Анотація

Бережна В.А. Прогностичні критерії трансформуючого фактору роста β та роль макрофагів у формуванні затримки внутрішньоутробного розвитку плода. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 14.01.01. – акушерство та гінекологія (222 – Медицина). – Українська медична стоматологічна академія МОЗ України, Полтава, 2021. – Українська медична стоматологічна академія МОЗ України, Полтава, 2021.

У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної науково-практичної задачі в акушерстві, що полягає у дослідженні рівня ТФР-β_1 та рЕнг, як прогностичних критеріїв та визначення поляризації макрофагів у формуванні затримки внутрішньоутробного розвитку плода (ЗВУРП).

ЗВУРП залишається актуальною проблемою сучасного акушерства, неонатології та гінекології, що обумовлено високими показниками перинатальних ускладнень та захворюваності, смертності, значними репродуктивними втратами та витратами на лікування новонароджених, соціальними та економічними збитками. Доцільно зауважити, що більш поглиблене вивчення даного ускладнення вагітності потрібне для виявлення ЗВУРП в ранні терміни для більш ефективного лікування, а головне – своєчасної профілактики. У регуляції функціонального стану плаценти та розвитку плода ключове значення належить ангіогенним факторам, таким як трансформуючий фактор роста β_1 (ТФР-β_1) та його ко-рецептор, розчинний ендоглін (рЕнг). Також важливу роль у регуляції вагітності та підтриманні гомеостазу в системі «мати – плацента – плід» відіграють макрофаги. Порушення поляризації макрофагів відзначено при плацентарній дисфункції, що супроводжує патологічну вагітність, зокрема й ЗВУРП. Отже дотепер триває пошук нових прогностичних маркерів ранньої діагностики ЗВУРП.

Мета дослідження – оцінити клінічний перебіг вагітності та пологів у жінок зі ЗВУРП, визначити прогностичну цінність ангіогенних маркерів, встановити поляризацію макрофагів при формуванні затримки внутрішньоутробного розвитку плода.

Завдання дослідження: провести ретроспективний аналіз перебігу вагітності, яка ускладнилась ЗВУРП та визначити фактори ризику; визначити загальноклінічну відмінність та оцінити данні ультразвукового дослідження з доплерометричним контролем між жінками зі ЗВУРП, які народили дітей з малою та достатньою вагою до гестаційного віку; визначити рівень ангіогіогенних факторів (ТФР-β_1 та рЕнг) в сироватці крові у вагітних зі ЗВУРП, які народили дітей з малою та достатньою вагою до гестаційного віку; на основі рівнів ангіогенних факторів (ТФР-β_1 та рЕнг) запропонувати прогностичні критерії ЗВУРП; охарактеризувати морфофункціональний стан плацент шляхом комплексного макро- та мікроскопічного гістологічного дослідження, провести органо- та морфометричний аналіз плацентарної тканини жінок, вагітність яких була ускладнена ЗВУРП при різних термінах розродження; дослідити стан та роль поляризації макрофагів М1/М2 в плацентарній тканині жінок, вагітність яких була ускладнена ЗВУРП при різних термінах розродження.

Для досягнення мети та вирішення поставлених завдань дослідження використовували ретроспективний, загальноклінічний, інструментальний (ультразвукове та доплерометричне дослідження), імуноферментний, органо- та морфометрічний, морфологічний, імуногістохімічний, статистичні методи.

Уперше визначено роль ангіогенних факторів (ТФР-β_1 та рЕнг у крові), як ключових факторів ризику розвитку вагітності ускладненої ЗВУРП, що завершилась народженням дитини з малою вагою до гестаційного віку та процесу поляризації М1/М2 макрофагів (CD68+ та CD163+ макрофаги / мононуклеари) у плаценті при ЗВУРП.

Уперше на основі ROC-аналізу розрахована прогностична значущість предикторів раннього виявлення дитини з малою вагою до гестаційного віку

на основі маркерів – ТФР-β_1 (AUC=0,807; Std. Error=0,102; 95% ДІ 0,6075–1,007; p=0,01), якість прогнозування при точці розподілу d=143,7 з чутливістю 83,3% та специфічністю 62,5%) та рЕнг (AUC=1,0; Std. Error=0; 95% ДІ 1–1; p<0,0001), якість прогнозування при точці розподілу d=4,5 з чутливістю 100% та специфічністю 75%, значення d>4,5).

