

НОВЫЕ ПРЕДИКТОРЫ ПАТОМОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Павлова Т. В.¹, Никонова Н. А.², Каплин А. Н.³, Затолокина М. А.^{4,5}, Бахрамова Ш. У.⁶,

Гончаров И. Ю.⁷, Бадах И. А.⁸, Качмарская Л. М.⁵

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, ул. Льва Толстого, д. 6-8, Санкт-Петербург, Россия

²ГБУЗ ЯНАО «Ноябрьская ЦГБ», 629806, ул. Муравленко, д. 42-Б, Ноябрьск, Россия,

³ОБУЗ «Патологоанатомическое бюро», 305007, Сумская ул., 45А, корп. 3, Курск, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, 305041, ул. Карла Маркса, д. 3, Курск, Россия

⁵ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Медицинский институт, 302026, ул. Комсомольская д. 95, Орел, Россия

⁶Бухарский Государственный Медицинский Институт имени Абу Али ибн Сино, 200118, Гиждуванская ул. 23, Бухара, Республика Узбекистан

⁷ГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минздрава РФ, 308015, ул. Победы, д.85, Белгород, Россия

⁸Клиника им. Э.Э. Эйхвальда СЗГМУ им. И.И. Мечникова, патологоанатомическое отделение клинической молекулярной морфологии, 197022, ул. Кирочная, д.41, Санкт-Петербург, Россия

Для корреспонденции: Затолокина М.А., ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России; заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОГУ им. И.С. Тургенева Медицинский институт, e-mail: marika1212@mail.ru

For correspondence: Maria A. Zatolokina, Kursk State Medical University; Head of the Department of Histology, Cytology, and Embryology, Oryol State University named after I.S. Turgenyev, Medical Institute, e-mail: marika1212@mail.ru

Information about authors:

Pavlova T. V., <https://orcid.org/0009-0003-6143-5139>

Nikonova N. A., <https://orcid.org/0009-0003-6143-5139>

Kaplin A. N., <https://orcid.org/0000-0001-5968-7132>

Zatolokina M. A., <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Bakhranova S. U., <https://orcid.org/009-0006-2996-2897>

Goncharov I. Y., <https://orcid.org/0000-0002-7734-0535>

Badakh I. A., <https://orcid.org/0009-0002-9162-4064>

Kachmarskaya L. M., <https://orcid.org/0000-0003-2335-2829>

РЕЗЮМЕ

Среди вариантов патологии беременности гипертензивные состояния входят в тройку лидеров. Распространенность их в России, по данным различных авторов, формирует 5-9%, то есть акушер-гинеколог сталкивается с данной проблемой практически каждые десятые роды. Цель исследования: изучение микроархитектоники эритроцитов при ПЭ с применением инновационных методов исследования (атомно-силовая микроскопия). Материал и методы. Выполнено всестороннее изучение 26 беременных, в числе которых 16 женщин были с преэклампсией умеренной (8) и тяжелой (8) степени тяжести и 10 пациенток, составивших контрольную группу. Результаты. Изменения в эритроцитах при преэклампсии имеют одинаковый вектор как в кровеносном русле, так в и органах и тканях матери, в том числе – матке. Эритроциты, как показано при помощи атомно-силовой микроскопии в трехмерном изображении, меняют форму становясь как вытянутыми, за счет нарушения строения эндотелия и уменьшения просвета сосудов, так и в виде шара, в результате прогрессирующего отека. Происходит нарушение их дисковидной формы. Наблюдается нарушение строения плазмолеммы частиц, вплоть до частичного или полного гемолиза. Заключение. Дефекты формы эритроцитов – прямой путь к гипоксии тканей в системе мать-плацента-плод, что лежит в основе альтернативных процессов и, как следствие, возможного развития полиорганной недостаточности у матери и нарушений жизнедеятельности плода и новорожденного.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, преэклампсия, эритроциты, матка

NEW PREDICTORS OF ERYTHROCYTE PATHOMORPHOLOGY IN PREECLAMPSIA

Pavlova T. V.¹, Nikonova N. A.², Kaplin A. N.³, Zatolokina M. A.^{4,5}, Bakhranova Sh. U.⁶,

Goncharov I. Yu.⁷, Badakh I. A.⁸, Kachmarskaya L. M.⁵

¹First Saint Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

²Noyabrsk Central District Hospital, Noyabrsk, Russia

³Pathological Anatomy Hospital, Kursk, Russia

⁴Kursk State Medical University, Kursk, Russia

⁵Orel State University named after I.S. Turgenev, Medical Institute, Orel, Russia

