

А. В. Макогон^{1,2}, И. В. Пикалов³, Н. А. Вараксин⁴, И. В. Андрияшина³

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Городская клиническая больница № 1
ул. Залесского, 6, Новосибирск, 630047, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия

⁴ ЗАО «Вектор-Бест»
Кольцово, Новосибирская область, 630559, Россия

E-mail: makogon@ngs.ru

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОСТАЗА У ПЛОДОВ С СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИЕЙ

Изучен коагуляционный статус у плодов с проявлениями системной воспалительной реакции (СВР) и при физиологическом течении внутриутробного периода. Обследовано 21 беременная (8 плодов – с СВР, 13 плодов – группа контроля). Обнаружено, что у плодов с СВР достоверно выше уровень ТАТ ($1,34 \pm 0,1$ против $1,19 \pm 0,12$ мкг/л, $P_U = 0,024$), более длительное АПТВ ($100,45 \pm 5,29$ против $94,55 \pm 5,23$, $P_U = 0,035$) и снижена активность АТ III ($22,60 \pm 1,80$ против $25,51 \pm 2,30$ %, $P_U = 0,05$). Развивающийся системный воспалительный ответ плода в среднем триместре беременности вызывает достоверные изменения гемостазиологического статуса плода, характеризующегося удлинением АПТВ, увеличением содержания комплексов «тромбин – антитромбин III» и снижением активности антитромбина III.

Ключевые слова: гемостаз, воспалительный ответ, плод.

Задержка внутриутробного развития плода (ЗВРП), внутриутробная гибель плода (ВГП), преэклампсия, отслойка плаценты являются одними из основных осложнений, которые обуславливают перинатальную заболеваемость и смертность. Этиология этих состояний остается до конца не изученной, однако все они ассоциированы с аномалиями васкуляризации плаценты и нарушениями гемостаза, которые приводят к неадекватной маточно-плацентарной циркуляции. Васкулопатии, тромбозы, гиперкоагуляция приводят к неадекватной перфузии интравиллезного пространства, ассоциированы с перечисленными осложнениями и обнаруживаются в плаценте родильниц с тромбофилиями. Тромбоэмболические осложнения во многих случаях обусловлены наследственными дефектами системы гемостаза.

Исследования в этой области интенсивно проводятся с 1993 г., когда была открыта резистентность к активированному протеину С. Доказано, что 60–70 % больных с тромбоэмболическими осложнениями имеют наследственную предрасположенность [1].

Тромботические осложнения встречаются и в период внутриутробного развития, хотя их частота невысока. С другой стороны, более половины необъяснимых фетальных потерь связывают с острым нарушением кровообращения в пуповине. Возможность пренатальной диагностики и прогнозирования подобных нарушений очень важна, поскольку до сих пор антенатальная гибель плода является осложнением, которое трудно предотвратить при стандартном наблюдении за беременной, причем половина таких потерь остается необъяснимой. Опи-

саны острые нарушения кровообращения в пуповине, хориальных сосудах, артериях плода [2].

Исследования, выполненные в Лейденском медицинском университете [3], показали, что в случае наследственной тромбофилии развивается не только гиперкоагуляция с соответствующими последствиями, но и нарушаются процессы дифференцировки трофобласта, что ведет к внутриутробной задержке развития плода.

Тромбофилия у беременной связана с такими осложнениями, как венозный тромбоз, эмболизм, преэклампсия, HELLP-синдром, эклампсия, в то время как фетальная тромбофилия связана с задержкой развития плода и антенатальной гибелью плода. Последняя причина может объяснять часть потерь беременностей в сроках более 10 нед. у пациенток, не страдающих врожденными тромбофилиями. Важно помнить, что генетические особенности гемостаза могут быть унаследованы плодом от отца [4]; показана роль полиморфизма фактора V или сочетания гомозиготных аллелей PAI-1 G/G и MTHFR C677T у плода при антенатальной гибели плода.

Исследования состояния гемостаза плода затруднены. Сложность заключается не только в труднодоступности плода, но еще и связанной с этим ограниченностью лекарственной терапии. Так, например, низкомолекулярные гепарины не проникают через плаценту [5].

