

Особенности метаболического резерва фагоцитов и антиоксидантной активности крови при привычном невынашивании беременности в I триместре

А.З.Хашукоева¹, Б.А.Никулин², М.А.Маматиева¹, Д.А.Ходжаева¹

¹Российский государственный медицинский университет,
кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета, Москва
(зав. кафедрой – проф. О.В.Макаров);

²Московский государственный медико-стоматологический университет,
кафедра медицинской генетики
(зав. кафедрой – проф. Л.В.Окуленко)

Значимую роль в формировании клеточного феномена отторжения плода могут иметь активированные фагоциты, их антителозависимая цитотоксичность, обусловленная метаболизмом кислорода, и продукты секреции – цитокины. В связи с этим представляет научный и практический интерес изучение резерва супероксиданионобразующей функции фагоцитов крови и активности супероксиддисмутазы как прямого фермента антирадикальной защиты при привычном невынашивании беременности. Эти показатели крови с одной стороны позволяют изучить участие свободнорадикального окисления в патогенезе развития выкидышей, а с другой – осуществлять контроль за эффективностью терапии, направленной на лечение этой патологии. При изучении супероксиданионобразующей функции фагоцитов крови, уровня супероксиддисмутазы и цитокинов в крови у 130 беременных в возрасте от 19 до 39 лет (средний возраст $27,8 \pm 4,7$ года) в I триместре беременности получены достоверные данные о наличии выраженных изменений в показателях антиоксидантной защиты при угрозе выкидыша и начавшимся выкидышем повышена цитотоксичность фагоцитов за счет усиления продукции ими АФК (активных форм кислорода), что может явиться причиной развития некроза децидуальной оболочки и трофобласта, коагуляционных нарушений, которые и могут привести к самопроизвольному прерыванию беременности или неразвивающейся беременности. Благодаря клинико-лабораторному скринингу, оценке окислительного метаболизма гранулоцитов крови, своевременному и оптимальному режиму терапии гестагенами (Дюфастон®) в сочетании с антиоксидантами (кверцетин, актовегин) беременность может быть пролонгирована.

Ключевые слова: невынашивание беременности, антиоксидантная активность крови, фагоциты, цитокины, активные формы кислорода

Features of the metabolic pool of phagocytes and antioxidant activity of blood in the habitual noncarrying of pregnancy in the first trimester

A.Z.Khashukoeva¹, B.A.Nikulin², M.A.Mamatieva¹, D.A.Khodzhaeva¹

¹Russian State Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology of Medical Faculty, Moscow
(Head of the Department – Prof. O.V.Makarov);

²Moscow State University of Medicine and Dentistry, Department of Medical Genetics
(Head of the Department – Prof. L.V.Okulenko)

Activated phagocytes, antibody-dependent cytotoxicity caused by oxygen metabolism, and cytokines (secretion products) can have a particular influence on the cell phenomenon of fetal rejection. In this connection it is extremely important, both practically and scientifically, to make a research on the properties of superoxide anion-generating function of phagocytes and superoxide dismutase activity as a direct enzyme of antiradical defense in the habitual noncarrying of pregnancy. Such haematological parameters not only make it possible to study the influence of free radical oxidation on the pathogenesis of miscarriages, but also to supervise the effectiveness of the therapy aimed at treating the pathology. While studying the properties of superoxide anion-generating function of phagocytes in blood, the level of superoxide dismutase and cytokines in blood of 130 pregnant women aged from 19 to 39 (mean age 27.8 ± 4.7 years) in the first trimester of pregnancy significant data were obtained reflecting major changes in antioxidant defense in case of miscarriage. According to the research results, patients with the threat of miscarriage have a higher level of phagocytes as a result of the enhanced production of reactive oxygen species. It may cause development of decidual membranes and trophoblast necrosis, coagulative defect and lead to spontaneous miscarriage or to non-developing pregnancy. Pregnancy can be prolonged after clinical-laboratory screening, estimation of oxidative metabolism, optimal and timely regimen of drug therapy, allied with antioxidants (quercetin, actovegin).

Key words: noncarrying of pregnancy, antioxidant blood activity, phagocytes, cytokines, active forms of oxygen

Частота невынашивания беременности (НБ) остается стабильной в течение многих лет и составляет по данным различных авторов от 15 до 20% всех беременностей. В этиологической структуре привычного выкидыша выделяют генетические, анатомические, инфекционные, эндокринные и иммунологические факторы [1–3].