⁶Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali ibn Sino, Bukhara, Republic of Uzbekistan

⁷Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

⁸Eichwald Clinic of the North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Pathological Anatomy Department of Clinical Molecular Morphology, St. Petersburg, Russia

SUMMARY

Among the variants of pregnancy pathology, hypertensive conditions are among the top three. Their prevalence in Russia, according to various authors, is 5-9%, that is, an obstetrician-gynecologist encounters this problem almost every tenth birth. The aim: to study the microarchitecture of erythrocytes in PE using innovative research methods (atomic force microscopy). Material and methods. A comprehensive study of 26 pregnant women was performed, including 16 women with moderate (8) and severe (8) preeclampsia and 10 patients who made up the control group. Results. Changes in erythrocytes in preeclampsia have the same vector both in the bloodstream and in the organs and tissues of the mother, including the uterus. Red blood cells, as shown by atomic force microscopy in a three-dimensional image, change shape, becoming either elongated, due to disruption of the endothelium structure and reduction of the lumen of the vessels, or in the form of a ball, as a result of progressive edema. Their discoid shape is disrupted. A disruption of the structure of the plasma membrane of the particles is observed, up to partial or complete hemolysis. Conclusion. Defects in the shape of red blood cells are a direct path to tissue hypoxia in the mother-placenta-fetus system, which underlies alternative processes and, as a consequence, the possible development of multiple organ failure in the mother and the vital activity of the fetus and newborn.

Key words: atomic force microscopy, preeclampsia, red blood cells, uterus

Среди вариантов патологии беременности гипертензивные состояния входят в тройку лидеров. Распространенность их в России, по данным различных авторов, формирует 5-9%, то есть акушер-гинеколог сталкивается с данной проблемой практически каждые десятые роды. Из них, преэклампсия (ПЭ) и эклампсия составляют 60% и более [1; 4; 5; 7-10]. Связанные с данным заболеванием особенности развития плода и новорожденного могут иметь дальнейшие неблагоприятные исходы. Гипертензивные осложнения беременности, по данным Минздрава России, занимают 4-е место в списке причин материнской смертности [1]. Данная патология снижает качество жизни женщины в связи с развитием заболеваний сердечно-сосудистой системы (раннего атеросклероза, инфаркта, инсульта), эндокринопатий, в первую очередь сахарного диабета 2 типа, формированием метаболического синдрома и других заболеваний.

Новые парадигмы в изучении ПЭ, включая морфологические, позволяют расширить знания о патогенезе, а также сделать возможным внедрения инновационных вариантов диагностики данной патологии [5; 11]. Сюда, безусловно, можно отнести и исследование крови, в том числе методы сканирующей микроскопии [2-4; 6]. Так же факт, наличия взаимосвязи между изменением формы эритроцита и его функциональной активностью, достоверно доказанный в работах отечественных и зарубежных коллег, повышает актуальность изучаемой проблемы [12; 13].

В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение микроархитектоники эритроцитов при ПЭ с применением инновационных методов исследования (атомно-силовая микроскопия).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выполнено всестороннее изучение 26 беременных, в числе которых 16 женщин были с ПЭ умеренной (8) и тяжелой (8) степени тяжести и 10 пациенток, составивших контрольную группу. Роды проведены путем операции кесарево сечение. Материал был отобран в «Белгородской областной клинической больнице Святителя Иоасафа», а также в ГБУЗ ЯНАО «Ноябрьская ЦГБ» (2021-2024г). На проведение данного исследования получено разрешение регионального этического комитета №2 от 18.05.2022 г. при Курском государственном медицинском университете.

Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с гепарином. Эритроцитарную массу отмывали методом последовательного разведения изотоническим раствором хлорида натрия (0,9%) и центрифугирования. Полученные образцы наносили на обезжиренные предметные стекла для иммуногистохимического исследования и инкубировали во влажной камере перед сканированием. Изучение морфологии поверхности эритроцитов проводили с использованием сканирующего зондового микроскопа. Пробы эритроцитов помещали во влажную камеру атомно-силового микроскопа «Ntegra-Aura». Сканирование клеток было про-

ведено в режиме полуконтактной микроскопии. Помимо этого, на парафиновых блоках, было осуществлено исследование образцов матки. Обработку и построение АСМ-изображений выполняли при помощи программного обеспечения «NOVA» (НТ-МДТ, Россия) и «ImageAnalysis» (НТ-МДТ, Россия) в научно-образовательном и инновационном центре «Наноструктурных материалов и нанотехнологий» ФГАОУ ВО «Белгородского государственного национального исследовательского университета».

