

ЧЕПАНОВ

Сергей Владимирович

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОГО
ЭФФЕКТА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО
ВВЕДЕНИЯ ПРИ АКУШЕРСКОЙ ПАТОЛОГИИ**

14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Сельков Сергей Алексеевич

Официальные оппоненты:

Папаян Людмила Петровна

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», руководитель лаборатории свертывания крови

Гайковая Лариса Борисовна

доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биологической и общей химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, г. Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте www.nrserm.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников М.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Повреждение эндотелия является основой целого ряда аутоиммунных патологий, некоторые из которых имеют большое значение в развитии осложнений беременности. Среди аутоиммунных нарушений, приводящих к прерыванию беременности, ведущее место занимает антифосфолипидный синдром (АФС) [Макацария А.Д., 2012; Сидельникова В.М., 2013]. В патогенезе антифосфолипидного синдрома большое значение придаётся развитию эндотелиальной дисфункции [Riboldi P., 2003]. Эндотелий является источником целого ряда медиаторов, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, свертывания крови, миграции лейкоцитов [Каде А.Х., 2011]. Занимая уникальное положение на границе между циркулирующей кровью и тканями, эндотелий находится под постоянным воздействием агрессивных факторов системного кровотока (антифосфолипидные антитела, свободные радикалы, продукты активации комплемента и др.), что может приводить к нарушению его функции [Yau J.W., 2015]. Именно на поверхности эндотелия развиваются наиболее драматические события, приводящие к активации коагуляционного каскада, нарушению микроциркуляции, итогом которых являются патологические процессы, вызывающие органические нарушения, а в случае беременности способствующие её прерыванию. Проявлениями дисфункции эндотелия является дисбаланс между различными эндотелиальными медиаторами (вазодилататоры - вазоконстрикторы, анти- и прокоагулянты). Сопровождается это гиперэкспрессией клеточных молекул адгезии ICAM [Rand J.H., 2002], увеличенным выбросом вазоконстрикторных субстанций, таких как эндотелин-1, тромбоксан, повышающих сосудистый тонус, агрегацию тромбоцитов и свертывание крови [Meroni P.L., 2004]. В итоге это приводит к усиленной адгезии и агрегации тромбоцитов, внутрисосудистому тромбозу в маточно-плацентарном комплексе и развитию клинических проявлений антифосфолипидного синдрома [Vlachoyiannopoulos P.G., 2010].

Оптимальным для профилактики повторных потерь плода, а также венозных и артериальных тромбозов считается сочетанное применение низких доз ацетилсалициловой кислоты и низкомолекулярных гепаринов [Bertsias G., 2008]. Но, даже при проведении такой терапии, неблагоприятные исходы беременности у женщин с АФС до сих пор варьируют в пределах 20-30% случаев [Danza A., Ruiz-Irastorza G., 2012]. Наиболее перспективным методом терапии антифосфолипидного синдрома при беременности является использование иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) [Ensom M.H., 2011; Stephenson M.D., 2010]. В то же время АФС на сегодняшний день не включен в список показаний к применению иммуноглобулинов для внутривенного введения, так как имеющиеся данные пока еще не дают однозначного ответа на вопрос об использовании их при этой патологии [Ушкалова Е.А.,

Шифман Е.М., 2011]. Использование ВВИГ при АФС на сегодняшний день носит рекомендательный характер [Сидельникова В.М., 2013]. Тем не менее, иммуноглобулины для внутривенного введения используются в лечении АФС с 1989 года [Warner R.J., 1989], но данные об их эффективности до сих пор носят противоречивый характер. Так в работах [Ensom M.H., Stephenson M.D., 2011; Tenti S., 2016] продемонстрирован благоприятный эффект от терапии ВВИГ, другими же авторами [Christiansen O.B., 2015; Hutton B., 2007] не показано существенных преимуществ этого вида терапии.

Учитывая разноречивые данные об эффективности ВВИГ при терапии АФС весьма актуальным является создание лабораторной модели, позволяющей прогнозировать эффективность действия препарата, для принятия решения о целесообразности его использования у конкретного пациента, как при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и диагностированным антифосфолипидным синдромом, так и при терапии других заболеваний, связанных с повреждением эндотелия и формированием эндотелиальной дисфункции.

