получены в исследованиях более крупных популяций, можно будет комбинировать с УЗ- и МРТ-визуализацией для антенатального скрининга вращающейся плаценты. Нарушение баланса между факторами защиты и агрессии (отсутствием децидуальных клеток, обладающих ограничивающими свойствами, и наличием трофобласта с сохраненными инвазивными особенностями), является важной предпосылкой к развитию патологической инвазии ворсин плаценты. Для полного понимания этих процессов необходимы дальнейшие исследования.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Низяева.
Сбор и обработка материала – И.А. Куликов, Е.Р. Милютин, И.И. Степанова, А.П. Алексанкин, К.А. Артемьева.
Написание текста – К.А. Артемьева, Н.В. Низяева.
Редактирование – Н.В. Низяева, Л.М. Михалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Nizyaeva.
Collected the data and performed the analysis – I.A. Kulikov,
E.R. Milyutina, I.I. Stepanova, A.P. Aleksankin, K.A. Artemyeva.
Wrote the paper – K.A. Artemyeva, N.V. Nizyaeva.
Edited the manuscript – N.V. Nizyaeva, L.M. Mikhaleva.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Jauniaux E, Ayres-de-Campos D, Langhoff-Roos J, Fox KA, Collins S.* FIGO classification for the clinical diagnosis of placenta accreta spectrum disorders. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019;146(1):20–4. DOI: 10.1002/ijgo.12761.
2. *Куликов И.А., Низяева Н.В., Сухачева Т.В., Серов Р.А., Тихонова Н.Б., Фокина Т.В. и др.* Сравнительная морфологическая характеристика маточно-плацентарной области при аномальном прикреплении плаценты. *Acta Biomedica Scientifica.* 2023;8(4):68–79. DOI: 10.29413/ABS.2023-8.4.8. *Kulikov IA, Nizyaeva NV, Sukhacheva TV, Serov RA, Tikhonova NB, Fokina TV et al.* Comparative morphological characteristics of the uteroplacental area in abnormal placentation. *Acta Biomedica Scientifica.* 2023;8(4):68–79 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2023-8.4.8.
3. *Stanek J.* Placenta creta: a spectrum of lesions associated with shallow placental implantation. *Obstet Gynecol Int.* 2020;2020:4230451. DOI: 10.1155/2020/4230451.
4. *Rattila S, Kleefeldt F, Ballesteros A, Beltrame JS, Ribeiro M, Ergün S et al.* Pro-angiogenic effects of pregnancy-specific glycoproteins in endothelial and extravillous trophoblast cells. *Reproduction.* 2020;160(5):737–50. DOI: 10.1530/REP-20-0169.
5. *Sibiak R, Jankowski M, Gutaj P, Mozdziak P, Kempisty B, Wender-Ożegowska E.* Placental lactogen as a marker of maternal obesity, diabetes, and fetal growth abnormalities: current knowledge and clinical perspectives. *J Clin Med.* 2020;9(4):1142. DOI: 10.3390/jcm9041142.
6. *Тимганова В.П., Бочкова М.С., Раев М.Б., Храмов П.В., Заморина С.А.* Иммунорегуляторный потенциал трофобластического β 1-гликопротеина. *Медицинская иммунология.* 2021;23(3):455–468. DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2170. *Timganova VP, Bochkova MS, Rayev MB, Khramtsov PV, Zamorina SA.* Immunoregulatory potential of pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Medical Immunology (Russia).* 2021;23(3):455–468 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2170.
7. *Lala PK, Nandi P.* Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: the role of decorin. *Cell Adh Migr.* 2016;10(1-2):111–25. DOI: 10.1080/19336918.2015.1106669.
8. *Lai W, Yu L.* Insulin-like growth factor 1 ameliorates preeclampsia by inhibiting zinc finger E-box binding homeobox 1 by up-regulation of microRNA-183. *J Cell Mol Med.* 2023;27(9):1179–91. DOI: 10.1111/jcmm.17403.
9. *Goh WA, Zalud I.* Placenta accreta: diagnosis, management and the molecular biology of the morbidly adherent placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(11):1795–800. DOI: 10.3109/14767058.2015.1064103.
10. *Bouvier S, Fortier M, Vincent L, Demattei C, Mousty E, Herzog M et al.* NETosis markers in pregnancy: effects differ according to histone subtypes. *Thromb Haemost.* 2021;121(7):877–90. DOI: 10.1055/s-0040-1722225.
11. *Zhou J, Chen H, Xu X, Liu Y, Chen S, Yang S et al.* Uterine damage induces placenta accreta and immune imbalance at the maternal-fetal interface in the mouse. *Placenta.* 2022;119:8–16. DOI: 10.1016/j.placenta.2022.01.002.
12. *Kawashima A, Sekizawa A, Ventura W, Koide K, Hori K, Okai T et al.* Increased levels of cell-free human placental lactogen mRNA at 28–32 gestational weeks in plasma of pregnant women with placenta previa and invasive placenta. *Reprod Sci.* 2014;21(2):215–20. DOI: 10.1177/1933719113492209.
13. Патологическое прикрепление плаценты (предлежание и вращение плаценты). *Клинические рекомендации.* Москва, 2023. Доступно по адресу: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/767_1 (получено 13.05.2024).
14. *Старосветская Н.А., Назимова С.В., Степанова И.И., Степанов А.А., Болтовская М.Н.* Получение комплекса моноклональных антител для иммуногистохимических исследований в области физиологии и патологии репродукции. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2012;2:22–27. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17919938> (получено 13.05.2024).
15. *Starosvetskaya NA, Nazimova SV, Stepanova II, Stepanov AA, Boltovskaya MN.* Production of monoclonal antibodies set for immunohistochemical studies in the field of physiology and pathology of human reproduction. *Clinical and experimental morphology.* 2012;2:22–27 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17919938> (accessed 13.05.2024).
16. *Li J, Zhang N, Zhang Y, Hu X, Gao G, Ye Y et al.* Human placental lactogen mRNA in maternal plasma play a role in prenatal diagnosis of abnormally invasive placenta: yes or no? *Gynecol Endocrinol.* 2019;35(7):631–4. DOI: 10.1080/09513590.2019.1576607.
17. *Blois SM, Sulkowski G, Tirado-González I, Warren J, Freitag N, Klapp BF et al.* Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):348–58. DOI: 10.1038/mi.2013.53.
18. *You Y, Stelzl P, Joseph DN, Aldo PB, Maxwell AJ, Dekel N et al.* TNF- α regulated endometrial stroma secretome promotes trophoblast invasion. *Front Immunol.* 2021;12:737401. DOI: 10.3389/fimmu.2021.737401.
19. *Wang Z, Zibrila AI, Liu S, Zhao G, Li Y, Xu J et al.* Acetylcholine ameliorated TNF- α -induced primary trophoblast malfunction via muscarinic receptors. *Biol Reprod.* 2020;103(6):1238–48. DOI: 10.1093/biolre/iaaa158.

