

УДК 616.13/.14-005.6+618.3/.5+616.155.294-008.6]-074

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА У ЖЕНЩИН С ОТЯГОЩЕННЫМ АКУШЕРСКИМ АНАМНЕЗОМ

© Ф.Т. Халимова, А.В. Гулин, Е.В. Малышева, А.А. Назирова

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром; титра антител к отрицательно заряженным фосфолипидам (кардиолипину, фосфотидилсерину, фосфотидилинозитолу, фосфотидиловой кислоте); β -2-гликопротеин-I, аннексин-V и протромбин.

Полноценная диагностика антифосфолипидного синдрома должна базироваться на иммунологическом определении титра антител к отрицательно заряженным фосфолипидам (кардиолипину, фосфотидилсерину, фосфотидилинозитолу, фосфотидиловой кислоте). Одновременно должно определяться в плазме крови исследование антител к некоторым гликопротеинам, фиксированным на фосфолипидных мембранах. Важнейшими из них являются β -2-гликопротеин-I, аннексин-V и протромбин.

ВВЕДЕНИЕ

Невынашивание беременности до настоящего времени остается актуальной проблемой. Частота этого осложнения варьирует от 10 до 25 %. Этиология невынашивания беременности разнообразна и зависит от многочисленных факторов, действующих одновременно или последовательно [1–3]. Одной из причин репродуктивных потерь являются нарушения иммунных механизмов, обеспечивающих нормальное оплодотворение яйцеклетки, имплантацию и плацентацию, инвазию трофобласта и дальнейшее прогрессирование беременности. Примером аутоиммунных нарушений в генезе невынашивания беременности является АФС. Последний занимает лидирующее положение в проблеме невынашивания и по значимости и по частоте встречаемости (27–42 %). Согласно данным литературы [4–6], гибель эмбриона/плода без лечения у женщин с АФС составляет 80–95 %. АФС, сочетаясь с другими нарушениями, осложняет их течение и может стать ведущим фактором, определяющим исход беременности [7–9].

Полноценная диагностика АФС базируется на комплексном исследовании аутоиммунных нарушений, характеризующихся наличием в крови в высоком титре антител к содержащимся в плазме отрицательно заряженным мембранным фосфолипидам – кардиолипину, фосфатилсерину и другим, а также к связанным с этими фосфолипидами гликопротеинам (β -ГП-I, аннексин-V или протромбину).

Целью настоящего исследования было изучение клинико-лабораторных характеристик антифосфолипидного синдрома в акушерской и гинекологической практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования была отобрана группа из 396 женщин, имевших в анамнезе привычное невынашивание

беременности, у которых после проведения гинекологического, гормонального, бактериологического и генетического исследований причина нарушений в репродуктивной системе оставалась неясной.

Средний возраст обследованных составил $28,14 \pm 0,71$ лет (от 20 до 43 лет). 261 (66 %) из них имела в анамнезе повторные регрессирующие беременности и самопроизвольные выкидыши и в I и во II триместрах беременности, 75 (19 %) – замершую беременность, 24 (6 %) – внематочную беременность, у 36 (9 %) женщин отмечалось бесплодие. В качестве контрольной группы были обследованы 40 фертильных женщин.

Методом иммуноферментного анализа на диагностических тест-системах фирмы «Orgentec» определяли суммарную концентрацию антител к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу и фосфатидиловой кислоте класса IgG, суммарную концентрацию антител к связанным с этими фосфолипидами гликопротеинам (β -гликопротеину-I, аннексину-V, протромбину). Использовали диагностическое лабораторное оборудование для иммунного анализа Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция – США: «BIO-RAD LABORATORIEES, INC». Уровни титров АФА выражали в международных единицах согласно инструкции фирмы-производителя [6].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistika, включая методы параметрического и непараметрического анализа (t – критерий Стьюдента, коэффициент корреляции по Пирсону, при $p = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Между группой наблюдения, включающей женщин, имеющих отягощенный акушерский анамнез, и контрольной группой (здоровые фертильные женщины) был проведен сравнительный статистический анализ, который показал, что вышеперечисленные показатели маркеров АФС претерпевали статистически дос-

товерные изменения. Как видно из рис. 1, маркеры АФС зарегистрированы у 135 женщин (34 %). При этом исследуемые маркеры одновременно определены у 69 (17,4 %) женщин с отягощенным акушерским анамнезом.

