

Н.Г. Кошелева, Л.Б. Зубжицкая,
О.Н. Аржанова, О.В. Тышкевич,
Ю.Л. Громыко, Т.Н. Шляхтенко
Т.А. Плужникова,
Е.А. Шаповалова

Научно-исследовательский институт
акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА И ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ НАЛИЧИИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ С УЧЕТОМ ИХ КЛАССА И ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ

■ Проведено комплексное исследование системы гемостаза у 197 женщин с привычным невынашиванием беременности. Из них изучение состояния плаценты иммуноморфологическим методом проведено у 41 женщины и у 52 женщин определено наличие аутоантител к β_2 -ГП-1 в плаценте. Независимо от класса АФА выявлена гиперактивация тромбоцитарного компонента, которая значительно усиливается с началом беременности и прогрессирует с ростом гестации. Установлена достоверная связь между исходом беременности и степенью активности кровяных пластинок. Обнаружено отсутствие влияния аКЛ на плазменно-коагуляционное звено гемостаза. Циркуляция ВА сопровождалась признаками гиперкоагуляции. Во всех исследованных группах установлено угнетение фибринолиза. При иммуноморфологическом исследовании плацент выявлено большее отложение ПИК при ВА и β_2 -ГП-1, связанном с аКЛ.

■ **Ключевые слова:** гемостаз, иммуноморфология, антитела, антифосфолипид, гиперкоагуляция

В последнее время все большее внимание ученых привлекает антифосфолипидный синдром (АФС), который в значительной степени увеличивает как материнскую, так и перинатальную смертность [2–4]. Однако исследованию гемостаза при циркуляции антифосфолипидных антител (АФА) у беременных женщин уделяется недостаточное внимание. Вместе с тем изучение тромбоцитарного звена гемостаза при беременности представляет особый интерес, так как тромбоциты осуществляют регуляцию кровотока в микроциркуляторном русле [1, 5].

Для прогнозирования осложнений беременности и ее возможных исходов должно быть четкое представление о функционировании системы гемостаза при наличии АФА разных классов в сопоставлении с морфологическими изменениями в плаценте.

Целью работы явилось изучение системы гемостаза и иммуноморфологического состояния плаценты при наличии в плазме крови АФА с учетом их класса и исхода беременности.

Материалы и методы исследования: были обследованы 197 женщин с привычным невынашиванием беременности. Иммуноморфологическое исследование биоптатов плаценты проведено у 20 здоровых беременных женщин и у 41 женщины с учетом класса АФА (аКЛ/ВА). У 52 женщин изучалось наличие аутоантител к β_2 -ГП-1. Возраст обследуемых женщин находился в пределах от 20 до 42 лет.

Анализ соматической патологии показал, что у женщин с наличием АФА детские инфекции встречались в 3 раза чаще и в 10 раз чаще наблюдались аллергические реакции по сравнению с женщинами без аутоантител. У женщин с наличием волчаночного антикоагулянта (ВА) в 1,5 раза чаще, чем при антикардиолипиновых антителах (аКЛ) диагностировалась тиреоидная патология, в 3 раза чаще ожирение и ВСД по гипертоническому типу. Варикозная болезнь при циркуляции ВА встречалась в 7 раз чаще по сравнению с аналогичным показателем при аКЛ ($18,5 \pm 7,5$ и $2,4 \pm 2,3\%$ соответственно).

У $2/3$ женщин с АФА выявлена высокая частота хронических воспалительных заболеваний половых органов. При циркуляции ВА они встречались в $74,1 \pm 8,4\%$ случаев, что в 1,3 раза чаще, чем при наличии аКЛ ($59,5 \pm 7,6\%$).

Процент самопроизвольных аборт в анамнезе у женщин с АФА достоверно превышал в 1,6 раза аналогичный показатель у женщин без АФА и составил $23,6 \pm 3,3\%$. При этом частота спонтанных абортов при аКЛ была $28,9 \pm 4,9\%$, при ВА — $18,3 \pm 4,9\%$. Отмечен также значительный процент неразвивающейся беременности, составляющий $40,0 \pm 6,3\%$ при наличии ВА, что в 2 раза чаще по сравнению с аналогичным показателем при аКЛ ($20,5 \pm 4,4\%$).

Выявление аКЛ осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием *Anti-Phospholipid Screen with*

human B2-Glycoprotein I as cofactor (OR GenTec Diagnostica GmbH — Германия).

Биохимическая активность ВА определялась по фосфолипидзависимым тестам коагуляции (АПТВ 1:20 и ПВ 1:500).

