

Цывьян П.Б., Ковалев В.В., Косовцева Н.В.
**РАННИЕ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА,
 СВЯЗЬ С УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ МАРКЕРАМИ ПАТОЛОГИИ**

ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ;

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Росмедтехнологий»;

Учреждение РАН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Увеличение толщины воротникового пространства (ТВП) более 3,0 мм и отрицательный кровоток в венозном протоке (ВП), обнаруженные в 11–14 недель беременности, являются ультразвуковыми маркерами генетической патологии и/или высокой вероятности формирования пороков сердца. Одним из патофизиологических объяснений этого феномена является возникновение транзиторной сердечной недостаточности и увеличение постнагрузки на левый желудочек (ЛЖ) сердца у эмбриона в этот период развития. Ранее нами было показано увеличение времени изоволюмического расслабления (ВИР) ЛЖ как отражение увеличения систолического артериального давления при формировании синдрома задержки развития плода. При эхокардиографическом исследовании у 122 нормально развивающихся эмбрионов человека было измерено ВИР = 30 ± 2 мс. У 27 эмбрионов с увеличенным ТВП и отрицательным потоком в ВП значение ВИР составило 41 ± 3 мс ($p < 0.01$), что может служить подтверждением вероятного повышения постнагрузки для сердца эмбриона в этот период развития.

Ключевые слова: внутриутробная гипертензия, изоволюмическое расслабление левого желудочка эмбриона.

Прогресс ультразвуковой техники обеспечил возможность динамического наблюдения за гестационным процессом, что позволяет связать некоторые особенности ультразвуковой картины, наблюдаемой у эмбрионов в 11–14 недель, с повышенной вероятностью развития генетически программируемой патологии и тяжелых пороков сердца. Одним из таких маркеров явилось увеличение толщины воротникового пространства (ТВП) эмбриона, связанное с высоким риском обнаружения у плода анулоидии: синдрома Дауна, трисомией по 13, 18 хромосомам [1, 2]. Под увеличением ТВП понимают временное накопление в подкожном пространстве шеи жидкости (локальный отек) более 3 мм [2]. В 1997 году были получены сведения о корреляции между увеличением ТВП и обнаружением аномального профиля кровотока в венозном протоке в 11–14 недель [4]. Аномальный профиль проявлялся в том, что в период поздней диастолы, совпадающем по времени с сокращением правого предсердия, в венозном протоке регистрировался нулевой или отрицательный (реверсивный) кровоток [4]. Предполагалось, что наличие отрицательного потока крови является результатом ретроградного проведения пульсовой волны по нижней полой вене в венозный проток от сокращающегося правого предсердия [5]. На связь между ТВП и особенностями кровотока в венозном протоке указывают данные о синхронности нормализации обоих показателей по завершении 14 недели внутриутробного развития [9]. Очевидно, что некие общие изменения характера функционирования сердечно-сосудистой системы эмбриона человека в этот период развития должны лежать в основе возникновения этих феноменов. Локальный отек шеи, возникающий при увеличении ТВП, и ретроградное проведение пульсовой волны в венозный проток могут быть результатом повышения венозного давления и общего периферического сосудистого сопротивления у эмбриона в этот период.

Ранее при исследовании плодов с задержкой внутриутробного развития нами был продемонстрирован феномен компенсаторной артериальной гипертензии, показателем которой было увеличение времени изоволюмического расслабления левого желудочка [10].

Выяснению механизмов увеличения толщины воротникового пространства и появлению реверсного потока крови в венозном протоке, а также возможной связи их с изменением периферического сопротивления сосудистой системы эмбриона посвящена данная работа.

Материалы и методы

Исследованы две группы беременных женщин в сроках 11–14 недель. В контрольную группу вошли 122 женщины с нормальными показателями ТВП и нормальным характером кровотока в венозном протоке и дальнейшим физиологическим течением беременности. В основную группу вошли 27 беременных, у которых в

сроках 11–14 недель было обнаружено увеличение ТВП более 3 мм и реверсный характер кровотока в венозном протоке. Женщины этой группы прошли через процедуру кордоцентеза для получения плодовых клеток с целью проведения генетического анализа. По результатам такого анализа в трех случаях была выявлена трисомия по 21 хромосоме. У оставшихся женщин беременность в дальнейшем развивалась без патологии.