Одним из серьезных нарушений внутриутробного развития является синдром воспалительного ответа плода (Fetal Inflammatory Response Syndrome, FIRS), который определяется как субклиническое состояние, при котором часто отмечаются преждевременные роды и излитие околоплодных вод. При этом в плазме плода регистрируется увеличение уровня интерлейкина-6 (IL-6) [6]. Такие новорожденные характеризуются высокой заболеваемостью, осложненным течением неонатального периода и рождаются чаще тогда, когда беременная перенесла субклиническую форму инфекции амниотической полости бактериальной этиологии, иммунный конфликт при настоящей беременности и при некоторых других осложнениях. В то же время провоспалительные цитокины стимулируют прокоагулянтную активность и снижают антикоагуляционный потенциал крови [7].

Цель исследования – изучить состояние системы гемостаза у плодов с проявлениями системного воспалительного ответа.

Материал и методы

В исследование включены 21 беременная в возрасте от 18 до 37 лет, которые были разделены на две группы. Первую группу составили 8 повторно беременных пациенток с признаками внутриутробной инфекции. Средний возраст – $30,8 \pm 6,6$ лет, срок беременности на момент кордоцентеза – $25,0 \pm 2,5$ нед. В 6 случаях беременности были прерваны по медицинским показаниям (наркомания – 3 случая, неиммунная водянка плода, гидроцефалия, синдром Арнольда – Киари – по одному случаю). В двух случаях беременность завершилась самопроизвольными срочными родами. У одного плода диагностирована атрезия двенадцатиперстной кишки (порок диагностирован пренатально, кариотип плода нормальный), у второго плода – внутриутробная пневмония. Во всех случаях выполнено пренатальное кариотипирование. Кровь плода для исследования получена посредством кордоцентеза. Прерывание беременности осуществлялось путем индукции выкидыша интраамниальным введением энзапроста. Критерии включения в группу: гистологически доказанный амнионит и / или фунгикулит, уровень IL-6 в крови плода более 11 пг/л на момент исследования, что позволяло диагностировать наличие системного воспалительного ответа у плода [6]. Критерии исключения: аномалии кариотипа, гемолитическая болезнь плода.

Вторую группу (контроль) составили 13 беременных (у 3 женщин беременность первая), которым диагностический кордоцентез выполнен с целью пренатального кариотипирования. Средний возраст – $29,0 \pm 6,9$ лет, срок беременности на момент кордоцентеза – $24,3 \pm 1,9$ нед. Показания к пренатальному кариотипированию определены генетиком: возраст более 35 лет – 2, изменения сывороточных маркеров – 9 случаев. Критерии включения в группу: клинически благополучное течение беременности, срочные роды в катамнезе, физиологическое течение неонатального периода, уровень IL-6 в крови плода менее 11 пг/мл на момент исследования, что позволило исключить наличие системного воспалительного ответа [6; 8].

Критерии исключения: аномалии развития плода, новорожденного, хромосомные аномалии плода, проявления общей воспалительной реакции у беременной (лихорадка более 38,0 °С, лейкоцитоз более $12 \times 10^9/\text{л}$, тахикардия, тахипноэ), гистологически доказанный фуникулит, амнионит, бактериологически доказанная урогенитальная инфекция при беременности.

Образцы крови плодов получали путем кордоцентеза, который выполняли в условиях операционной родильного дома под местной анестезией двуигольным методом (иглы 18G и 22G), «свободной рукой», параплацентарным доступом к вене пуповины на свободном участке. Осложнений после кордоцентеза не установлено.

Проводилась оценка качества полученного образца крови. Контаминация кровью матери и околоплодными водами исключалась применением параплацентарного доступа к свободной петле пуповины, тестом на контаминацию кровью матери, определением группы крови, лейкоцитарной формулы и уровня хорионического гонадотропина у плода.