Для иммуноморфологического и гистологического исследования последов брали образцы тканей центральной и периферической частей плаценты. Криостатные срезы плаценты обрабатывались специфическими иммунными сыворотками с использованием методов прямой и непрямой иммунофлюоресценции. Параллельно проводили гистологическое исследование плаценты по общепринятой методике.

β_2 -ГП-1 определяли методом флюоресцирующих антител в непрямой модификации с использованием сывороток крови обследуемых женщин, тестированных на наличие антител к кардиолипину на бычьем сердце.

Комплексное изучение свертывающей системы крови включало: исследование сосудисто-тромбоцитарного и плазменно-коагуляционного звена системы гемостаза. Кроме того, исследовалась активность фактора VIII и общая фибринолитическая активность плазмы, а также ингибиторов фибринолиза.

Статистическая обработка данных проводилась по программе Excel 5,0.

Результаты исследования

Для оценки степени риска тромботических осложнений при беременности было проведено комплексное исследование системы гемостаза у небеременных женщин. Выявлено достоверное увеличение в крови числа активных форм тромбоцитов от $16,9 \pm 0,4$ ($p < 0,001$) при аКЛ до $19,6 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$) при ВА. Факт инициации тромбоцитарного звена подтверждался достоверным увеличением числа тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты до $7,9 \pm 0,1$ ($p < 0,01$) при аКЛ и до $8,4 \pm 0,2\%$ ($p < 0,01$) при ВА. Изучение плазменно-коагуляционного звена у этих женщин выявило отсутствие достоверных изменений показателей общих скрининговых тестов при аКЛ. Циркуляция ВА сопровождалась достоверным удлинением времени свертывания крови до $9,6 \pm 0,6$ мин ($p < 0,05$) и индекса АПТВ до $1,05 \pm 0,03\%$ ($p < 0,01$). Одновременно отмечалось и укорочение ПТИ до $91,5 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). При этом концентрация фибриногена в плазме достоверно превышала нормальные показатели в 1,2 раза.

Исследование фибринолитической активности крови выявило достоверное угнетение фибринолиза у всех женщин с АФА.

Изучение сосудисто-тромбоцитарного звена во время гестации обнаружило у всех женщин с АФА и неблагоприятным исходом беременности уже в I триместре значительное повыше-

ние адгезивно-агрегационных свойств тромбоцитов в 2 и более раз при аКЛ и почти в 3 раза при ВА на фоне достоверного снижения их числа в венозной крови (табл. 1, 2).

Исследование индуцированной агрегационной активности кровяных пластинок подтвердило гиперактивацию тромбоцитарного компонента гемостаза у всех женщин с наличием АФА. При этом степень агрегационной активности была максимальной при циркуляции ВА и неразвивающейся беременности. Значимое увеличение ристомин-агрегации еще раз подтверждает наличие выраженных нарушений в микроциркуляторном русле при наличии в кровотоке АФА, с большей степенью нарушений при циркуляции ВА (табл. 2).

Повышение гемостатической активности тромбоцитов приводит к запуску коагуляционного каскада и, как следствие, развитию гиперкоагуляционного синдрома.

Циркуляция аКЛ при неразвивающейся беременности сопровождалась достоверным увеличением — ПТИ и укорочением индекса АПТВ, что свидетельствует о повышении активности прокоагулянтного звена системы гемостаза. О склонности к гиперкоагуляции в этой группе беременных свидетельствовало и достоверное нарастание фибриногена в плазме ($p < 0,05$), которое имело место и при преждевременных родах (табл. 1).

При анализе коагулометрических показателей у беременных с наличием ВА отмечалось достоверное удлинение времени свертывания венозной крови в среднем на 24,0% и индекса АПТВ в среднем на 20% во всех исследуемых группах. Достоверным было увеличение концентрации фибриногена, достигая $4,5 \pm 0,1$ г/л при неразвивающейся беременности.

Исследование общей фибринолитической активности крови установило статистически значимое угнетение фибринолиза во всех исследованных группах. При исходе беременности в срочные роды и наличии АФА независимо от их класса достоверных отличий от здоровых беременных не было.

Сравнительная оценка состояния сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в I и последующих триместрах беременности показала, что выявленные нарушения во всех звеньях системы гемостаза в I триместре беременности прогрессировали с ростом гестации, усиливая тем самым тромботическую тенденцию. При этом более выраженные нарушения были отмечены при циркуляции ВА и исходе беременности в преждевременные роды.