Исследования были проведены при помощи ультразвукового диагностического аппарата Philips HD 11 (Голландия – США) с доплеровским блоком и конвексным датчиком с частотой 5 Мгц. После измерения стандартных для этого срока биометрических показателей и уточнения срока гестации было проведено измерение толщины воротникового пространства. ТВП и поток в венозном протоке были измерены строго в соответствии с рекомендациями международного фонда фетальной медицины (Fetal Medicine Foundation www.fetalmedicine.com) сертифицированным этим фондом специалистом. Регистрация потока крови в венозном протоке была получена в поперечном сечении тела эмбриона на уровне брюшной полости из точки перехода вены пуповины в венозный проток.

Для измерения времени изоволюмического расслабления (ВИР, мс) левого желудочка был получен четырехкамерный срез сердца. Пробный доплеровский объем 2 мм помещен в полость левого желудочка под митральным клапаном и несколько отклонен в сторону выходящего тракта желудочка. При этом на доплерограмме трансмитрального потока виден характерный сигнал закрытия аортального клапана. Время изоволюмического расслабления левого желудочка соответствует интервалу от момента закрытия клапана до начала ранней волны (Е) трансмитрального потока. В режиме «кинопетли» были записаны не менее трех последовательных сердечных комплексов, в которых измеряли ВИР и соответствующие периоды между кардиоциклами.

Для оценки связи между ВИР и гестационным возрастом был проведен регрессионный анализ с использованием смешанной модели ANOVA (модель случайных коэффициентов). Для этого значения ВИР были логарифмически преобразованы для получения относительно нормального распределения. Различия между основной и контрольной группами по другим параметрам были определены при использовании t-теста. Все данные представлены как $M \pm$ стандартное отклонение. Уровень статистической значимости был определен как $p < 0.05$.

Результаты

При оценке клинических данных беременных женщин основной и контрольной групп не выявлены статистически значимые различия в количестве предыдущих беременностей и возрасте.

Ультразвуковое исследование не выявило также значительных различий в гестационном сроке исследованных эмбрионов, который оценивали по копчико-теменному размеру. С увеличением возраста эмбриона величина ВИР несколько возрастает. Наилучшее описание зависимости, близкое к линейной, было получено в случае, когда время изоволюмического расслабления (по оси ординат) было представлено в логарифмической форме. Уравнение регрессии для основной группы выглядело следующим образом:

$$\lg(\text{ВИР}_{[\text{мс}]}) = 1.44 + 0,00575 \text{ ГС}_{(\text{нед})}$$

Для группы с увеличением ТВП и отрицательным потоком крови в венозном протоке это уравнение имело вид:

$$\lg(\text{ВИР}_{[\text{мс}]}) = 1.54 + 0,00576 \text{ ГС}_{(\text{нед})}$$

где ВИР – время изоволюмического расслабления (мс), ГС – гестационный срок (недели)

Как видно из уравнений, угол наклона зависимостей для обеих

групп был одинаков.

Было оценено влияние частоты сердечных сокращений на величину времени изоволюмического расслабления. В обеих группах ЧСС практически не влияла на этот показатель. Для каждого гестационного срока величина ВИР в группе с реверсным кровотоком в венозном протоке была примерно на 39 % больше, чем в группе с нормальными показателями. В первой группе среднее значение времени изоволюмического расслабления составило 30 ± 2 мс, а во второй группе – 41 ± 3 мс ($p < 0.001$)