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением параметрических методов. Нормальность распределения количественных показателей была подтверждена с помощью критерия Шапиро-Уилка и визуального анализа гистограмм. Для сравнения показателей использовали t-критерий Стьюдента для незави-

симых выборок и критерий хи-квадрат. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$. Все расчеты выполнены в программе IBM SPSS Statistics 28.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При беременности и наличии ПЭ, основная часть эритроцитов была представлена нормоцитами. При этом значительно возросло число клеток с частичным или полным гемолизом, особенно при тяжелом течении состояния. Часть клеток приобретала форму неправильного овала. Наблюдались клетки вытянутой формы. Возросло количество цитоплазматических мостиков между структурами, что было составным компонентом коагулопатии: стаз, сладж тромбоз. Наблюдалось появление шаровидных клеток, образованных за счет их отека.

Таблица 1. Состояние эритроцитов в венозном русле у женщин при беременности с наличием преэклампсии

Table 1. The state of erythrocytes in the venous bed in women during pregnancy with the presence of preeclampsia

Исследуемые группы	Площадь, μm^2	Объем μm^3	Локальный максимум, μm	Периметр, μm	Диаметр, μm
Контроль	46,08±2,60	8243,50±223,50	642,0±6,20	47,65±2,32	7,65±1,30
ПЭ умеренная	70,30±3,50*	1115,80±350,00*	390,25±40,80*	43,8±2,60	10,20±0,80*
ПЭ тяжелая	75,40±3,20*	13115,80±370,00***	445,20±50,60***	45,8±2,30	12,20±1,20*

Примечание. Площадь – площадь сечения частицы, Объем – объем клетки, Локальный максимум – значение локального максимума (высота эритроцита, отсчитанная от общего нулевого значения), Периметр – периметр сечения, Диаметр – эффективный диаметр (диаметр окружности: площадь приравнивается к площади сечения). * $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой. *** $p < 0,05$ в сравнении между группами с преэклампсией

нами было показано (табл.1, рис.1), что при беременности с наличием ПЭ происходило достоверное ($p < 0,05$) увеличение площади сечения частицы и составляла при умеренном и тяжелом течении соответственно: 70,30±3,50 μm^2 и 75,40±3,20 μm^2 (в контрольной группе – 46,08±2,60 μm^2). Еще в большей степени менялись величины объема клеток: 1115,80±350,00 μm^3 и 13115,80±370,00 μm^3 (8443,50±223,50 μm^3). Показатели значение локального максимума, наоборот, уменьшались. Периметр сечения достоверно не изменялся в отличии от эффективного диаметра, показатели которого возрастали и составляли: 10,20±0,80 μm и 12,20±1,20 μm (7,65±1,30 μm).

Глубина впадины дискоцитов была: 0,14±0,06 μm и 0,13±0,07 μm , (0,25±0,06 μm). Соотношение диаметра эритроцита к показателям впадины составляли: 17±1 и 16±2 единиц (21±2). Форма и количество пор было изменено. Их становилось

меньше, и они имели значительный разброс в диаметре (0,61±0,21 μm) и были с рельефными выступами внутри. Расположение их было менее упорядоченным, чем в контрольной группе. Конструкция цитоплазматических отростков была искажена. Они были неоднозначны по размерам и внешнему виду. При этом, в значительной части клеток они вообще отсутствовали. Кривизна центрального углубления изменялась незначительно.

В сосудах эндометрия матки эритроциты при ПЭ чаще были в виде сферы. Величина их составляла 5,15±0,65 мкм. Уменьшение размера следует отнести за счет иного подхода к обработке материала (фиксация, парафиновая проводка и заливка в блоки). Четко выражено полнокровие. Определялись также: стаз, сладж и тромбоз. Поверхность клеток была неровной. Происходило нарушение строения плазмолеммы клеток.