При иммунных нарушениях невынашивание беременности связано исключительно с тромбозами в маточно-плацентарном русле. Причиной этих нарушений могут явиться антифосфолипидный синдром, дефекты плазминогена, дефекты фибринолитической системы, некоторые случаи дисфибриногенемии, сопровождающиеся гиперкоагуляцией, нарушениями в тромбоцитарном звене и функции эндотелия сосудов [4–6].

Однако не у всех беременных с нарушениями тромбообразования и антифосфолипидным синдромом происходит самопроизвольное прерывание беременности. Кроме того, остается группа пациенток, генез привычного выкидыша у которых остается неясным (идиопатическое НБ), что свидетельствует о вероятном наличии других механизмов, дисбаланс которых запускает последовательную цепочку реакций, приводящих к прерыванию беременности.

В регуляции иммунологического равновесия во время беременности участвует самый древний механизм иммунного ответа – система цитотоксических NK-клеток и фагоцитов, которые накапливаются в большом количестве в месте имплантации и играют значительную роль в модулировании цитотоксического иммунного ответа матери по отношению к плаценте. Возникает новое уникальное равновесие между специфическим и неспецифическим иммунитетом матери, при котором центральной клеткой иммунной адаптации становится не лимфоцит, а фагоцит [5–7].

Повышенная функциональная активность нейтрофилов при беременности способствует усиленной генерации этими клетками активных форм кислорода (АФК) и соответствующим адаптационно-приспособительным изменениям в функционировании системы антиоксидантной защиты. В основе поддержания свободнорадикального гомеостаза клеток лежит баланс между образованием и элиминацией свободных радикалов. Устойчивость такого рода равновесия имеет свои границы, которые определяются интенсивностью процессов генерации активных радикалов и мощностью антирадикальной защиты. Резкое усиление свободнорадикальных процессов окисления при недостаточности механизмов антиоксидантной защиты приводит к развитию патологического состояния, которое в настоящее время принято называть «оксидантным стрессом» [8–10].

Целью исследования явилось проведение сравнительного анализа резерва супероксиданиообразующей функции фагоцитов крови при их активации *in vitro* и уровня супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов как ключевого фермента

в ферментативной антиоксидантной защите у женщин с физиологическим течением и привычным невынашиванием беременности.

Пациенты и методы

Комплексное клинко-лабораторное обследование выполнено у 130 беременных. Из них 80 пациенток с невынашиванием беременности включены в основную группу, 50 женщин с физиологическим течением гестационного процесса составили контрольную группу. Возраст беременных обеих групп колебался от 19 до 39 лет (средний возраст $27,8 \pm 4,7$ года). В зависимости от течения беременности пациентки основной группы были разделены на 3 подгруппы: 1-ю подгруппу составили 24 женщины, поступившие в стационар с клинической картиной угрозы прерывания беременности, которые после проведенной терапии выписаны с сохраненной беременностью; 2-ю подгруппу составили 34 женщины, поступившие с клинической картиной начавшегося выкидыша, которые после проведенной терапии также выписаны с сохраненной беременностью; 3-я подгруппа – 22 женщины, поступившие в стационар с неразвивающейся беременностью.

Резерв супероксиданиообразующей функции гранулоцитов крови оценивался при их активации *in vitro* (тест окислительного метаболизма гранулоцитов – ОМГ-тест), результаты оценивались по методу В.А.Комарова и соавт. (авторское свидетельство «Способ оценки активности воспалительного процесса при гломерулонефрите у детей» № 1311736, 1990 г.) в нашей модификации. Исследования концентрации цитокинов ИЛ-1, ФНО и рецепторов к ИЛ-2 в сыворотке крови выполнялись методом твердофазного хемилюминесцентного иммунометрического анализа с использованием тест-систем фирмы DPC на автоматическом анализаторе «Immulite» (США). Определение уровня супероксиддисмутазы в цельной гепаринизированной крови проводилось колориметрическим методом с помощью стандартных тест-наборов фирмы «Randox Laboratories» (Великобритания).