Степень разработанности темы

К настоящему времени хорошо изучены проявления антифосфолипидного синдрома при беременности. [Макацария А.Д., 2012; Сидельникова В.М., 2013]. Развитию и коррекции тромбофилических состояний, связанных с активацией тромбоцитарного звена гемостаза при АФС посвящено много работ, а развитию эндотелиальной дисфункции, играющей важную роль в патогенезе антифосфолипидного синдрома, уделяется недостаточное внимание. При использовании стандартных методов терапии АФС наблюдается высокий процент неблагоприятных исходов беременности [Danza A., Ruiz-Irastorza G., 2012]. Одним из эффективных и наиболее обсуждаемых методов терапии АФС является использование иммуноглобулинов для внутривенного введения [Ушкалова Е.А., Шифман Е.М., 2011].

Целью работы явилась оценка лабораторных критериев эндотелиальной дисфункции и разработка метода прогнозирования эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.

Задачи исследования

1. Определить спектр антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.
2. Оценить содержание маркеров эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови женщин с физиологически протекающей беременностью и женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.

3. Охарактеризовать цитопатическое действие сывороток крови женщин с физиологически протекающей беременностью и женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС на эндотелиальные клетки линии EA.Hy926.
4. Оценить влияние ВВИГ на изменение чувствительности эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 к цитопатическому эффекту сывороток крови женщин с физиологически протекающей беременностью и женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.
5. Разработать метод лабораторной оценки дисфункции эндотелия для определения показаний к использованию ВВИГ. Оценить клиническую эффективность данного метода у женщин с привычным невынашиванием беременности для профилактики преждевременного прерывания беременности.

Научная новизна исследования

Впервые получены данные о защитном влиянии иммуноглобулинов для внутривенного введения при воздействии на эндотелиальные клетки сывороток крови беременных женщин с привычным невынашиванием, в том числе с повышенным титром антифосфолипидных антител.

Разработан метод прогнозирования эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС (патент на изобретение №2548754 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации от 24 марта 2015 г.)

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенных исследований показано прямое цитопатическое действие сывороток крови женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС в отношении эндотелиальных клеток.

Разработанный лабораторный метод позволяет индивидуально подойти к принятию решения о целесообразности использования препарата ВВИГ при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС. Разработанные критерии прогнозирования цитопротективного эффекта ВВИГ могут быть использованы и при терапии других заболеваний, связанных с повреждением эндотелия и формированием эндотелиальной дисфункции.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа основана на обследовании 561 женщины репродуктивного возраста. Для реализации цели исследования были использованы культуральный, иммуноферментный метод и метод проточной цитофлюорометрии, проведен статистический анализ результатов исследования.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Привычное невынашивание беременности, ассоциированное с АФС, характеризуется увеличением частоты аутоантител к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, β 2-гликопротеину-I, аннексину 5, протромбину. С высокой частотой у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС выявляются маркеры дисфункции эндотелия: тромбомодулин, sICAM-I, аннексин 5, фактор Виллебранда.
2. Сыворотки периферической крови женщин с привычным невынашиванием беременности оказывают цитопатическое влияние на клетки эндотелия, что может приводить к его повреждению и формированию прокоагулянтной активности, повышению риска развития тромбообразования и в итоге – к прерыванию беременности.
3. Иммуноглобулины для внутривенного введения защищают эндотелиальные клетки от цитопатического действия сывороток крови женщин с привычным невынашиванием беременности, в том числе на фоне АФС.
4. Разработанный метод оценки эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при воздействии сывороток крови женщин с привычным невынашиванием беременности позволяет прогнозировать клиническую эффективность ВВИГ при лечении заболеваний, связанных с эндотелиальной дисфункцией.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала, использованием современных методов исследования и оборудования.

Материалы диссертационной работы представлены на III ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2012» (Санкт-Петербург 2012 год), XIII-ом Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва 2012 год), Всероссийской научной конференции «Лабораторная диагностика в фундаментальной и клинической медицине», посвященная 175-летию со дня рождения А.Я. Данилевского (Санкт-Петербург 2013 год), IV-ой ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2013» (Санкт-Петербург 2013 год), II-ом национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург 2013 год), на IV-ом национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург 2015 год).

Работа поддержана грантом правительства Санкт-Петербурга для молодых ученых, молодых кандидатов наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга - 2015 год.

Разработанный метод «Оценка протективного эффекта иммуноглобулинов для

внутривенного введения» внедрен в практику работы отдела клинической иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О.Отта», Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения Родильный дом №16 и СПб ГБУЗ Родильного дома № 6 им. проф. Снегирева.