Идентичная тенденция была характерна и для эритроцитов в спиральных артериях миометрия

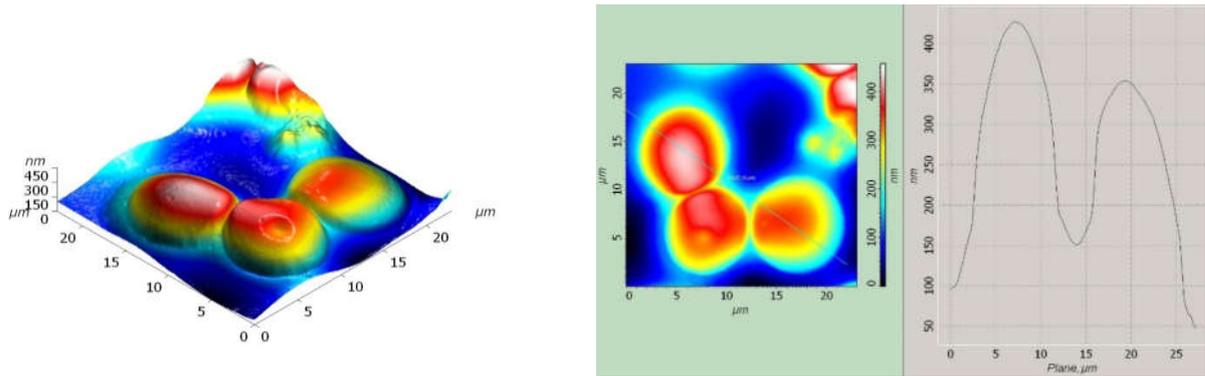
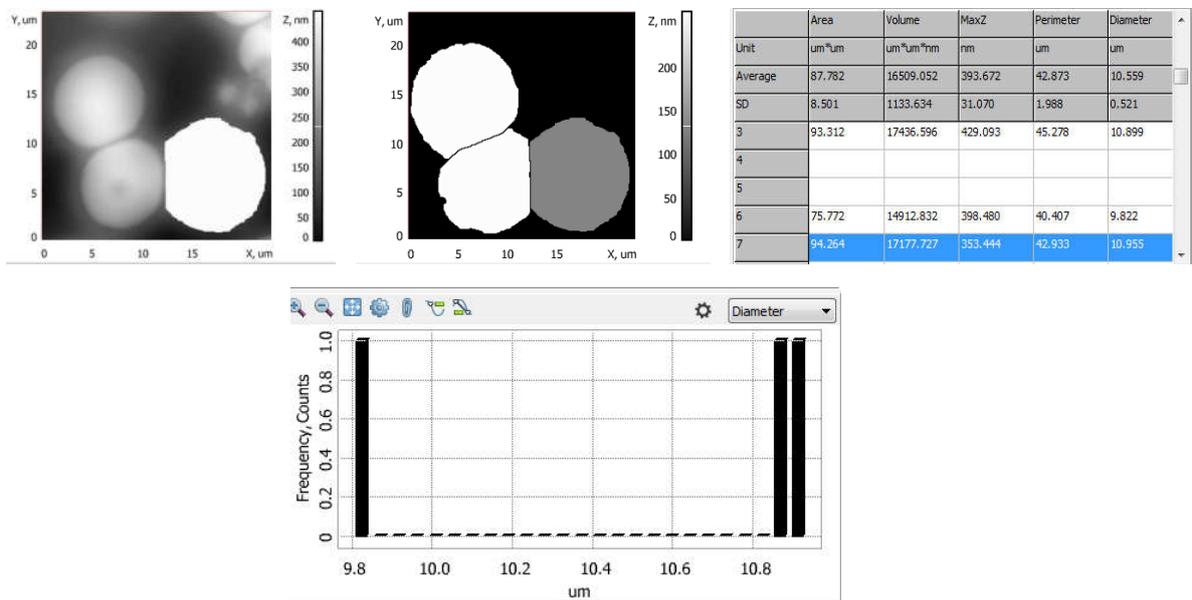


Рис.1. Эритроциты беременных женщин с умеренной преэклампсией. Стаз и сладж. Форма клеток в виде неправильного диска. Уменьшение глубины полости клетки.
Fig. 1. Erythrocytes of pregnant women with moderate preeclampsia. Stasis and sludge. The shape of the cells is an irregular disk. Decreased depth of the cell cavity.



АСМ. Рис. А – трехмерное изображение. Б – двухмерное. Рис. В – графическое изображение рис. Б.
AFM. Fig. A – three-dimensional image. B – two-dimensional. Fig. B – graphic image of Fig. B.