Уперше виявлено, що порушення поляризації про- та протизапальної М1 та М2 субпопуляцій макрофагів / мононуклеарів (CD68+ та CD163+) у різних тканинних компартментах плаценти (в амніотичній оболонці, стромі, кровоносних капілярах або фіброзно змінених термінальних ворсинах, або в міжворсинчастому просторі) визначається їх функціональним станом та роллю відповідно до перебігу ЗВУРП. Показано, що у жінок, вагітність яких ускладнена ЗВУРП та завершилась пологами після 37 тижня вагітності на відміну від жінок, вагітність яких ускладнена ЗВУРП та завершилась пологами до 36^{+6} тижня вагітності рівень експресії прозапальних CD68+ макрофагів / мононуклеарів підвищений у фіброзно змінених термінальних ворсинах і міжворсинчастому просторі, але знижений у стромі та всередині кровоносних судин ворсин, тоді як рівень експресії протизапальних CD163+ макрофагів / мононуклеарів зростає в кровоносних капілярах ворсин і міжворсинчастому просторі, але знижується в амніотичній оболонці та стромі термінальних ворсин.

Доповнено наукові дані відносно морфологічної та морфометричної складової плацентарної тканини при ЗВУРП у жінок, що народили дитину до 36^{+6} тижня вагітності, зокрема відзначено більш виражені ознаки гіповаскуляризації (зниження показників діаметру та площі гемокапілярів, показників відсотку утворення синцитіокапілярних мембран від всіх капілярів термінальних ворсин плаценти, об`ємної щільності капілярів) та ознаки гіпоплазії ворсин хоріона (зниження проліферації термінальних ворсин та частки симпластичних вузликів, збільшення товщини синцитіотрофобласту термінальних ворсин та об`ємної щільності сполучної тканини).

Розроблено та впроваджено в практику нові методи визначення локалізації М1 та М2 макрофагів / мононуклерів у плаценті, що може застосовуватися в клініко-діагностичних лабораторіях для оцінки та діагностики субпопуляційного складу тканин плаценти при ЗВУРП.

Запропоновано для прогнозування на ранніх етапах розвитку ЗВУРП з народженням дитини з малою вагою до гестаційного віку використовувати визначення концентрації ТФР-β_1 та рЕнг в крові матері. Зниження рівня концентрації ТФР-β_1 нижче 143,7 нг/мл та підвищення рівня рЕнг вище 4,5 нг/мл – свідчить про потенційно високий ризик розвитку плода малої ваги до гестаційного віку у жінок, вагітність яких обтяжена ЗВУРП.

Встановлено, що рівень концентрації ТФР-β_1 вірогідно вищий (47,2±3,5 нг/мл проти 39,7±2,2 нг/мл, $p<0,05$), а рівень концентрації рЕнг, навпаки, вірогідно нижчий (9,2±0,2 нг/мл проти 9,8±0,2 нг/мл, $p<0,05$) у жінок зі ЗВУРП, які народили дитину до 36^{+6} тижня вагітності, ніж у жінок зі ЗВУРП, що народили дитину після 37 тижня вагітності, що також має несприятливе прогностичне значення у ранній діагностиці передчасних пологів до відповідного терміну гестації при вагітності ускладненій ЗВУРП.

Ключові слова: затримка внутрішньоутробного розвитку плода, трансформуючий фактор роста β_1, розчинний ендоглін, мала вага до гестаційного віку, достатня вага до гестаційного віку, народження дитини після 37 тижня вагітності, народження дитини до 36^{+6} тижня вагітності, CD68+ макрофаги / мононуклеари, CD163+ макрофаги / мононуклеари, М1 та М2 субпопуляції макрофагів / мононуклеарів.

Summary

Berezhna V.A. Prognostic criteria of transforming growth factor β and the role of macrophages in the formation of fetal intrauterine growth restriction. – Qualification research work on the manuscript basis.

The dissertation for the academic degree of Doctor of Philosophy in the specialty 14.01.01. «Obstetrics and Gynecology» (222 – Medicine). – Ukrainian

Medical Stomatological Academy of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Poltava, 2021. – Ukrainian Medical Stomatological Academy of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Poltava, 2021.

The dissertation presents theoretical generalization and a new solution of a relevant scientific and practical problem in obstetrics, which relies on the study of the level of TGF-β_1 and sEng as prognostic criteria and determining the macrophage polarization in the formation of fetal intrauterine growth restriction (IUGR).