Концентрации ИЛ-6 в плазме крови плода определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Для гемостазиологических исследований кровь плода смешивалась с раствором цитрата натрия, центрифугировалась, плазма замораживалась и исследовалась в течение 3–5 дней. Изучены следующие параметры. «Клоттинговые» тесты – активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), протромбиновый индекс (ПИ), фибриноген (ФГ) – проводили на автоматическом коагулометре Instrumentations Laboratory-200 (США). Фотометрические тесты – активность антитромбина III (АТ III), протеина С (ПС-ак), плазминогена (ПГ) – осуществляли коммерческими наборами («Instrumentations Laboratory», США; «Stago», Франция). Иммуноферментные тесты – тромбоцитарный фактор 4 (пФ 4), β -тромбоглобулин (β -ТГ), фактор Виллебранда (ФВ), комплекс «тромбин – антитромбин III» (ТАТ), Д-димер (Д-д), концентрация (антиген) протеина С (ПС-аг) – определяли тест-системами («Behring», ФРГ; «Stago», Франция).

Исследования выполнены в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ме-

дицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования», одобрены Комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 25 от 17.06.2010). Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных для научного анализа.

Обработку полученных результатов проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с использованием программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде средних арифметических величин (M), стандартных отклонений (SD). Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U -критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

Результаты исследования и обсуждение

В результате проведенных исследований оказалось, что в группе плодов с признаками системного воспалительного ответа (1-я группа) были достоверно увеличены АПТВ, уровень ТАТ и снижена активность АТ III в отличие от оппозитной 2-й группы (см. таблицу). Эти отличия также иллюстрированы на диаграммах размаха (рис. 1–3). Другие изучаемые параметры гемостазиограммы не имели достоверных отличий в изучаемых группах.

Тромбоэмболические осложнения у новорожденных – явление не частое, наблюдаемое в среднем в 5,1 случаях на 10 000 живорожденных. А. Nagy и соавт. [9] проанализировали 7 случаев таких осложнений. Три из семи тромбозов случились в антенатальном периоде. Причем только один случай связан с инфекционным поражением плода. Во всех наблюдениях диагностированы различные наследственные тромбофилии у новорожденных, которые совпадали с врожденными нарушениями гемостаза у их матерей.

Исследуя критические состояния с проявлениями синдрома системного воспалительного ответа, Т. Iba и соавт. [10] обнаружили, что прогностическим критерием развития и прогрессирования органических дисфункций является активность антитромбина III. Дефицит АТ III ассоциирован

Показатели системы гемостаза у обследованных плодов ($M \pm m$)

Показатель	1-я группа ($n = 8$)	2-я группа ($n = 13$)	P_U
АПТВ, с	$100,45 \pm 5,29$	$94,55 \pm 5,23$	0,035
ПИ, %	$22,47 \pm 1,39$	$22,89 \pm 1,27$	$> 0,05$
ФГ, г/л	$2,89 \pm 0,32$	$2,88 \pm 0,58$	$> 0,05$
пФ 4, Ед/мл	$16,81 \pm 24,49$	$6,71 \pm 0,34$	$> 0,05$
β -ТГ, нг/мл	$32,32 \pm 1,87$	$32,06 \pm 0,84$	$> 0,05$
ФВ-аг, %	$86,18 \pm 2,31$	$88,05 \pm 3,64$	$> 0,05$
ТАТ, мкг/л	$1,34 \pm 0,10$	$1,19 \pm 0,12$	0,024
Д-д, мкг/л	$207,17 \pm 32,03$	$228,91 \pm 50,82$	$> 0,05$
АТ III, %	$22,60 \pm 1,80$	$25,51 \pm 2,30$	0,05
ПС-аг, %	$32,15 \pm 2,20$	$30,86 \pm 2,52$	$> 0,05$
ПС-ак, %	$16,98 \pm 1,24$	$17,34 \pm 1,55$	$> 0,05$
ПГ, %	$26,68 \pm 2,17$	$26,07 \pm 1,34$	$> 0,05$

Примечание: АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время; ПВ – протромбиновое время; ФГ – фибриноген; пФ 4 – тромбоцитарный фактор 4; β -ТГ – β -тромбоглобулин; ФВ-аг – антиген фактора Виллебранда; ТАТ – комплекс «тромбин – антитромбин III»; Д-д – Д-димер; АТ III – антитромбин III; ПС-аг – концентрация (антиген) протейна С; ПС-ак – активность протейна С; ПГ – плазминоген; P_U – достоверность отличий показателей в группах.