Обсуждение

Оценка сократительной функции сердца плода, а тем более эмбриона, всегда страдает некоторой неопределенностью, связанной с невозможностью измерения постнагрузки, против которой работает сердце, или систолического артериального давления. В связи с этим приходится использовать косвенные методы оценки. Одним из таких методов является измерение изоволюмических времен сокращения и расслабления [7]. Время изоволюмического сокращения – это момент от активации миокарда желудочка до открытия полулунных клапанов и начала изгнания крови. Другими словами – это время, необходимое сердцу для того, чтобы внутрижелудочковое давление превысило системное давление крови. Очевидно, что продолжительность этого временного интервала будет зависеть как от собственно величины артериального давления, так и от уровня сократительной активности миокарда. Как показатель величины постнагрузки (систолического артериального давления), второй показатель – время изоволюмического расслабления (ВИР) более удобен и методически верен. ВИР – время необходимое для того, чтобы внутрижелудочковое давление, которое в момент закрытия полулунных клапанов равно конечно-систолическому давлению, снизилось до практически нулевого значения, необходимого для начала наполнения желудочка. Очевидно, что с чем больше значения конечно-систолического давления начинается процесс изоволюмического расслабления, тем больше времени ему потребуется для достижения нулевого уровня давления. Оценка обоих изоволюмических времен (сокращения и расслабления) была положена в основу оценки непрямого индекса производительности миокарда – так называемого Tei- индекса [7].

Полученные нами результаты демонстрируют значительное увеличение ВИР в группе эмбрионов с увеличенным ТВП и отрицательным потоком крови в венозном протоке. Таким образом, очевидно, что эти ультразвуковые феномены связаны с увеличением постнагрузки на сердце эмбриона (о чем свидетельствует возрастание ВИР).

Что может быть причиной высокой постнагрузки?

Беременность и рост плода непосредственно определяются процессами развития сосудистых систем плаценты и эмбриона. В настоящее время показана ведущая роль ангиогенных ростовых факторов – сосудистого эндотелиального (vascular endothelial growth factor – VEGF) и плацентарного (placental growth factor – PlGF) в регуляции плацентарного и плодового ангиогенеза [8]. Более того, физиологическое развитие указанных систем является результатом тонкого баланса концентраций ангиогенных и антиангиогенных факторов, замедляющих рост сосудов и пролиферацию эндотелиальных клеток. К числу последних относятся растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sVEGFR-1) и растворимая форма эндоглина (sEng). Большое число патологических состояний, наблюдаемых во время беременности, связано с нарушением продукции и баланса этих факторов [9]. Снижение концентрации ангиогенных факторов продемонстрировано при генетической патологии, в особенности при различных формах анеуплоидии (по 21, 13, 18 хромосомам) [8]. Нарушение баланса про- и антиангиогенных факторов роста показано при развитии больших пороков сердца [9]. Есть данные о раннем изменении соотношения между ангиогенными и антиангиогенными факторами в случае развития преэклампсии (гестоза). При этом изменение баланса факторов наблюдается в конце первого триместра, в то время как клиническая картина гестоза разворачивается в конце второго или даже третьего триместров. В некоторых работах, опубликованных в последнее время, высказывается мнение о возможности использования некоторых соотношений между про- (PlGF) и антиангиогенными (sEng) факторами как ранних диагностических маркеров развития будущего гестоза [8].

В процессе роста и развития плод выделяет в кровотоки гормоны и биологически активные вещества. Переходя через плаценту, эти

вещества транспортируются материнской кровью, достигают нейроэндокринной системы матери и взаимодействуют с ней. Таким образом, материнский организм через этот сложный поток гормонов и пептидов получает информацию о правильности и темпах развития организма плода и реагирует в ответ выделением своих регуляторных факторов и ростовых факторов. Часть ростовых факторов синтезируется плацентой и также участвует в регуляции развития плодового организма и его сосудистой системы. Эта схема получила название механизма плодово-плацентарно-материнского взаимодействия [15]. Можно предположить, что часть из этих регуляторных факторов является сосудистыми факторами роста. При этом, факторы роста выступают некими универсальными регуляторами, изменение синтеза которых через модуляцию развития сосудистой сети способно повлиять на рост и формирование организма эмбриона и плода.