Данное исследование позволило дать оценку роли маркеров антифосфолипидного синдрома у женщин с отягощенным акушерским анамнезом в диагностике антифосфолипидного синдрома. Данные о частоте выявления маркеров АФС представлены на рис. 2.

Антифосфолипидные антитела, к которым относят т. н. антикардиолипиновые антитела (АКА) и волчаночный антикоагулянт (ВА), представляют собой семейство гетерогенных ауто- и аллоиммунных иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, связывающих фосфолипид-протеиновые комплексы [4–5].

Антикардиолипиновые антитела – это антитела к фосфолипидам (кардиолипину – дифосфатидилглицеролу) клеточных мембран, ведущий показатель наличия антифосфолипидного синдрома у больных. Определенный уровень аутоантител к кардиолипину присутствует в крови и здоровых людей, но при повышении этого уровня возникает качественно новое состояние в системе гемостаза. Эти антитела взаимодействуют с фосфолипидами мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток сосудов, вызывая их разрушение и способствуя возникновению тромбозов и тромбозмболий [1–2].

Нарастание уровня антител является чувствительным и специфическим лабораторным тестом, характеризующим риск возникновения тромботических осложнений. Больные, у которых обнаружен повышенный уровень антител к кардиолипину, относятся к группе риска по возникновению тромбозов при различных заболеваниях. При беременности из-за тромбозмоблических повреждений трофобласта и плаценты возможны гибель плода, выкидыш, отслойка плаценты, гипотрофия и гипоксия плода. В США частота выявления аутоантител к фосфолипидам у населения составляет 5 %. Если его обнаруживают в крови у беременных, то без лечения у 95 % наблюдается выкидыш и/или гибель плода. У нас в стране частота обнаружения антикардиолипиновых антител у пациенток с привычным невынашиванием составляет 27,5–31 % [6].

Было обследовано 396 женщин с отягощенным акушерским анамнезом. Выявлено 135 женщин г. Липецка (34 %) с диагностически значимым уровнем суммарных АФА (рис. 3).

Средний уровень IgG в контрольной группе к суммарным антителам [КЛ+ФС+ФИ+ФК] составил $2,9 \pm 0,17$ Ед/мл. Уровень IgG – АФА в сыворотке крови женщин с отягощенным акушерским анамнезом г. Липецка был достоверно ($p < 0,001$) выше на 92,2 % по сравнению с контрольной группой и составил $37,6 \pm 0,5$ Ед/мл.

В последние годы принято считать, что термин «антифосфолипидные антитела» неправилен, поскольку эти антитела распознают не фосфолипиды, а скорее специфические белки плазмы, или т. н. кофакторы, которые связаны с активированными мембранами клеток (например, тромбоцитов, моноцитов, опухолевых клеток) или фосфолипидными микрочастицами, циркулирующими в плазме. К этим белкам относят β -2-гликопротеин-I, протромбин, аннексин-V, протеин С, протеин S, а также высоко- и низкомолекулярные ки-

ниногены. Специфические подгруппы антител к β -2-гликопротеину-I и протромбину ответственны за активность волчаночного антикоагулянта в фосфолипид-зависимых коагуляционных реакциях. В связи с этим определение антител к кофакторам более предпочтительно, нежели определение антител непосредственно к АФА [2].

После открытия роли кофакторов в развитии АФС основное внимание исследователей приковано к изучению белков-кофакторов и механизмов их взаимодействия с АФА и фосфолипидами.

Наиболее изученным кофактором является β -2-гликопротеин-I. Известно, что β -2-гликопротеин-I является белком с молекулярной массой 50 кД и в норме представлен в плазме в концентрации примерно 200 мг/мл. Часть β -2-гликопротеина-I может циркулировать в плазме в связанном состоянии с липопротеинами, и поэтому этот протеин также называют аполипопротеином. β -2-гликопротеин-I связывает анионные фосфолипиды и может подавлять фосфолипидзависимые коагуляционные реакции. Это его свойство позволяет считать, что β -2-гликопротеин-I является физиологи-