Иммуноморфологическое исследование плаценты показало, что при наличии в плазме крови АФА фиксированные иммунные комплексы, включающие С3-фракцию комплемента, указывающего на патогенность иммунного комплек-

са (ПИК), выявлялись в большом проценте наблюдений как в центральной, так и в периферической областях плаценты, особенно при исходе беременности в преждевременные роды и достигало 100% при самопроизвольном аборте и неразвивающейся беременности (табл. 3).

и IgA при срочных и преждевременных родах существенно не различался.

При циркуляции ВА максимальные цифры IgM в плаценте имели место при преждевременных родах в центральной ее части (80%), а IgA — в периферической части плаценты (40%).

Таблица 1

Показатели гемостаза в I триместре при различных исходах беременности у женщин с аКЛ

Показатели	Здоровые беременные	Неразвивающаяся беременность	Самопроизвольный аборт	Преждевременные роды	Срочные роды
Тг в венозной крови, $10^9/\text{л}$	$244,0 \pm 13,2$	$198,3 \pm 4,5^{**}$	$197,5 \pm 12,6^{**}$	$203,2 \pm 9,1^{**}$	$220,0 \pm 7,1$
Сумма активных форм тромбоцитов, %	$12,8 \pm 0,5$	$28,6 \pm 2,5^{***}$	$27,1 \pm 1,4^{**}$	$23,3 \pm 1,0^{***}$	$17,2 \pm 0,8^{***}$
Число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, %	$6,8 \pm 0,4$	$11,04 \pm 1,1^{**}$	$11,2 \pm 0,5^{***}$	$10,3 \pm 0,1^{***}$	$8,1 \pm 0,4^{**}$
Агрегация тромбоцитов с ристомисином, %	$94,1 \pm 2,6$	$137,3 \pm 5,9^{***}$	$134,7 \pm 1,9^{***}$	$126,4 \pm 6,0^{***}$	$119,5 \pm 1,7$
Время свертывания крови, мин	$7,4 \pm 0,4$	$6,93 \pm 0,07$	$6,97 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,1$
ПТИ, %	$102,5 \pm 1,6$	$106,7 \pm 0,9^*$	$105,3 \pm 0,04$	$104,3 \pm 1,3$	$102,6 \pm 0,6$
АПТВ-индекс, %	$1,0 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,02^*$	$0,93 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,05$
Фибриноген, г/л	$3,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2^*$	$3,6 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2^*$	$3,5 \pm 0,1$
Фибринолитическая активность, %	$7,0 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,5^{**}$	$5,9 \pm 0,1^*$	$5,8 \pm 0,3^*$	$5,9 \pm 0,4$

* — $p < 0,05$,
 ** — $p < 0,01$,
 *** — $p < 0,001$ между контрольной и каждой из сравниваемых групп.

Среди классов иммуноглобулинов при наличии аКЛ и исходе беременности в срочные роды IgM выявлялся в наименьшем числе наблюдений (14,3%) в периферической части плаценты. Частота обнаружения IgM при преждевременных родах составила 37,5% в обеих частях плаценты. Процент обнаружения IgG

IgG при преждевременных родах обнаруживался в большей половине случаев как в центральной, так и в периферической части плаценты (77,8 и 66,7% соответственно). При исходе беременности в срочные роды процент выявления данного компонента иммунного комплекса в обеих частях плаценты составил 60%.

Таблица 2

Показатели системы гемостаза в I триместре различных исходов беременности при наличии ВА