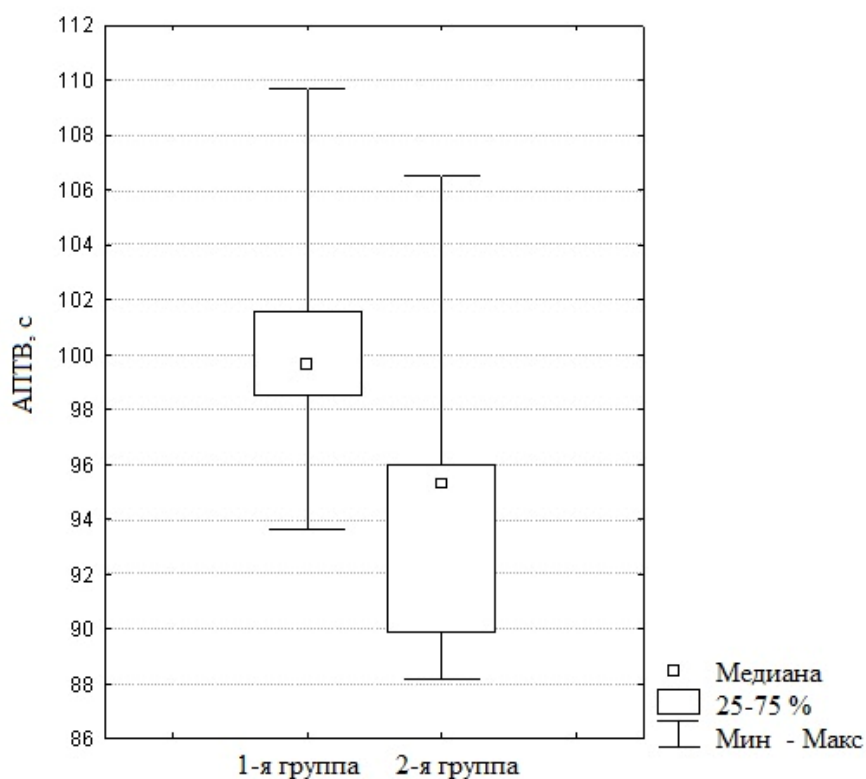


Рис. 1. Активированное парциальное тромбопластиновое время у обследованных плодов