11–14 неделя беременности – ответственный срок установления баланса между скоростью и темпами развития сердца и сосудистой системы. Показано значительное уменьшение синтеза проангиогенных ростовых эндотелиальных факторов роста при анеуплоидии и тяжелых врожденных пороках сердца [13]. Можно предположить, что продемонстрированное увеличение в этом сроке ВИР у эмбрионов второй группы – результат транзитного снижения темпов роста сосудистой системы, когда для сердца эмбриона плода импеданс этой системы временно увеличивается, что приводит к периферическому отеку (увеличению ТВП) и появлению ретроградного тока крови в венозном протоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benacerraf B., Gelman R., Frigoletto F.D. Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome. // *N.Engl. J. Med.*- 1987.- V.317.- P.1371-1374.
2. Nicolaides K.H., Azar G., Byrne D. et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy // *Brit. Med.J.*- 1992.- V.304.- P. 867-869.
3. Montenegro N., Matias A., Areias J.S. et al. Increased fetal nuchal translucency: possible involvement of early cardiac failure // *Ultrasound.Obstet.Gyn.*- 1997.- V.10.- P.265-268.
4. Matias A., Montenegro N., Areias J.S., et al. Anomalous venous fetal return associated with major chromosomalopathies in the late first trimester of pregnancy // *Ultrasound.Obstet.Gyn.*- 1997.- V.11.- P.209-213.
5. Huisman T.W.A., Bilardo C.M. Transient increase in nuchal translucency thickness and reversed end-diastolic ductus venosus flow in a fetus with trisomy 18. // *Ultrasound.Obstet.Gyn.*- 1997.- V.10.- P.397-399.
6. Tsyvian P.B., Markova T.V., Mikhailova S.V. et al. Left ventricular isovolumic relaxation and rennin-angiotensin system in the growth restricted fetus. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 2008, V.140, N1, P.33-37.
7. Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1997, V. 10, P.169–178.
8. Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.*, 2005, V. 65, P. 550–563.
9. Catarino ., Rebelo I., Belo L. et al. Fetal and maternal angiogenic/anti-angiogenic factors in normal and preeclamptic pregnancy. *Growth Factors*, 2009, V.27, N6, P. 345–351.

Tsyvian P.B., Kovalev V.V., Kosovtsova N.V. **ULTRASOUND MARKERS OF THE GENETIC PATHOLOGY AND EARLY HEMODYNAMIC CHANGES IN HUMAN EMBRYO**

Abstract. First trimester nuchal translucency (NT) and ductus venosus reverse blood flow (DVRBF) are used as ultrasound markers (UM) to determine the risk of fetal aneuploidy, heart defects and subsequent maternal preeclampsia. One pathophysiological explanation for these UM, encompassing both normal and pathological outcomes, is the development of transient heart failure due to increased vascular resistance (afterload). Left ventricular isovolumic relaxation time (LV IRT) was demonstrated as sensitive index of afterload increase in the second and third trimester fetus. The objective of study was to

determine LV IRT in normally developing embryos and embryos with early UM of chromosomal and cardiac abnormalities and to test the hypothesis of embryonic hypertension as a cause of transient heart failure.

An ultrasound study in 122 normally developing and 27 human embryos with increased NT (>3mm) and DVRBF at gestational ages 11-14 weeks was performed. Mean LV IRT (41 ± 3 ms) was 36.6 percent longer in embryos with UM as compared to the normal subset (30 ± 2 ms) ($p < 0.001$).

Considerable reduction in vascular endothelial growth factors (VEGF) synthesis was demonstrated in embryos with UM of chromosomal, cardiac abnormalities and subsequent development of maternal preeclampsia. We speculate that the disturbances in VEGF synthesis may cause some delay in the development of the vascular bed in comparison with heart development and a transitory increase in afterload in the 11-14 weeks embryo. Our observations support the hypothesis that transient heart failure due to increased afterload may be one of the causes of NT and DVRBF in embryo.

Key words: intrauterine hypertension, isovolumic relaxation

Авторская справка

Цывян Павел Борисович

ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра нормальной физиологии

Россия, 620109, Екатеринбург, ул. Репина, 3

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Уральский НИИ охраны материнства и младенчества, Екатеринбург

e-mail: tsyvia@hotbox.ru

Ковалев Владислав Викторович

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Уральский НИИ охраны материнства и младенчества

Россия, Екатеринбург, ул. Репина, стр. 1

Косовцева Наталья Владимировна

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Уральский НИИ охраны материнства и младенчества

Россия, Екатеринбург, ул. Репина, стр. 1

Autors

Tsyvian Pavel B.

The State Budget Educational Establishment of Higher Professional Education The Ural State Medical Academy Ministry of Social Development and Health Care in Russia, Department of physiology

Russia, Ekaterinburg of street of Repina, 3

Ural Research Institute of Maternity and Child Care

Ekaterinburg, Russia, Repina str.,1

e-mail: tsyvia@hotbox.ru

Kovalev Vladislav V.