IUGR remains a pressing problem in modern obstetrics, neonatology, and gynecology due to high rates of perinatal complications and morbidity, mortality, significant reproductive losses, and the cost of neonatal treatment, as well as social and economic losses. It is worth noting that an in-depth study of this complication of pregnancy is needed to detect IUGR at an early stage for more effective treatment, and most importantly, for its timely prevention. In the regulation of the functional state of the placenta and fetal development, the key role belongs to angiogenic factors, such as transforming growth factor β_1 (TGF-β_1) and its co-receptor, soluble endoglin (sEng). Macrophages also play an important role in the regulation of pregnancy and the maintenance of homeostasis in the mother-placenta-fetus system. Disruption of macrophage polarization has been noted in placental dysfunction that accompanies pathological pregnancy, including IUGR. Therefore, the search for new prognostic markers of early diagnosis of IUGR is still ongoing.

The aim of the study was to evaluate the clinical course of pregnancy and childbirth in women with IUGR, determine the prognostic value of angiogenic markers and polarization of macrophages in the formation of fetal intrauterine growth restriction.

The objectives of the study were to conduct a retrospective analysis of the course of pregnancy, complicated by IUGR, and identify the risk factors; to determine the general clinical difference and to evaluate the data of ultrasound examination with Doppler control between women with IUGR who gave birth to children with low and sufficient weight before gestational age; to determine the level of angiogenic factors (TGF-β_1 and sEng) in the serum of pregnant women with

IUGR who gave birth to children with low and sufficient weight before gestational age; on the basis of levels of angiogenic factors (TGF-β_1 and sEng) to offer prognostic criteria of IUGR; to characterize the morphofunctional state of the placenta through the comprehensive macro- and microscopic histological examination, to conduct organo- and morphometric analysis of the placental tissue in women whose pregnancy was complicated by IUGR with different stages of childbirth; to investigate the state and role of polarization of M1/M2 macrophages in the placental tissue of women whose pregnancy was complicated by IUGR with different stages of childbirth.

To achieve the goal and the objectives of the study, retrospective, general clinical, instrumental (ultrasound and Doppler assessment), enzyme-linked immunoassay, organo- and morphometric, morphological, immunohistochemical, and statistical methods of research were used.

For the first time, the study identified the role of angiogenic factors (TGF-β_1 and sEng in the blood) and the process of polarization of M1/M2 macrophages (CD68+ and CD163+ macrophages / mononuclear cells in the placenta) as the key risk factors for the development of pregnancy complicated by IUGR and resulting in the delivery of a child with low birth weight before gestational age.

For the first time, the prognostic significance of predictors for early detection of a child with low weight before gestational age was calculated based on ROC-analysis using the markers – TGF-β_1 (AUC = 0.807; Std. Error = 0.102; 95% CI 0.6075-1.007; p = 0.01), the quality of prediction at the distribution point d = 143.7 with a sensitivity of 83.3% and a specificity of 62.5%) and sEng (AUC = 1.0; Std. Error = 0; 95% CI 1–1; p <0.0001), the quality of prediction at the distribution point d = 4.5 with a sensitivity of 100% and a specificity of 75%, the value of d>4.5).

For the first time, it was found that the polarization disruption of pro- and anti-inflammatory M1 and M2 subpopulations of macrophages / mononuclear cells (CD68+ and CD163+) in different tissue compartments of the placenta (in the amniotic membrane, stroma, blood capillaries or in the fibrously altered terminal villi, or the intervillous space) is determined by their functional state and role in

accordance with the course of IUGR. It has been shown that in women whose pregnancy was complicated by IUGR and resulted in childbirth after 37 weeks of pregnancy, in contrast to women whose pregnancy was complicated by IUGR and resulted in up to 36^{+6} weeks of pregnancy, the expression of proinflammatory CD68 + macrophages / mononuclear cells increased in the fibrously altered terminal villi and intervillous stroma and inside the blood vessels of the villi, whereas the level of expression of anti-inflammatory CD163 + macrophages / mononuclear increased in the blood capillaries of the villi and the intervillous space, but decreased in the amniotic membrane and stroma of the terminal villi.

The research supplemented the scientific data on the morphological and morphometric component of the placental tissue in IUGR in women who gave birth up to 36^{+6} weeks of pregnancy, in particular, indicating the more pronounced signs of hypovascularization (decreased diameter and area of hemocapillaries, percentage of syncytiocapillary membranes formation from all capillaries of placental terminal villi, volume density of capillaries) and the signs of hypoplasia of chorionic villi (the decreased proliferation of terminal villi and the proportion of symplastic nodules, the increased thickness of the syncytiotrophoblast of the terminal villi and volume density of connective tissue).