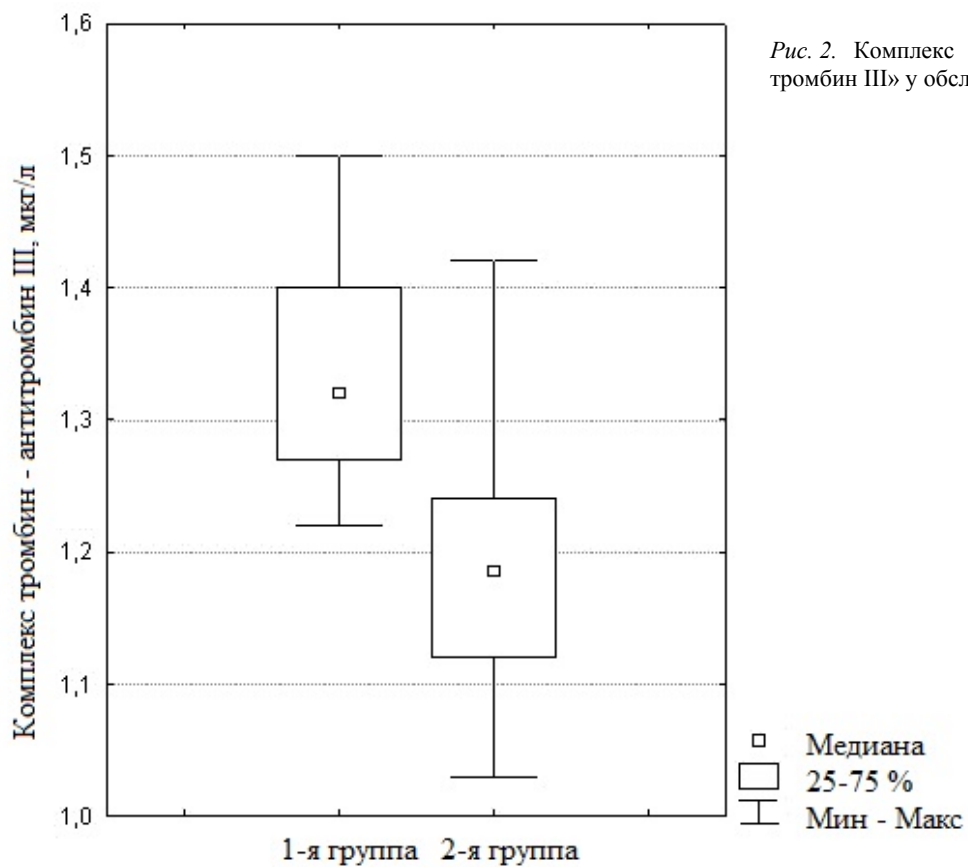


Рис. 2. Комплекс «тромбин – анти- тромбин III» у обследованных плодов

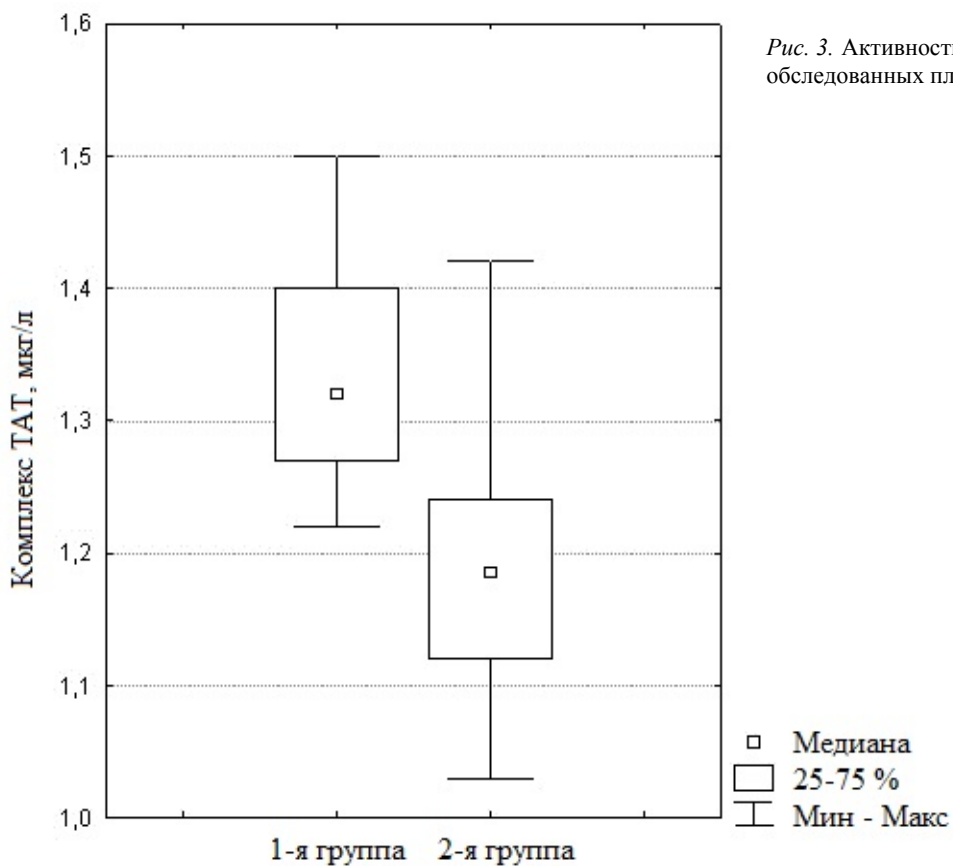


Рис. 3. Активность антитромбина III у обследованных плодов

с фетальными потерями, ЗВРП [11]. По данным настоящего исследования, в группе плодов с признаками системного воспалительного ответа отмечена достоверно более низкая активность АТ III. При этом у всех плодов выявлены морфологические критерии воспалительного ответа.