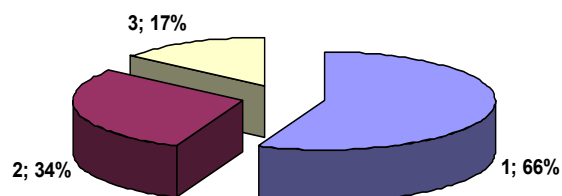


Рис. 1. Распределение маркеров АФС в группе наблюдения: 1 – нормальные показатели; 2 – положительные показатели; 3 – одновременно выявленные показатели

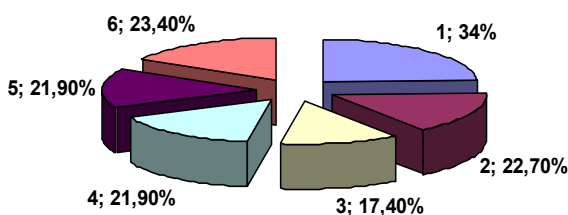


Рис. 2. Частота выявления маркеров АФС в группе наблюдения: 1 – АФА (IgG) [КЛ+ФС+ФИ+ФК]; 2 – АФА (IgG) (β -2-гликопротеин-I); 3 – АФА (IgG) (аннексин-V); 4 – АФА (IgG) (протромбин); 5 – АПТВ Люпус-тест; 6 – время свертывания (ЛЕТ) Лебетокс-тест

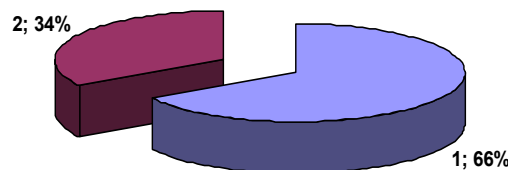


Рис. 3. Выявление АФА [КЛ+ФС+ФИ+ФК] в группе наблюдения: 1 – нормальные показатели; 2 – положительные показатели

ческим антикоагулянтом. Кроме того, β -2-гликопротеин-I подавляет протромбиназную активность и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. β -2-гликопротеин-I взаимодействует с различными типами клеток. АФА связываются с эндотелиальными клетками и тромбоцитами только в присутствии β -2-гликопротеина-I и приводят к внутриклеточной активации [3, 6].

Исследование антител к β -2-гликопротеину-I имеет одинаковую с антикардиолипиновыми антителами чувствительность в отношении диагностики АФС (57 %), но более высокую специфичность (82 и 43 % соответственно). Положительная предсказательная ценность этого теста (т. е. вероятность того, что у больного с повышенным уровнем антител к β -2-гликопротеину-I в сыворотке крови могут возникнуть тромботические осложнения) составляет 29 %, а чувствительность (т. е. вероятность того, что у больного с тромбозами будут обнаружены антитела к β -2-гликопротеину-I) – 24 % [3].

В ходе исследования было выявлено 90 (22,7 %) пациенток, у которых уровень АФА (β -гликопротеин-I) превышал нормальные значения. Данные исследования представлены на рис. 4.

Содержание антител к β -гликопротеину-I в исследуемой группе женщин г. Липецка достоверно ($p < 0,001$) превышало на 92,4 % соответствующий показатель в контрольной группе ($3,4 \pm 0,2$ Ед/мл) и составило $44,9 \pm 0,1$ Ед/мл. Обнаружена достоверная прямая корреляция между уровнями IgG – АФА [КЛ+ФС+ФИ+ФК] и IgG- β -ГП-I ($r = 0,62$; $p < 0,01$).

Иммунодиагностика АФС, согласно современным рекомендациям, должна включать в себя, помимо определения титра антифосфолипидных антител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов, исследование антител к некоторым гликопротеинам, фиксированным на фосфолипидных мембранах. Важнейшими из них является аннексин-V [1–2].

Семейство белков аннексинов было открыто в 1990 г. и сразу стало объектом интенсивного научного изучения и клинических исследований.

Аннексин-V – кальций-зависимый протеин, который представлен во многих тканях, а главным образом, на эндотелиальных клетках и плаценте. Он обладает выраженными антикоагулянтными свойствами *in vitro*. Это свойство аннексина-V обусловлено его высоким сродством к анионным фосфолипидам и способностью препятствовать активированным факторам свертывания крови связываться с фосфолипидами клеточных мембран по кальций-зависимому механизму. Антитела к аннексину-V были описаны как высокоспецифичный фактор риска в отношении смерти морфологически нормального плода начиная с 10-й недели нормальной беременности. Установлена строгая корреляция между наличием антител к аннексину-V и неудачами оплодотворения *in vitro*. Была показана важная роль этих антител в развитии тромбозов [1–2, 5].