19. *Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV.* The emerging role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in tumor progression and metastasis. *Front Immunol.* 2020;11:1749. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01749.
20. *Yang Y, Wu N.* Gestational diabetes mellitus and preeclampsia: correlation and influencing factors. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:831297. DOI: 10.3389/fcvm.2022.831297.
21. *El-Badawy O, Abbas AM, Radwan E, Makboul R, Khamis AA, Ali M et al.* Cross-talk between mucosal-associated invariant T, natural killer, and natural killer T cell populations is implicated in the pathogenesis of placenta accreta spectrum. *Inflammation.* 2023;46(4):1192–208. DOI: 10.1007/s10753-023-01799-1.
22. *AbdelFattah S, Morsy M, Ahmed AM, Abdelsalam H, Hosny G.* Microcellular approach for the pathogenesis of placenta accreta spectrum inflammatory versus apoptotic pathways; a thorough look on Treg, dNK and VEGF. *Pathol Res Pract.* 2024;254:155153. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155153.
23. *Aneman I, Pienaar D, Suvakov S, Simic TP, Garovic VD, McClements L.* Mechanisms of key innate immune cells in early- and late-onset preeclampsia. *Front Immunol.* 2020;11:1864. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01864.
24. *Janssen M, Rijvers L, Koetzier SC, Wierenga-Wolf AF, Melief MJ, van Langelaar J et al.* Pregnancy-induced effects on memory B-cell development in multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2021;11(1):12126. DOI: 10.1038/s41598-021-91655-9.
25. *Makrydimas G, Plachouras N, Higuera MT, Thilaganathan B, Nicolaides K.* Maternal peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal and pathological pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 1994;9(6):371–8. DOI: 10.1159/000264068.

Информация об авторах

Ильяс Александрович Куликов – кандидат медицинских наук, заведующий акушерским отделением патологии беременности Видновского перинатального центра.

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Андрей Павлович Александркин – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Екатерина Романовна Милютина – врач акушерского отделения патологии беременности Видновского перинатального центра.

Ирина Ильдаровна Степанова – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Наталья Викторовна Низяева – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Ilyas A. Kulikov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Perinatal Pathology, Vidnoye Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0002-2460-1623>

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>

Andrey P. Aleksankin – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>

Ekaterina R. Milyutina – Obstetrician, Department of Perinatal Pathology, Vidnoye Perinatal Center.
<https://orcid.org/0000-0003-2701-0607>

Irina I. Stepanova – Researcher, Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-5513-217X>

Natalia V. Nizyaeva – Dr. Sci. (Med.), Head of the Reproductive Pathology Laboratory, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-5592-5690>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>