New methods for determining the localization of M1 and M2 macrophages / mononuclear cells in the placenta have been developed and implemented into practice, which can be used at clinical diagnostic laboratories to assess and diagnose the subpopulation composition of the placental tissues in IUGR.

It is proposed to use the determination of TGF-β_1 concentration and sEng in the mother's blood when predicting the fetus with low weight before gestational age at early stages of IUGR development. A decreased level of TGF-β_1 below 143.7 ng/ml and an increased level of sEng above 4.5 ng/ml indicates a potentially high risk for the development of the fetus with low birth weight before gestational age in women whose pregnancy is complicated by IUGR.

It was found that the concentration level of TGF-β_1 is reliably higher (47.2 ± 3.5 ng/ml vs. 39.7 ± 2.2 ng/ml, $p<0.05$), and the concentration level of sEng, on the

contrary, is reliably lower (9.2 ± 0.2 ng/ml vs. 9.8 ± 0.2 ng/ml, $p<0.05$) in women with IUGR who gave birth to children prematurely than in women with IUGR who gave birth to children at term, which also has an unfavorable prognostic value in the early diagnosis of preterm birth before the appropriate gestational age in pregnancy complicated by IUGR.

Keywords: fetal intrauterine growth restriction, transforming growth factor β_1, soluble endoglin, low birth weight before gestational age, sufficient weight before gestational age, birth after 37 weeks of pregnancy, birth up to 36^{+6} weeks of pregnancy, CD68+ macrophages / mononuclear cells, CD163+ macrophages / mononuclear cells, M1 / M2 subpopulations of macrophages / mononuclear cells.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1) Етіологічні та патогенетичні аспекти затримки внутрішньоутробного розвитку плода. / А.М. Громова, В.А. Бережна // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2018. – Т.18, №3(63). – С. 301-307.
   (Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел стосовно ЗВУРП)
2) Роль гінекологічних захворювань при затримці внутрішньоутробного росту плода. / А.М. Громова, В.А. Бережна // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – №1(155). – С. 116-120.
   (Здобувачем проведено літературний пошук, аналіз та систематизація даних, статистична обробка результатів, написання тексту)
3) Клініко-діагностичні зміни при затримці внутрішньоутробного розвитку плода. / В.А. Бережна // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – №4(158). – С. 96-100.
4) Імунологічна оптимізація методів діагностики при затримці внутрішньоутробного розвитку плода. / В.А. Бережна // Вісник проблем біології і медицини. – 2021. – №1(159). – С. 23-26.

5) Features of ultrasound imaging in fetal intrauterine growth retardation. / V.A. Berezhna // Проблеми екології та медицини. – 2021. – Т.25, №1-2. – С.3-6.

Статті, що надруковані у виданнях науково-метричної бази Web of science:

6) Акушерські й антенатальні фактори затримки внутрішньоутробного росту плода (ретроспективний аналіз). / А.М. Громова, В.А. Бережна // Запорізький медичний журнал. – 2020. – Т.22, №3(120). – С.395-401.
(Здобувачем проведено літературний пошук, аналіз та систематизація даних, статистична обробка результатів, написання тексту)
7) Morphometric analysis of placental and m1/m2 macrophages polarization in the detection of fetal growth restriction. / V.A. Berezhna, A.M. Gromova, T.V. Mamontova, N.O. Udovytska, I.I. Starchenko, L.E. Vesnina // Світ медицини та біології. – 2021. – №1(75). – С. 012-017.
(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, відбір матеріалу для дослідження, аналіз отриманих результатів, оформлення статті до друку)

Статті, що надруковані у виданнях науково-метричної бази Scopus:

8) CD68+ M1 macrophages is associated with placental insufficiency under fetal growth restriction. / V.A. Berezhna, T.V. Mamontova, A.M. Gromova // Wiadomości Lekarskie. – 2021. – Volume 74, Issue 2. – С. 213-219.
(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, відбір матеріалу для дослідження, аналіз отриманих результатів, оформлення статті до друку)

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

9) Ретроспективний аналіз жінок з затримкою внутрішньоутробного розвитку плода. / В.А. Бережна // Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів. Науково-

практична конференція (Харків, 16-17 травня 2019 р.): тези дод №1. – Харків, 2019. – С. 21.

10) Критерії факторів ризику затримки внутрішньоутробного розвитку плода при УЗД дослідженні. / В.А. Бережна, А.М. Громова // Акушерство та гінекологія: актуальні та дискусійні питання. Пленум асоціації акушер-гінекологів України та науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, 3-4 жовтня 2019 р.): мат. доп. – Київ, 2019. – С. 3- 4.

(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, статистичну обробку результатів)