У 69 (17,4 %) женщин г. Липецка выявлен позитивный уровень АФА (аннексин-V). Данные исследования представлены на рис. 5.

Исследования показали достоверное увеличение ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой концентрации антител к аннексину-V на 78,7 %. Средний уровень антител к аннексину-V в опытной группе составил $13,2 \pm 0,59$ Ед/мл по сравнению с контрольной

группой ($2,8 \pm 0,2$ Ед/мл). Отмечена достоверная прямая корреляция между уровнями IgG – АФА [КЛ+ФС+ФИ+ФК] и содержанием в сыворотке антител к аннексину-V ($r = 0,64$; $p < 0,01$).

Антитела к протромбину являются патогенными и напрямую ингибируют факторы коагуляции, что приводит к удлинению времени фосфолипидзависимых коагуляционных тестов.

Протромбин (фактор II) – витамин К-зависимый гликопротеин с мол. м. 72 кД, синтезируемый в печени и участвующий в свертывании крови. Протромбин обеспечивает создание на мембране поврежденных клеток комплекса факторов Va, Ха, и фосфолипидов. В результате чего в присутствии ионов Ca^{2+} образуется протромбиназный комплекс, который осуществляет расщепление протромбина до тромбина, что в дальнейшем приводит к превращению фибриногена в фибрин.

Совсем недавно были проведены исследования, которые показали, что антитела, являющиеся причиной возникновения эффекта волчаночного антикоагулянта (удлинение времени фосфолипидзависимых коагуляционных тестов), требуют присутствия плазменных протеинов, подобных β -2-гликопротеину-I, или протромбина. Протромбин был идентифицирован как первый кофактор действия антител, обеспечивающих эффект ВА [2, 6–7].

Предполагают, что связывание протромбина с фосфолипидами клеточных мембран увеличивается в присутствии антител к протромбину, в результате чего другие факторы коагуляции не могут связаться с фосфолипидами; возможно, этим и объясняется удлинение времени фосфолипидзависимых коагуляционных тестов. Имеется и другая точка зрения, согласно которой протромбин при наличии антител перекрестно реагирует с плазминогеном, вследствие чего фибриноген не может быть расщеплен в фибрин. В связи с этим можно полагать, что существуют два различных вида антител к протромбину, которые могут усиливать или ингибировать свертывание крови [1, 5].

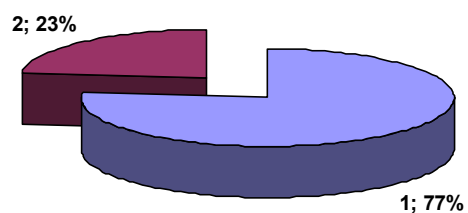


Рис. 4. Выявление АФА (β -гликопротеин-I) в группе наблюдения: 1 – нормальные показатели; 2 – позитивные показатели

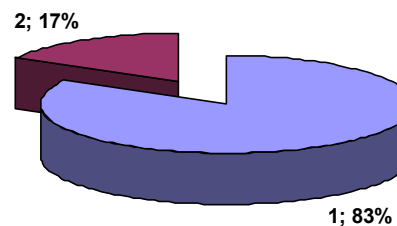


Рис. 5. Выявление АФА (аннексин-V) в группе наблюдения: 1 – нормальные показатели; 2 – позитивные показатели

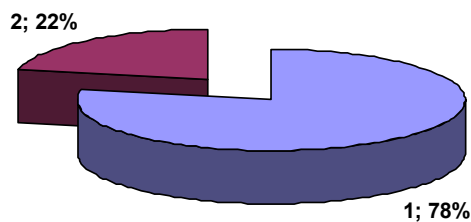


Рис. 6. Выявление АФА (протромбин) в группе наблюдения: 1 – нормальные показатели; 2 – положительные показатели

Специфичность определения антител класса IgG – 95 %. Антитела класса IgG обнаруживают у 14,6 % больных СКВ. У пациентов с первичным АФС повышенный уровень антител класса IgG к протромбину выявляют в 18,2 % случаев заболевания [7].