матки с наличием нарушением кровообращения в виде гиперкоагуляции. Причем число тромбов, которые частично или полностью обтурировали просвет сосудов, было больше при тяжелом варианте ПЭ. Помимо этого, для данной патологии беременности, было характерно полнокровие, а также диapedез красных частиц крови за пределы кровеносного русла со скоплениями клеток. Форма и строение эритроцитов в значительной мере была изменена. Часто, за счет отека, они принимали форму шара. Наблюдались варианты неправильного овала за счет нарушения строения эндотелия сосудов. Часть клеток была с частичным или полным патологическим внутриклеточным и внутрисосудистым гемолизом, что в большей степени было характерно для тяжелого течения ПЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует наличие системных изменений эритроцитов при преэклампсии, имеющих единый патогенетический вектор. Независимо от локализации – в системном кровотоке, органах-мишенях или матке – наблюдаются однонаправленные патологические процессы: развитие гиперкоагуляции, сочетающейся с геморрагическими проявлениями, прогрессирующие структурные нарушения эритроцитов и усиление гемолиза. Выраженность этих нарушений напрямую коррелирует с тяжестью преэклампсии.

С помощью атомно-силовой микроскопии с трехмерной визуализацией установлены характерные морфологические изменения эритроци-

тов. Выявляются два основных патологических варианта изменения формы: удлинённые формы, обусловленные повреждением эндотелия и сужением просвета сосудов, и сферические формы, формирующиеся вследствие прогрессирующего внутриклеточного отека. Оба варианта представляют собой отклонение от физиологической дисковидной формы эритроцитов.

На ультраструктурном уровне отмечаются значительные повреждения клеточной мембраны эритроцитов, варьирующие от локальных дефектов до полной дезинтеграции мембраны, что приводит к частичному или полному гемолизу. Обнаруженные нарушения соответствуют данным литературы о критическом влиянии изменения формы эритроцитов на их функциональную активность. В частности, исследования Preiser P.R. и соавт. (2021) продемонстрировали сходные морфофункциональные изменения эритроцитов при малярии, а работа Tomaiuolo G. и соавт. (2014) подтвердила универсальность взаимосвязи между структурными аномалиями эритроцитов и их функциональной недостаточностью при использовании современных диагностических методик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сделать вывод, что нарушение структурной целостности эритроцитов является ключевым звеном патогенеза преэклампсии, определяющим как микроциркуляторные расстройства, так и прогрессирование системной эндотелиальной дисфункции.

Дефекты формы эритроцитов – прямой путь к гипоксии тканей в системе мать-плацента-плод, что лежит в основе альтеративных процессов и, как следствие, возможного развития полиорганной недостаточности у матери и нарушений жизнедеятельности плода и новорожденного.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of interest. The authors have no conflicts of interest to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г. А., Голубев Н. А., Тюрина Е. М. и др. Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в Российской Федерации. 2018. М.; 2019.
2. Бухонкина Ю. М., Стрюк Р. И., Чижова Г. В. Функциональное состояние мембран эритроцитов у беременных с гипертонической болезнью, возможности коррекции. Дальневосточный медицинский журнал. 2010;2:45-47.
3. Дрозд Е. С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов. Российский журнал биомеханики. 2009;4(46):22-30.
4. Клинические рекомендации – Преэклампсия. Эклампсия. Отеки, протеинурия и гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде – 2021-2022-2023 (24.06.2021) – Утверждены Минздравом РФ URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/637_2
5. Медведев Б. И., Сюндюкова Е. Г., Сашенков С. Л. и др. Клинико-лабораторно-инструментальная модель раннего прогноза преэклампсии. Российский вестник акушера-гинеколога. 2019;19(1):12-17.
6. Павлова Т. В., Щёголев А. И., Каплин А. Н., Селиванова А. В., Землянская Л. О. Применение атомно-силовой микроскопии в комплексной оценке системы «мать-плацента-плод» при акушерской и эндокринной патологии на фоне беременности. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021;171(2):223-227.
7. Сюндюкова Е. Г., Чулков В. С., Рябикина М. Г. Преэклампсия: современное состояние проблемы. Доктор.Ру. 2021;20(1):11-16.
8. Ходжаева З. С., Ошхунова М. С., Муминова К. Т., Горина К. А., Холин А. М. Прогнозирование и ранняя диагностика преэклампсии: научные перспективы и клинические возможности. Акушерство и гинекология. 2022; 12:57-65
9. Ormisher L., Higson S., Luckie M., Roberts S.A., Glossop H., Trafford A., et al. [Postnatal Enalapril to Improve Cardiovascular Function Following Preterm Preeclampsia (PICKUP): A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Feasibility Trial]. Hypertens (Dallas, Tex 1979). 2020; 76(6):1828 – 37
10. Ghafarzadeh M., Shakarami A., Yari F., Namdari P. [The comparison of side effects of methyl dopa, amlodipine, and metoprolol in pregnant women with chronic hypertension]. Hypertens pregnancy. 2020; 39(3): 314 – 8.
11. Pavlova T. V., Malyutina E. S., Selivanova A. V., Petrukhin V. A., Kaplin A. N., Zemlianskaia L. O. New approaches in assessing the clinical and pathomorphological aspects of obstetric pathology in the structure of the mother-placenta-fetus using atomic force research. Systematic Reviews in Pharmacy. 2020;11(6):21-25.
12. Tomaiuolo G., Simeone M., Guido F., де Кандиа Р., Migliaresi С., Oliva А., Pierro L. Red blood cell deformability analysis by microfluidics. Microvasc Res. 2014 Sep;95:49-56. doi: 10.1016/j.mvr.2014.07.005.
13. Sandoval N. M, et al. Red blood cell shape changes and aggregation in diabetes mellitus. PLoS One. 2023 Mar 23;18(3):e0283314. doi: 10.1371/journal.pone.0283314.