У пациентов с системной воспалительной реакцией вне зависимости от этиологии (инфекционная или неинфекционная) отмечено значительное увеличение маркеров эндотелиального повреждения (фактор Виллебранда, тромбомодулин, тканевой активатор плазминогена t-PA, активатор ингибитора плазминогена 1-го типа PAI-1), гиперкоагуляции (фрагменты протромбина 1+2, комплекс тромбин-антитромбин), фибринолиза (Д-димер, активность PAI) [12]. Часть этих результатов, полученных при исследовании взрослых, согласуется с данными, полученными в нашем исследовании. Так, у плодов 1-й группы, имеющих документированный воспалительный ответ, отмечено более высокое содержание комплексов «тромбин – антитромбин III».

Плацентарный барьер делает в значительной степени независимым существование плода и вынашивающей его матери. Так, исследования гемостаза у родильниц с преэклампсией и без нее, родивших доношенных детей, показали, что в случае преэклампсии установлена гиперкоагуляция. В то же время гемостазиограммы новорожденных не имели достоверных отличий [13].

В исследовании [14], основанном на анализе 750 случаев антенатальной гибели плодов, показано, что частота встречаемости врожденных тромбофилий в семьях с фетальными потерями не превышала популяционную. Не удалось установить связи между наследственными и приобретенными тромбофилиями и внутриутробной гибелью плодов за исключением высокого содержания фактора Виллебранда у беременной и снижения протеина С у супруга. Преждевременная отслойка плаценты и инфаркты плаценты были ассоциированы с наследственной тромбофилией у беременной [14]. С другой стороны, у плодов, рожденных пациентками, беременность которых осложнилась преэклампсией, внутриутробной задержкой развития плода, отслойкой плаценты, выявлены достоверно более частые мутации фактора V Лейдена и протомбина.

Сделан вывод, что эти особенности развития плода могут способствовать наступлению таких осложнений [15]. Все это свидетельствует о значимости коагуляционного статуса плода в физиологии и патологии пренатального периода.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в пренатальной диагностике. Однако проблема антенатальной гибели плода остается чрезвычайно актуальной и в значительной степени нерешенной [2]. Более того, патологическое течение неонатального периода зачастую является неожиданным как для врачей, так и для родителей. Дело в том, что многие патологические процессы у плода протекают субклинически и могут не отражаться на самочувствии беременной и данных лабораторных методов исследования [2; 6]. В настоящее время нет реальных возможностей влиять на коагуляционный статус плода, изменения которого документированы в настоящем исследовании уже во втором триместре беременности. Контроль системы гемостаза плода при выполнении инвазивной диагностики различной пренатальной патологии может оказаться полезным для оценки прогноза развития плода и планировании постнатального обследования и лечения.

Выводы

1. Развивающийся системный воспалительный ответ плода в среднем триместре беременности вызывает изменения гемостазиологического статуса.
2. Изменения гемостазиологического состояния плода характеризуются удлинением АПТВ, увеличением содержания комплексов тромбин-антитромбин III и снижением активности антитромбина III.

Список литературы

1. *Many A., Kupferminc M. J.* Thrombophilia and Adverse Pregnancy Outcome // *Haematologica*. 2003. Vol. 88. P. 729–731.
2. *Parast M. M., Crum C. P., Boyd T. K.* Placental Histologic Criteria for Umbilical Blood Flow Restriction in Unexplained Stillbirth // *Hum. Pathol.* 2008. Vol. 39. P. 948–953.
3. *Middeldorp S.* Pregnancy Failure and Heritable Thrombophilia // *Semin. Hematol.* 2007. Vol. 44. P. 93–97.