Повышенный уровень антител к протромбину особенно у пациентов с СКВ и АФС увеличивает риск развития тромбоза глубоких вен. Кроме того, наличие антител к протромбину ассоциируется с тромбозом легочной артерии и преждевременным прерыванием беременности. Они также предсказывают высокий риск развития инфаркта миокарда у пациентов с ИБС [1, 5]. Чувствительность определения антител IgG к протромбину для диагностики первичного АФС при преждевременном прерывании беременности составляет 74–80 %, а при вторичном АФС – 80–84 % [5].

Диагностически значимые уровни АФА (протромбин) были определены у 87 (21,9 %) женщин анализируемой группы г. Липецка (рис. 6).

Концентрация антител к протромбину была существенно более высокой на 89,1 % при $p < 0,001$ в группе исследуемых ($29,6 \pm 1,0$ Ед/мл) по сравнению с контрольной группой ($3,2 \pm 0,2$ Ед/мл). Прямая корреляция между IgG – АФА [КЛ+ФС+ФИ+ФК] и антителами к протромбину составила $r = 0,61$ при $p < 0,01$.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полноценная диагностика АФС должна базироваться на комплексном исследовании системы гемостаза с определением всех возможных эффектов АВТ и на иммунологическом определении титра антител к отрицательно заряженным фосфолипидам (кардиолипину, фосфотидилсерину) и связанным с фосфолипидными мембранами гликопротеинам.

Данное исследование показало, что у женщин детородного возраста, находящихся под наблюдением акушеров по поводу рецидивирующих спонтанных аборт, последние могут быть проявлением первичного АФС. Поэтому такие пациентки нуждаются в тщательном клинико-лабораторном обследовании для выявления всего спектра изменений, обусловленных АФС. Это важно для решения вопроса о возможности вынашивания беременности, а при положительном решении – для разработки тактики ведения больной акушером.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П., Цыпкина Л.П. Принципы лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома // Кл. лаб. диагн. 2000. № 3. С. 47-51.
2. Генцеевская М.Г., Макацария А.Д. Антитела к фосфолипидам и невынашивание // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. 2000. № 1. С. 44-46.
3. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Генцеевская М.Г., Долгушина Н.В., Мищенко А.Л. Антифосфолипидный синдром в акушерской практике / под ред. А.Д. Макацария. М., 2001. 304 с.
4. Баркаган З.С., Цыпкина Л.П., Цейхман И.Я. Способ диагностики антифосфолипидного синдрома: патент на изобретение № 2104550 от 10/2 1988. РФ.
5. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза. М., 1999. 320 с.
6. Кулаков В.И., Сидельникова В.М. К вопросу о патогенезе привычного выкидыша // Акушерство и гинекология. 1996. № 4. С. 49-54.
7. Макацария А.Д. Антифосфолипидный синдром, генетические тромбофилии в патогенезе основных форм акушерской патологии // Русский медицинский журнал. 2006. Спец. выпуск. С. 2-10.
8. Степанова Р.Н. Беременность и аутоиммунные нарушения // Акушерство и гинекология. 1996. № 1. С. 6-8.
9. Hughes G.R.V. The anticardiolipin syndrome – ten years on // Lancet. 1993. V. 342. P. 341-344.

Поступила в редакцию 16 августа 2012 г.

Khalimova F.T., Gulina A.V., Malysheva E.V., Nazirova A.A.
CLINICAL-LABORATORY CHARACTERISTICS OF ANTI-
PHOSPHOLIPID SYNDROME OF WOMEN WITH COMPLICATED
OBSTETRIC HISTORY

The complete diagnosis of antiphospholipid syndrome should be based on immunological detection of antibody titer to the negatively charged phospholipids (cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid). At the same time the study of antibodies to some glycoproteins, fixed on phospholipid membranes, in the blood plasma must be determined. The most important of these are the β -2-glycoprotein-I, annexin-V and prothrombin.

Key words: antiphospholipid syndrome; titers of antibodies to negatively charged phospholipids (cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid); β -2-glycoprotein-I, annexin-V and prothrombin.