По теме диссертационной работы опубликовано 16 научных работ, 9 из которых в изданиях, определенных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертации.

Личный вклад автора в исследование

Автором самостоятельно выполнены все экспериментальные исследования, проведен анализ полученных результатов. В ходе выполнения работы проведен обзор современной отечественной и зарубежной литературы, выполнена статистическая обработка и анализ полученных данных, сформулированы выводы.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации включают введение, обзор литературы, описание материалов и методов, полученные результаты, обсуждение, общее заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Текст диссертации изложен на 100 страницах, содержит 10 таблиц и 6 рисунков. Список литературы состоит из 159 работ. Работа выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведено клинико-лабораторное обследование 561 женщины репродуктивного возраста, наблюдавшихся в ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». План научно-диссертационного исследования был одобрен Этическим Комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Получено информированное согласие пациенток на обследование.

Обследованные женщины были распределены на следующие группы:

1. Женщины с физиологически протекающей беременностью (n=76).
2. Беременные женщины с привычным невынашиванием беременности без повышенного уровня антифосфолипидных антител (n=331).
3. Беременные женщины с привычным невынашиванием беременности и АФС (n=154). АФС диагностировали в соответствии с Международными лабораторными критериями (Сидней, 2006 г).

Возраст женщин находился в интервале от 25 до 47 лет и в среднем составил $32 \pm 5,5$ года. Критериями включения в I группу являлись: I триместр беременности, отсутствие осложнений беременности. Критериями включения во II группу явились: I триместр беременности, угроза прерывания беременности, невынашивание беременности в анамнезе.

Критерии включения в III группу - I триместр беременности, угроза прерывания беременности, невынашивание беременности в анамнезе, АФС. Всем женщинам было проведено общее клинико-лабораторное обследование, включающее общий анализ крови, мочи, биохимические, коагулологические и бактериологические исследования. Критериями исключения во всех группах были сахарный диабет, наличие доказанных эндокринных, генетических факторов невынашивания беременности, пороки развития матки.

Лабораторное исследование проводили в два этапа. На первом этапе у женщин в периферической крови определяли содержание аутоантител и маркеров эндотелиальной дисфункции. На втором этапе оценивали цитопатическое влияние сывороток периферической крови пациенток в отношении эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 и влияние иммуноглобулинов для внутривенного введения на изменение чувствительности эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 к цитопатическому эффекту сыворотки крови.

Объектом исследования явилась периферическая кровь. У пациенток забирали кровь из локтевой вены. Кровь центрифугировали, сыворотки отбирали в стерильных условиях и замораживали при температуре -20°C . Срок хранения сыворотки составлял не более 1 года.

В сыворотках периферической крови определяли содержание антител (IgG/IgM) к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, β -гликопротеину-I, аннексину 5, протромбину методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). Содержание маркеров эндотелиальной дисфункции: sICAM-I, эндотелина-1, тромбомодулина и фактора Виллебранда определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем «sICAM-I» фирмы BD (США), «ENDOTELIN (1-21)» фирмы Biomedika (Австрия), «Thrombomodulin» фирмы USCN Life Science (США) и «TECHNOZYM® vWF:Ag ELISA» фирмы Technoclone GmbH (Австрия) соответственно. При постановке исследований использовали стандартные образцы для построения калибровочной кривой и контрольные образцы. Учет результатов анализа проводили инструментально путем измерения оптической плотности на микропланшетном фотометре ELx808 производства BioTek Instruments Inc. (США) при длине волны 450 нм. Результаты исследования оценивали в соответствии с рекомендациями производителя. «Волчаночный антикоагулянт» определяли на коагулометре ACL-200 (Instrumentation Laboratory, Испания) с использованием реактивов фирмы Siemens (Германия). Агрегационную активность тромбоцитов определяли на анализаторе агрегации тромбоцитов «Solar AP 2110».

Для обеспечения внутреннего контроля качества лабораторных исследований использовали лабораторные контрольные образцы, входящие в состав тест-систем. Для

обеспечения внешнего контроля качества использовались контрольные образцы, предоставляемые Федеральной службой внешней оценки качества.

В работе использовали эндотелиальные клетки линии EA.Hy926, полученные путем гибридизации первичной человеческой эндотелиальной линии HUVEC с клетками карциномы легкого A-549 [Edgell, McDonald, Graham, 1983]. Клетки линии EA.Hy926 воспроизводят все основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелию.