Результаты исследования и их обсуждение

Пациентки с привычным невынашиванием беременности вступили в беременность подготовленными и не имели острых или хронических (в стадии обострения) воспалительных заболеваний органов малого таза и экстрагенитальной патологии (в острой стадии). Проведенный сравнительный анализ резерва супероксиданиообразующей функции фагоцитов крови и активности супероксиддисмутазы у беременных с физиологическим течением беременности (контрольная группа) соответствовал среднестатистическим значениям для здоровых женщин и не выходил за пределы референсных величин. У пациенток 1-й, 2-й и 3-й подгрупп наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, повышение уровня супероксиданиообразующей функции фагоцитов крови и снижение активности супероксиддисмутазы, катализирующей энзиматическую элиминацию активных форм кислорода (табл. 1, рис. 1–2).

Для корреспонденции:

Хашукова Асият Зульфировна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Российского государственного медицинского университета

Адрес: 113152, Москва, Загородное ш., 18а.

Городская клиническая больница №55

Телефон: (495) 952-9661

E-mail: azk05@mail.ru

Статья поступила 02.02.2009 г., принята к печати 08.04.2009 г.

Таблица 1. Показатели крови обследованных пациенток

Изучаемые показатели	Группы обследованных (n = 130)			
	Контрольная группа физиологически протекающая беременность (n = 50)	1-я подгруппа – угроза самопроизвольного выкидыша (n = 24)	Основная группа 2-я подгруппа – начавшийся выкидыш (n = 34)	3-я подгруппа – неразвивающаяся беременность (n = 22)
ФНО, пг/мл	3,3 ± 0,25	7,78 ± 1,11**	19,28 ± 2,42**	7,33 ± 0,21**
ИЛ-1, пг/мл	2,17 ± 0,38	5,48 ± 0,7**	11,24 ± 0,83**	4,96 ± 0,35**
Рецепторы к ИЛ-2, Е/мл	346,7 ± 26,8	382,8 ± 66,34*	383,33 ± 57,9**	311,15 ± 30,3
СОД, ед/г гемогл.	1380,4 ± 120,6	1061,5 ± 45,59*	1205,6 ± 68,6*	1239,46 ± 49,5*
ОМГ, нмоль/л	176,0 ± 13,3	244,5 ± 15,9**	235,33 ± 15,25*	237,42 ± 7,34*

*p < 0,05; **p < 0,001 при сравнении с контрольной группой.

Таблица 2. Динамика изучаемых показателей на фоне лечения

Изучаемые показатели	угроза прерывания беременности (n = 24)		Подгруппы обследованных (n = 80)		неразвивающаяся беременность (n = 22)	
			начавшийся выкидыш (n = 34)			
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
ФНО, пг/мл	7,78 ± 1,11**	6,65 ± 0,48	19,28 ± 2,42**	8,07 ± 0,55	7,33 ± 0,21**	7,18 ± 0,29
ИЛ-1, пг/мл	5,48 ± 0,7**	4,17 ± 0,2	11,24 ± 0,83**	5,27 ± 0,48	4,96 ± 0,35**	4,84 ± 0,3
Рецепторы к ИЛ-2, Е/мл	382,8 ± 66,34*	363,7 ± 47,7	383,33 ± 57,9**	285,6 ± 93,7	311,15 ± 30,3	257,96 ± 25,83
СОД, ед/г гемогл.	1061,5 ± 45,6*	1250,5 ± 54,6	1205,6 ± 68,6*	1233,7 ± 81,04	1239,46 ± 49,5*	1327,13 ± 39,8
ОМГ, нмоль/л	244,5 ± 15,9**	209,4 ± 10,56	235,33 ± 15,25*	209,4 ± 11,04	237,42 ± 7,34*	206,25 ± 5,9

*p < 0,05; **p < 0,001 при сравнении с исходными показателями.

У пациенток основной группы выявлено повышение уровня ФНО, ИЛ-1 в 2,5 раза как следствие выраженной активации фагоцитов крови, которая может быть вызвана иммунологической несовместимостью организмов матери и плода. У пациенток 3-й подгруппы отмечалось, в отличие от контрольной группы и 1-й и 2-й подгрупп, достоверное снижение уровня рецепторов к ИЛ-2 на 10–15%, что может свидетельствовать о снижении антигенной нагрузки на материнский организм (гибель плодного яйца) (рис. 3).