REFERENCES

1. Aleksandrova G. A., Golubev N. A., Tyurina E. M., et al. Key indicators of maternal and child health, activities of child welfare and maternity services in the Russian Federation. 2018. M.; 2019. (In Russ.).
2. Bukhonkina Yu. M., Stryuk R. I., Chizhova G. V. Functional state of erythrocyte membranes in pregnant women with hypertension, correction possibilities. *Far Eastern Medical Journal*. 2010;2:45-47. (In Russ.).
3. Drozd E. S. Atomic force microscopy of structural and mechanical properties of erythrocyte membranes. *Russian Journal of Biomechanics*. 2009;4(46):22-30. (In Russ.).
4. Clinical guidelines - Preeclampsia. Eclampsia. Edema, proteinuria and hypertensive disorders during pregnancy, childbirth and the postpartum period - 2021-2022-2023 (06.24.2021) - Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/637_2 (In Russ.).
5. Medvedev B. I., Syundyukova E. G., Sashenkov S. L. et al. Clinical, laboratory and instrumental model of early prognosis of preeclampsia. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2019;19(1):12-17. (In Russ.).
6. Pavlova T. V., Shchegolev A. I., Kaplin A. N., Selivanova A. V., Zemlyanskaya L. O. Application of atomic force microscopy in comprehensive assessment of the mother-placenta-fetus system in obstetric and endocrine pathology during pregnancy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;171(2):223-227.
7. Syundyukova E. G., Chulkov V. S., Ryabikina M. G. Preeclampsia: current state of the problem. *Doctor.Ru*. 2021;20(1):11-16. (In Russ.).
8. Khodjaeva Z. S., Oshkhunova M. S., Muminova K. T., Gorina K. A., Kholin A. M. Prediction and early diagnosis of preeclampsia: scientific prospects and clinical possibilities. *Obstetrics and Gynecology*. 2022; 12:57-65 (In Russ.).
9. Ormisher L., Higson S., Luckie M., Roberts S.A., Glossop H., Trafford A., et al. [Postnatal Enalapril to Improve Cardiovascular Function Following Preterm Preeclampsia (PICKUP): A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Feasibility Trial]. *Hypertens (Dallas, Texas 1979)*. 2020; 76(6):1828 – 37
10. Ghafarzadeh M., Shakarami A., Yari F., Namdari P. [The comparison of side effects of methyldopa, amlodipine, and metoprolol in pregnant women with chronic hypertension]. *Hypertens pregnancy*. 2020; 39(3): 314 – 8.
11. Pavlova T. V., Malyutina E. S., Selivanova A. V., Petrukhin V. A., Kaplin A. N., Zemlianskaia L. O. New approaches in assessing the clinical and pathomorphological aspects of obstetric pathology in the structure of the mother-placenta-fetus using atomic force research. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020;11(6):21-25.
12. Tomaiuolo G., Simeone M., Guido F., de Candia P., Migliaresi C., Oliva A., Pierro L. Red blood cell deformability analysis by microfluidics. *Microvasc Res*. 2014 Sep;95:49-56. doi: 10.1016/j.mvr.2014.07.005.
13. Sandoval N. M., et al. Red blood cell shape changes and aggregation in diabetes mellitus. *PLoS One*. 2023 Mar 23;18(3):e0283314. doi: 10.1371/journal.pone.0283314.