Клетки культивировали в полной среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Sigma, США), 10 мг/мл стрептомицина (Sigma, США), 1×10^5 ЕД/мл пенициллина (Sigma, США), 2 мМ/л-глутамина (Sigma, США) и раствора гипоксантина–аминоптерин–тимидина (HAT) (Sigma, США), при 37°C с 5% содержанием CO₂.

В исследовании использовали препарат иммуноглобулинов для внутривенного введения «Интрафект» (Biotest, Германия). Для оценки токсичности ВВИГ, клетки линии EA.Hy926 культивировали в лунках 96-луночного плоскодонного планшета в концентрации 35000 клеток на лунку с ВВИГ в разведениях от 1:1 до 1:65536 при 37°C с 5% содержанием CO₂ и влажностью 100% в течение 24 часов. Затем лунки отмывали раствором Хенкса с последующей окраской 0,2% кристаллическим фиолетовым (Sigma, США), содержащим 5% метанола. После окраски лунки четырежды отмывали дистиллированной водой, высушивали. Затем проводили экстракцию красителя 10% раствором уксусной кислоты. Учет оптической плотности проводили на микропланшетном фотометре (Biotek, США) при длине волны 540 нм. Минимальной токсической дозой ВВИГ явилась 6,250 мг/мл, в связи с чем дальнейшие эксперименты проводили, используя препарат ВВИГ в концентрации 3,125 мг/мл.

Для оценки влияния ВВИГ на цитопатический эффект сыворотки крови беременных женщин в отношении эндотелиальных клеток, клетки линии EA.hy926 культивировали в лунках 24-луночного плоскодонного планшета в концентрации 180000 клеток на лунку в 1 мл полной среды с добавлением ВВИГ. Клетки культивировали при 37°C с 5% содержанием CO₂ в течение 6 часов. Затем клетки отмывали 1 мл питательной среды DMEM/F12 и на них наслаивали сыворотки крови. Для оценки влияния системы комплемента на цитопатический эффект, использовали инактивированные при 56°C в течение 40 минут сыворотки крови. Затем клетки инкубировали 22 часа при 37°C с 5% содержанием CO₂, снимали раствором версена и окрашивали Propidium iodide в концентрации 3,6 нг/мл. В качестве контроля использовали клетки линии EA.Hy926, обработанные только сыворотками крови тех же пациенток, а также интактные клетки линии EA.Hy926. Оценку жизнеспособности эндотелиальных клеток проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы STATISTICA Windows 7.0., используя методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (критерий Манна-Уитни) статистики. Полученные данные указаны в виде медианы {верхний квартиль; нижний квартиль}. Статистически значимыми признавали различия при $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$. Анализ зависимости и силу связи между признаками оценивали по величине непараметрического коэффициента корреляции Спирмена: более 0,7 – сильная, от 0,3 до 0,7 умеренная, менее 0,3 – слабая.

Результаты исследования

Содержание аутоантител к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, β 2-гликопротеину-I, аннексину 5, протромбину в сыворотке периферической крови женщин с физиологически протекающей беременностью и женщин с привычным невынашиванием беременности.

Для диагностики возможного АФС у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ), определяли содержание аутоантител к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, β 2-гликопротеину-I, аннексину 5, протромбину в сыворотках периферической крови. Результаты исследования показали, что АФС диагностировался у женщин с привычным невынашиванием беременности ($n=485$) в 31,7% случаев. У женщин с физиологически протекающей беременностью ($n=76$) аутоантитела в диагностических титрах выявлены не были. Среди выявленных аутоантител у женщин в группе с АФС ($n=154$) антитела к кардиолипину обнаружены в 14,3% случаев, антитела к фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу и фосфатидиловой кислоте выявлялись в 7,1% случаев, антитела к β 2-гликопротеину-I - в 37,1% случаев, антитела к аннексину 5 - в 29,9% случаев, антитела к протромбину - в 2,6% случаев, «волчаночный антикоагулянт» определялся в 42,8% случаях.

Таким образом, отсутствие аутоантител у женщин с физиологическим течением беременности и выявление высокого уровня и широкого спектра аутоантител у женщин с привычным невынашиванием, показывает очевидное их участие в развитии патологии, приводящей к потере беременности.