В 1-й подгруппе выявлено значительное повышение продукции фагоцитами крови активных форм кислорода по сравнению со 2-й и 3-й подгруппами и более чем на 30% по сравнению с контрольной группой, что является наиболее информативным показателем в ранней диагностике самопроизвольного выкидыша. Снижение уровня супероксиддисмутазы в этой подгруппе указывает на возможность истощения естественных антиоксидантных систем, а также необходимость своевременного выявления и патогенетической коррекции этих нарушений. Во 2-й под-

группе отмечалось более значительное увеличение уровня провоспалительных цитокинов (ФНО в 6 раз, ИЛ-1 в 5 раз) по сравнению с контрольной группой и в 1,5 раза по сравнению с 1-й и 3-й подгруппами, что свидетельствует о гиперактивации фагоцитов крови, продукции ими токсических радикалов кислорода, приведших к отслойке плодного яйца. Пациенткам 1-й и 2-й подгрупп проведена терапия, направленная на пролонгирование беременности в сочетании с активной антиоксидантной терапией (витамины Е 400 мг в сутки, кверцетин по 1 капс. 3 раза в день в течение 30 дней). Пациенткам с неразвивающейся беременностью (3-я подгруппа) выполнено инструментальное удаление элементов измененного плодного яйца на фоне антибактериальной терапии. Для оценки эффективности терапии всем пациенткам основной группы в динамике проведено повторное (через 10 дней от начала лечения) исследование изучаемых параметров (табл. 2). Нами установлено достоверное снижение уровня цитокинов, ОМГ и восстановление уровня супероксиддисмутазы на фоне

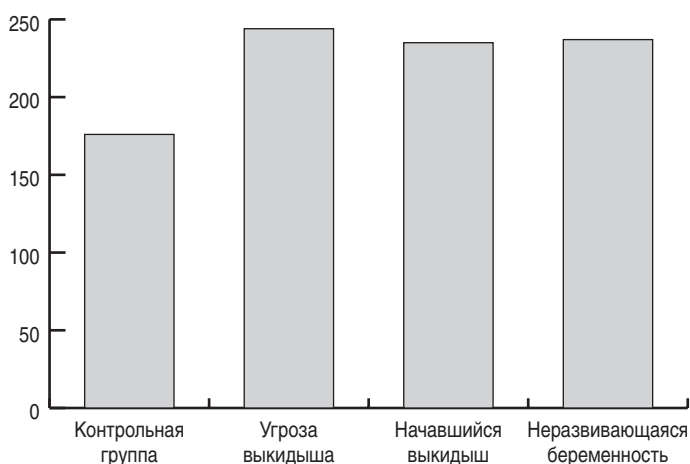


Рис. 1. Показатель резерва супероксиданиообразующей функции фагоцитов крови (ОМГ-тест) в обследуемых группах.

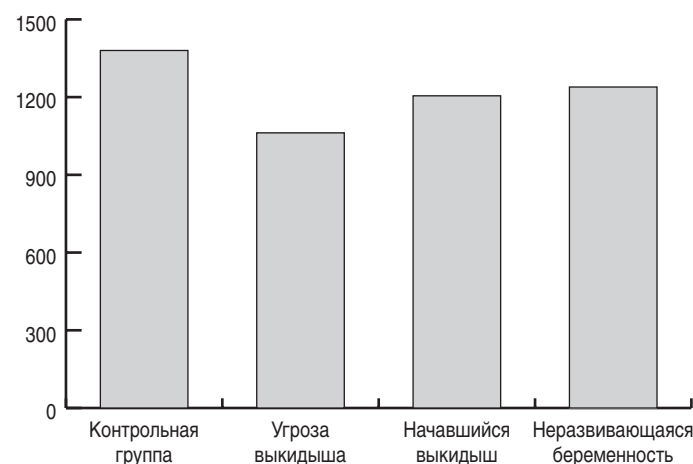


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы в крови женщин при невынашивании беременности.