Показатели	Здоровые беременные	Неразвивающаяся беременность	Самопроизвольный аборт	Преждевременные роды	Срочные роды
Тг в венозной крови, $10^9/\text{л}$	$244,0 \pm 13,2$	$186,7 \pm 6,8^{**}$	$185,0 \pm 8,9^{**}$	$181,0 \pm 12,3^{***}$	$193,8 \pm 10,8^{**}$
Сумма активных форм тромбоцитов, %	$12,8 \pm 0,5$	$36,1 \pm 0,2^{***}$	$29,8 \pm 2,5^{***}$	$24,7 \pm 0,5^{***}$	$18,1 \pm 0,5^{**}$
Число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, %	$6,8 \pm 0,4$	$14,7 \pm 0,3^{***}$	$12,1 \pm 0,7^{***}$	$10,8 \pm 0,3^{***}$	$8,7 \pm 0,1^{***}$
Агрегация тромбоцитов с ристомисином, %	$94,1 \pm 2,6$	$155,3 \pm 5,8^{***}$	$143,3 \pm 8,2^{***}$	$121,2 \pm 0,7^{***}$	$125,2 \pm 3,4^{***}$
Время свертывания крови, мин	$7,4 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,3^{**}$	$9,1 \pm 0,6^*$	$8,8 \pm 0,5^*$	$8,9 \pm 0,2^{**}$
ПТИ, %	$102,5 \pm 1,6$	$96,5 \pm 0,6^*$	$98,7 \pm 0,9$	$100,5 \pm 1,3$	$101,8 \pm 0,8$
АПТВ-индекс, %	$1,0 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,07^*$	$1,2 \pm 0,01^{***}$	$1,1 \pm 0,01^{***}$	$1,14 \pm 0,01^*$
Фибриноген, г/л	$3,4 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,3^*$	$3,9 \pm 0,2^*$	$3,8 \pm 0,1^{**}$	$3,6 \pm 0,1$
Фибринолитическая активность, %	$7,0 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,7^{**}$	$4,6 \pm 0,5^{**}$	$5,6 \pm 0,4^*$	$6,2 \pm 0,2$

* — $p < 0,05$,
 ** — $p < 0,01$,
 *** — $p < 0,001$ между контрольной и каждой из сравниваемых групп.

Таблица 3

Состав ПИК при разных классах антифосфолипидных антител с учетом исхода беременности

Класс аутоантител		Содержание ПИК				
		Фибриноген	С3-фракция	IgA	IgM	IgG
норма		6,06±4,15	13,04±7,02	5,0±4,87	15,0±7,98	75,0±9,68
Срочные роды						
АКЛ	Ц	64,3±12,8	57,1±13,2	42,9±13,2	28,6±12,1	35,7±12,8
	П	64,3±12,8	50,0±13,4	35,7±12,8	14,3±9,4	42,9±13,2
ВА	Ц	88,9±10,5	77,8±13,9	22,2±13,9	55,6±16,6	60,0±21,9
	П	88,9±10,5	77,8±13,9	22,2±13,9	33,3±15,7	60,0±21,9
Преждевременные роды						
АКЛ	Ц	87,5±11,7	100	37,5±17,1	37,5±17,1	50,0±17,7
	П	87,5±11,7	87,5±11,7	37,5±17,1	37,5±17,1	37,5±17,1
ВА	Ц	80,0±17,9	80,0±17,9	20,0±17,9	80,0±17,9	77,8±13,9
	П	100	80,0±17,9	40,0±21,9	60,0±21,9	66,7±15,7
Самопроизвольный аборт + неразвивающаяся беременность						
АКЛ	Ц	100	100	80,0±17,9	60,0±21,9	100
	П	100	100	60,0±21,9	80,0±17,9	100

Ц — центральная часть плаценты;

П — периферическая часть плаценты.

При исходе беременности в самопроизвольный аборт и неразвивающуюся беременность процент выявления иммунологических депозитов был максимальным во всех областях плаценты по сравнению со срочными и преждевременными родами.

Процент обнаружения фибриногена в плаценте был наибольшим при самопроизвольном аборте и неразвивающейся беременности и наличии АКЛ (100%), минимальное его количество отмечалось в плацентах женщин с АКЛ и исходом беременности в срочные роды (64,3%).

Кроме того, в последах женщин с АФА при неблагоприятных исходах беременности наблюдалась наибольшая интенсивность специфического свечения в области отложения патогенных ИК, что указывало на большую степень повреждения тканей.

Специальное изучение наличия кофактора β_2 -ГП-1 в плацентах 72 женщин обнаружило его в составе ИК в 78% случаев. Кроме того, выявлена прямая зависимость между интенсивностью специфического свечения АКЛ в плаценте и титром β_2 -ГП-1, связанного с АКЛ (β_2 -ГП-1 с АКЛ) в плазме крови беременных.

Таким образом, проведенное комплексное исследование состояния системы гемостаза у небеременных женщин с наличием АФА позволило установить выраженные изменения в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза, особенно при ВА, характеризующиеся несвоевременной сроку беременности гиперагрегацией

кровяных пластинок, ведущей к блокаде микроциркуляторного русла. С наступлением беременности активность тромбоцитарного компонента гемостаза значительно усиливается, достигая максимальных значений при циркуляции ВА и исходе настоящей беременности в неразвивающуюся. Указанные изменения в тромбоцитарном звене при циркуляции АФА были статистически достоверны и объясняются активирующим действием АФА на кровяные пластинки [1–3]. Приведенные результаты подтверждают прямой проагрегантный эффект АФА. Повышение морфофункциональной активности тромбоцитов с ранних сроков беременности можно рассматривать как маркер возможных осложнений беременности и/или неблагоприятного ее исхода и требует их профилактики до беременности.