4. *Tranquilli A. L., Emanuelli M.* The Thrombophilic Fetus // *Med. Hypotheses*. 2006. Vol. 67. P. 1226–1229.
5. *Bates S. M., Greer I. A., Pabinger I., Sofaer S., Hirsh J.* Venous Thromboembolism, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines (8th ed.) // *Chest*. 2008. Vol. 133. P. 844–886.
6. *Romero R., Espinoza J., Goncalves L. F., Kusanovic J. P., Friel L., Hassan S.* The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth // *Semin. Reprod. Med.* 2007. Vol. 25. P. 21–39.
7. *Levi M., Poll T. van der.* Inflammation and Coagulation // *Crit. Care Med.* 2010. Vol. 38. P. 26–34.
8. *Gomez R., Romero R., Ghezzi F., Yoon B. H., Mazor M., Berry S. M.* The Fetal Inflammatory Response Syndrome // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998. Vol. 17. P. 194–202.
9. *Nagy A., Mogyorosy G., Kiss C., Pataki I., Houshang A. S., Olah E.* In Utero Thrombosis of Neonates: Inherited Thrombophilia? // *Orv. Hetil.* 2009. Vol. 150. P. 743–746.
10. *Iba T., Gando S., Murata A., Kushimoto S., Saitoh D., Eguchi Y., Ohtomo Y., Okamoto K., Koseki K., Mayumi T., Ikeda T., Ishhikura H., Ueyama M., Ogura Y., Endo S., Shimazaki S.* Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation Study Group. Predicting the Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-associated Coagulopathy with Hemostatic Molecular Markers and Vascular Endothelial Injury Markers // *J. Trauma*. 2007. Vol. 63. P. 1093–1098.
11. *Kobayashi T.* Antithrombin Abnormalities and Perinatal Management // *Curr. Drug Targets*. 2005. Vol. 6. P. 559–566.
12. *Garcia-Fernandez N., Montes R., Purroy A., Rocha E.* Hemostatic Disturbances in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and Associated Acute Renal Failure (ARF) // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 100. P. 19–25.
13. *Tanjung M. T., Siddik H. D., Hari-man H., Koh S. C.* Coagulation and Fibrinolysis in Preeclampsia and Neonates // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2005. Vol. 11. P. 467–473.
14. *Korteweg F. J., Erwich J. J., Folkeringa N., Timmer A., Veeger N. J., Ravise J. M., Holm J. P., Meer J. van der.* Prevalence of Parental Thrombophilic Defects after Fetal Death and Relation to Cause // *Obstet. Gynecol.* 2010. Vol. 116. P. 355–364.
15. *Anteby E. Y., Musalam B., Milwidsky A., Blumenfeld A., Gilis S., Valsky D., Hamani Y.* Fetal Inherited Thrombophilias Influence the Severity of Preeclampsia, IUGR and Placental Abruptio // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004. Vol. 113. P. 31–35.

Материал поступил в редколлегию 25.06.2011

A. V. Makogon, I. V. Pikalov, N. A. Varaksin, I. V. Andryushina

FETAL HEMOSTASIS AND FETAL INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME

Fetal hemostasis was examined in fetus with inflammatory response syndrome (FIRS). There were 21 pregnant women (first group includes 8 women with FIRS and the control group includes 13 women with normal pregnancy). We found that fetuses with FIRS had significantly higher levels of TAT ($1,34 \pm 0,1$ vs $0,12 \pm 1,19$ mcg/l, $P_U = 0,024$), lengthening APTT ($100,45 \pm 5,29$ vs $94,55 \pm 5,23$ s, $P_U = 0,035$) and reduced activity of ATIII ($22,60 \pm 1,8$ vs $25,51 \pm 2,3$ %, $P_U = 0,05$). In conclusion, the developing fetal systemic inflammatory response in the middle trimester of pregnancy caused significant changes in the fetal hemostasis. These changes were characterized by lengthening APTT, increasing concentrations of thrombin-antithrombin III complexes and decreased activity of antithrombin III.

Keywords: hemostasis, fetal inflammatory response syndrome.