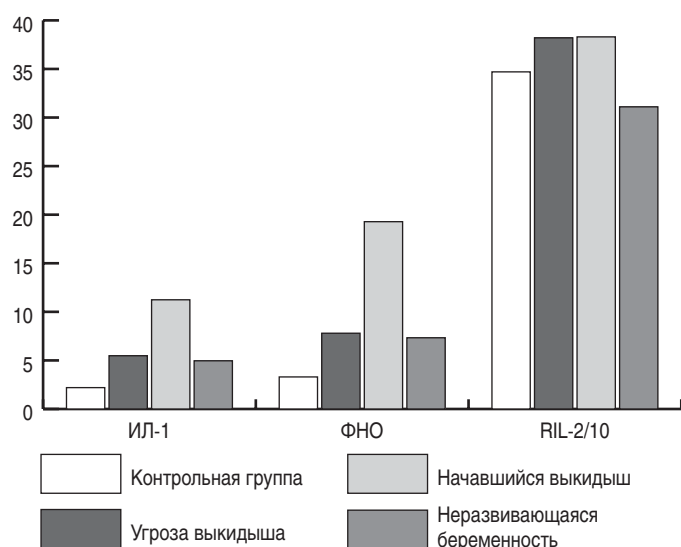


Рис. 3. Содержание цитокинов в крови при невынашивании беременности.

проводимой терапии у пациенток с сохраненной беременностью. В 1-й подгруппе выявлено достоверное ($p < 0,001$) снижение ИЛ-1, ФНО и ОМГ по сравнению с исходным уровнем, а также восстановление СОД на 25%. Во 2-й подгруппе отмечалось резкое снижение в 2,5 раза ФНО, ИЛ-1, снижение ОМГ на 16%, показатель СОД достоверно увеличился ($p < 0,05$). Уровень рецепторов к ИЛ-2, свидетельствующий о деструкции клеток, снизился на 1/3 в процес-

се лечения ($p < 0,001$). Проведенная антиоксидантная терапия способствовала резкому снижению уровня АФК и восстановлению СОД, что привело к уменьшению раздражения фагоцитов, проявляющегося снижением уровней провоспалительных цитокинов. В 3-й подгруппе антиоксидантная терапия не проводилась, и удаление измененного плодного яйца привело к достоверному повышению уровня СОД ($p < 0,05$) и снижению окислительного метаболизма гранулоцитов, что расценивается отсутствием антигенного раздражителя (плодное яйцо). Уровни провоспалительных цитокинов несмотря на проводимую антибактериальную терапию не претерпели существенных изменений по сравнению с исходными показателями, что вероятнее всего связано с коротким временным периодом между исследованиями.

Всем пациенткам основной группы после обследования назначена терапия, направленная на пролонгирование беременности (Дюфастон® 10 мг два раза в день до 20-й недели) в сочетании с активной антиоксидантной терапией (витамин Е 400 мг в сутки, кверцетин по 1 капс. 3 раза в день). Дюфастон® – гестаген, специально созданный для сохранения беременности. Дюфастон® получают из растительного сырья, таким образом, он имеет натуральное происхождение. Молекулярная структура Дюфастона почти идентична структуре натурального прогестерона, в то же время дополнительная двойная связь в молекуле обеспечивает его уникальные особенности: высокую биодоступность при пероральном применении, метаболическую

стабильность и высокую эффективность в минимальной дозировке. Его активность в 20 раз выше активности прогестерона, причем он обладает высокой эффективностью в минимально низкой дозе – всего 20–40 мг в сутки. Именно низкодозированные препараты являются максимально безопасными и могут назначаться беременным пациенткам. Уникальная молекула Дюфастона обуславливает отсутствие андрогенной, кортикоидной и эстрогенной активностей, благодаря чему препарат не обладает маскулинизирующим воздействием на плод женского пола и антиандрогенным на плод мужского пола. Дидрогестерон (Дюфастон®) является уникальным гестагеном для поддержания беременности, так как помимо гестагенного эффекта оказывает иммуномодулирующее влияние на эндометрий и систему «мать–плод» аналогично эндогенному прогестерону. Под действием дидрогестерона увеличивается синтез прогестерониндуцированного блокирующего фактора, снижается уровень провоспалительных цитокинов, что обеспечивает благоприятное течение беременности. Дюфастон® – это единственный гестаген, иммуномодулирующее действие которого подтверждено в официальных международных исследованиях. Пациенткам с сохраненной беременностью в динамике проведено повторное (через 10 дней от начала лечения) обследование изучаемых параметров (см. табл. 2). Нами установлено достоверное снижение у них уровня цитокинов, ОМГ и восстановление уровня супероксиддисмутазы на фоне проводимой терапии.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных нами исследований у беременных с невынашиванием беременности позволили установить, что при угрожающем и начавшемся выкидыше уровень АФК выше, а активность супероксиддисмутазы существенно ниже по сравнению с контрольной группой (физиологически протекающая беременность). У 93,2% беременных при угрозе выкидыша и начавшемся выкидыше отмечалась увеличенная продукция фагоцитами ИЛ-1 и ФНО. Продукция фагоцитами супероксиданионрадикала превышала норму у 91% обследуемых более чем на 40%, при этом предельная концентрация, выше которой начиналось развитие самопроизвольного выкидыша (Cutt-off), установлена нами в 210 нмоль/л. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что у пациенток с угрозой выкидыша и начавшимся выкидышем повышена цитотоксичность фагоцитов за счет усиления продукции ими АФК, что может явиться причиной развития некроза децидуальной оболочки и трофобласта, коагуляционных нарушений, которые и могут привести к самопроизвольному прерыванию беременности или неразвивающейся беременности. Благодаря клинико-лабораторному скринингу, оценке окислительного метаболизма гранулоцитов крови, своевременному и оптимальному режиму медикаментозной терапии (Дюфастон®) в сочетании с антиоксидантами (кверцитин, актовегин) беременность может быть пролонгирована. Определение резерва окислительного метаболизма гранулоцитов крови позволяет выявить усиление