Анализ коагулометрических показателей у небеременных женщин обнаружил отсутствие влияния АКЛ на плазменно-коагуляционное звено гемостаза, в то время как циркуляция ВА сопровождалась признаками гиперкоагуляции. В результате полученных данных у небеременных женщин изменение показателей общих скрининговых тестов (ПТИ, индекс-АПТВ) у беременных при АКЛ следует рассматривать как следствие повышения гемостатической активности тромбоцитов. Гиперкоагуляция при ВА обусловлена не только прямым проагрегантным эффектом аутоантител, но и функциональным нарушением эндотелия сосудов.

Высокая частота обнаружения β_2 -ГП-1 с аКЛ на мембранах трофобласта и эндотелия сосудов плаценты у женщин с неблагоприятными исходами беременности в местах локализации иммунных комплексов свидетельствует о роли этого белка в развитии патологических процессов в плацентарной ткани, способствующих развитию плацентарной недостаточности [6–8].

Длительная гиперактивация иммунной системы у женщин с АФА приводит к дисфункции составляющих ее компонентов, образованию ПИК с нарушением их клиренса и активации системы комплемента на ограниченном участке кровяного русла. Кроме того, активные иммунные комплексы способствуют активации тромбоцитарного звена гемостаза и секреции кровяными пластинками мощного вазоконстриктора тромбоксана. Начавшиеся патологические процессы, в свою очередь, потенцируют повреждения сосудистой стенки и снижение ее тромбрезистентности.

Литература

1. Громыко Г.Л. Роль антифосфолипидного синдрома в развитии акушерских осложнений // Журн. акуш. и женских болезней. — 1997. — № 1. — С. 49–54.
2. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Гениевская М.Г., Долгушина Н.В. и др. Антифосфолипидный синдром в акушерской практике. — М., 2000.
3. Макацария А.Д., Мищенко А.Л., Бицадзе В.О., Маров С.В. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови в акушерской практике. — Триада-Х, 2002. — 496 с.
4. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. — М.: Триада-Х, 2000. — 304 с.
5. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз // СПб., 2000. — 227 с.
6. Kaike T., Mastunta E. β_2 -glycoprotein 1 as cofactor and antiphospholipid syndrome // J. Med. Sci. — 1997. — N 33. — P. 225–238.
7. Salafia C.M., Parke A.L. Placental pathology in systemic lupus erythematosus and phospholipid antibody syndrome // Rheum. Dis. Clin. North. Am. — 1997, Feb. — N 21 (1). — P. 85–97.
8. Salafia C.M., Cowchock F.S. Placental pathology and antiphospholipid antibodies a descriptive study // Am. J. Perinatol. — 1997, Sep. — N 14(8). — P. 435–441.

HEMOSTASIS SYSTEM AND IMMUNOMORPHOLOGIC STATE OF PLACENTA UNDER PRESENCE OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN PLASMA WITH CONSIDERATION OF THEIR CLASS AND PREGNANCY OUTCOME

Kosheleva N.G., Zubzhitskaia L.B.,
Arzhanova O. N., Tyshkevich O.V.,
Gromyko Yu. L., Shlyakhtenko T.N.
Pluzhnikova T. A., Shapovalova E.A.

■ **The summary:** The present study was undertaken to investigate hemostasis system of 197 women with recurrent miscarriage: Analysis placentas by immunomorphology are studied of 41 women and of 52 women with autoimmune antibodies to β_2 -glycoprotein-I (β_2 -GPI) in placenta. There was exposed hyperactivation platelets blood of all women with antiphospholipid antibodies irrespective of groups with significantly was increased at the beginning of pregnancy and progressed with growing gestation. As result of investigation it is determined certain connection between outcome of pregnancy and activation degree platelets blood in vasculars. Was found absence influence anticardiolipin antibodies (aCL) on plasmocoagulative link hemostasis. The circulation of lupus anticoagulant (LA) was accompanied indication of hypercoagulation. In all research groups was determined significant oppression of fibrinolysis. Analysis placentas by immunomorphology was determined significantly tissue damages with LA and β_2 -GPI-dependent aCL.

■ **Key words:** hemostasis, immunomorphology, antibodies, antiphospholipid, hypercoagulation