Ural Research Institute of Maternity and Child Care

Ekaterinburg, Russia, Repina str.,1

e-mail: omm@k66.ru

Kosovtsova Natalya V.

Ural Research Institute of Maternity and Child Care

Ekaterinburg, Russia, Repina str.,1

e-mail: omm@k66.ru

УДК 616-003.93

Шуман Е.А., Коротков А.В., Макеев О.Г.
**РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ГЕНО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Екатеринбург, Россия;

ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. На модели ишемии миокарда кролика показан значительный терапевтический эффект от введения в зону ишемии мультитипотентных мезенхимальных клеток, предварительно трансфицированных плазмидой, несущей ген VEGF. В группе с введением pWZLblast-VEGF трансфицированных клеток по сравнению с контролем в области моделирования ишемии возросло число функционирующих капилляров (на 224,2 %, $p < 0,05$), плотность (на 350 %, $p < 0,01$), а также обмен поверхности (245, 4 %, $p < 0,01$) и pO_2 (на 282 % $p < 0,01$). Кроме того, введение pWZLblast-VEGF привело к формированию значительного числа анастомозов между новообразующимися сосудами в зоне ишемии и сосудистой сетью неповрежденной ткани.

Ключевые слова: ишемия миокарда, неоангиогенез, мультитипотентные мезенхимальные стромальные клетки, трансфекция, VEGF.

Введение

В течение последнего времени генная и генно-клеточная терапия заболеваний сердца находятся в центре внимания многих отечественных и зарубежных исследователей. Рядом работ, наряду с результатами, показавшими перспективность такого подхода, был выявлен ряд проблем, ограничивающих применение данных методов в широкой клинической практике. Так, было показано, что векторы на основе плазмид безопасны, но не в состоянии обеспечить должную эффективность трансфекции *in vivo* и необходимую длительность экспрессии целевого гена, в то время как векторные системы на основе вирусов более эффективны, но не имеют значимой органоспецифичности, а также вызывают иммунный ответ [3, 7, 10].

С другой стороны, известны многочисленные исследования, показавшие перспективность введения экспериментальным животным стволовых клеток, в частности, мультитипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), для купирования моделируемой сердечной недостаточности. Однако в ходе клинических исследований в целом ряде случаев была отмечена спонтанная

дифференцировка части введенных в миокард ММСК в остеобласты и адипоциты, что, безусловно, является препятствием для клинического применения данного метода [4, 6, 8, 9].

Применение генетически модифицированных ММСК, сверхэкспрессирующих гены факторов ангиогенеза, в частности VEGF, продемонстрировало лучшие результаты как в отношении стимуляции ангиогенеза [2], так и в отношении функций сердца в целом [5]. Однако в данных исследованиях использовались векторы на основе вирусов, интегрирующиеся в геном, что потенциально может вызвать непредсказуемые в дальнейшем последствия и мало применимо в клинической практике. Исследований, направленных на изучение эффективности применения ММСК, предварительно трансфицированных векторами с эпигеномной экспрессией генов, кодирующих ангиогенез, в доступной литературе нами не найдено.

Поэтому целью настоящей работы явилась оценка эффективности применения ММСК, трансфицированных невирусными векторами, кодирующими фактор роста эндотелия сосудов (VEGF).

Материалы и методы

В качестве вектора нами был использован pWZLblast-VEGF, любезно предоставленный доктором Bruce Spiegelman, (Dana Farber Cancer Institute, USA).

ММСК выделяли из жировой ткани кролика методом, описанным ранее [1]. Полученные клетки трансфицировали pWZLblast-VEGF или плазмидой, несущей ген флуоресцирующего протеина EGFP (Addgene plasmid 13031), с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) по оптимизированному протоколу.

Эксперименты выполняли на взрослых кроликах-самцах породы Шиншилла весом 2,8-3,2 кг. Моделирование окклюзии передней нисходящей артерии сердца проводили путем ее неполной (80 %) перевязки на матроне. Сразу после перевязки в миокард в область ишемии равномерно по площади вводили 10^6 клеток, предварительно трансфицированных pWZLblast-VEGF или EGFP. Эксперименталь-