цитотоксичности фагоцитов, даже когда другие показатели не претерпевают изменений, четко мониторировать пациенток с начавшимся выкидышем, отслеживать эффективность проводимого лечения, и доказывает целесообразность изучения уровня АФК и применения антиоксидантной терапии в комплексном лечении невынашивания беременности. Снижение уровней СОД указывает на возможность истощения естественных антиоксидантных систем, угнетение отдельных звеньев эндогенной антиоксидантной защиты и усиление окислительных процессов с высокой вероятностью развития явлений оксидативного стресса при данной патологии, а также на необходимость своевременного выявления и патогенетической коррекции этих нарушений.

Полученные результаты не претендуют на исчерпывающую характеристику патогенетических механизмов развития выкидыша, но служат важным шагом к пониманию биохимических основ заболевания и выработке стратегии профилактики привычного невынашивания беременности.

Литература

1. Lim K.J., Odukoya O.A. et al. Cytokines and immunoendocrin factors in recurrent miscarriage // Hum. Reprod. Up date. – 1998. – V.2 – № 6. – P.469–481.
2. Sadler T.W. Langman's Medical Embryology. – Seventh edition. – 1995. – 460 p.
3. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. – М., 2005. – 303 с.
4. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. Антифосфолипидный синдром, генетические тромбофилии в патогенезе основных форм акушерской патологии // Рус. мед. журн. – Спец. вып. – 2006. – С.3–10.
5. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности– современный взгляд на проблему // Рос. вестн. акуш.-гин. – 2007. – №2. – С.62–65.
6. Демина Т.Н., Майлян Э.А., Гюльмамедова И.Д. Современные взгляды на иммунологию гестационного процесса. – В кн.: Репродуктивное здоровье женщины. – 2003. – С.43–48.
7. Говалло В.И. Активность Т-лимфоцитов и их взаимодействие с сывороткой крови женщин при физиологической беременности // Акуш. и гинек. – 1978. – С.8–11.
8. Владимиров Ю.А., Азизова О.Л., Деев Л.И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Биофизика. – М., 1991. – Т.29. – С.180.
9. Прокопенко В.М., Арктюнян А.В., Флорова Е.В. и др. Свободнорадикальное окисление и антиокислительная активность в тканях плаценты при преждевременных родах // Бюл.экспер.биол. и мед. – 1997. – №2. – С.632–634.
10. Henderson L.M., Chappel J.B., Jonts O.T. Superoxide generation is inhibited by phospholipase A2 inhibitors // Biochem. J. – 1989. – V.264. – P.249–255.

Информация об авторах:

Маматиева Марет Алихановна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Российского государственного медицинского университета
Адрес: 113152, Москва, Загородное шоссе, 18а
Городская клиническая больница №55
Телефон: (495) 952-9661

Никулин Борис Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинской генетики Московского государственного медико-стоматологического университета
Адрес: 127475, Москва, ул. Делегатская, 29/1
Телефон: (495) 925-6520

Ходжаева Дарья Алексеевна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Российского государственного медицинского университета
Адрес: 113152, Москва, Загородное шоссе, 18а,
Городская клиническая больница №55
Телефон: (495) 952-9661