Оценка показателей тромбоцитарного гемостаза

При АФС одной из главных причин тромбоза является агрегация тромбоцитов, которая происходит в результате связывания антифосфолипидных антител с мембранной поверхностью активированных тромбоцитов [Шитикова А.С., 2004]. Для оценки развития тромбофилических состояний были оценены параметры тромбоцитарного гемостаза. Было установлено, что у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС показатели степени и скорости агрегации тромбоцитов выше, чем у женщин с привычным невынашиванием без АФС и

женщин с физиологически протекающей беременностью (таблица 1). Это доказывает тот факт, что при АФС происходит индукция тромбогенеза, нарушение микроциркуляции в области фетоплацентарного комплекса и в итоге может привести к потере беременности.

Таблица 1. Показатели тромбоцитарного гемостаза у обследуемых женщин.

Показатель	Женщины с физиологически протекающей беременностью (n=24)	Женщины с привычным невынашиванием без АФС (n=31)	Женщины с привычным невынашиванием с АФС (n=34)
Степень агрегации тромбоцитов, %	62,3 ±5,2	68,4±14,4	76,7±12,3*
Скорость агрегации тромбоцитов, %/мин	63,2±4,9	68,9±12,8	75,2±13,8*

Достоверность различий: * - $p < 0,05$ по сравнению с группами женщин с ПНБ без АФС и женщин с физиологически протекающей беременностью

Содержание маркеров эндотелиальной дисфункции sICAM-1, эндотелина-1, тромбомодулина, аннексина 5 и фактора Виллебранда в сыворотке периферической крови женщин с физиологически протекающей беременностью и женщин с привычным невынашиванием беременности

При оценке эндотелиальной дисфункции установлено, что уровень тромбомодулина и фактора Виллебранда в периферической крови у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) были выше, чем у женщин с физиологически протекающей беременностью. При анализе данных полученных у женщин в группе с ПНБ оказалось, что уровень указанных маркеров выше у женщин с АФС, в отличие от женщин с ПНБ без АФС (рисунок 1). Установлена также прямая корреляционная зависимость по Спирмену между антителами к $\beta 2$ -гликопротеину-1 и тромбомодулином ($r = 0,47$, $p < 0,05$), которая, однако, имела невысокий уровень.

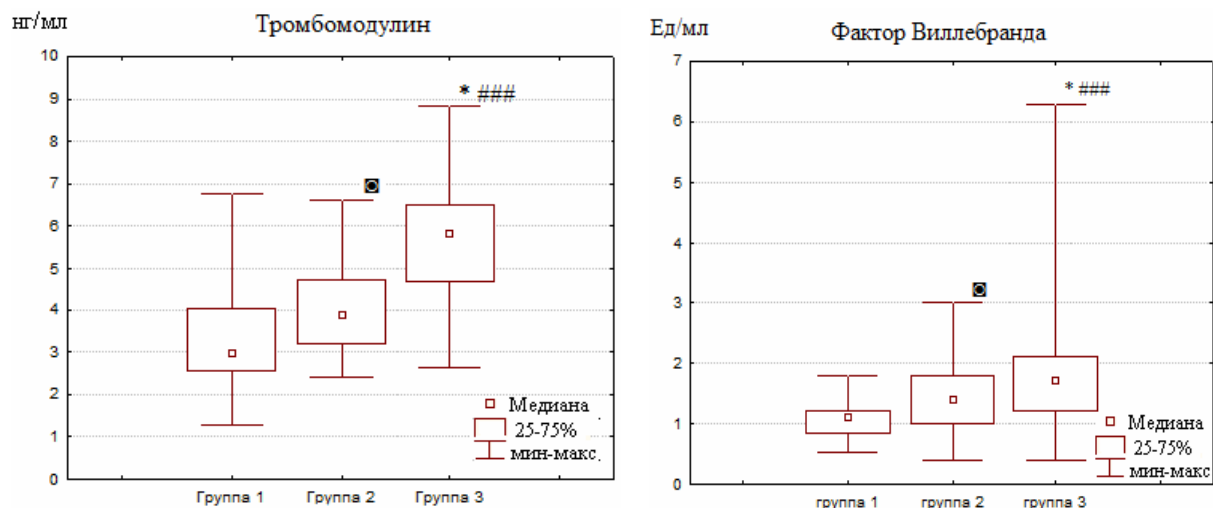


Рисунок 1. Содержание тромбомодулина и фактора Виллебранда в периферической крови. Группа 1 – женщины с физиологически протекающей беременностью; группа 2 - женщины с ПНБ без АФС; группа 3 - женщины с ПНБ и АФС. Достоверность различий: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой 2. ■ - $p < 0,05$ по сравнению с группой 1, ### - $p < 0,001$ по сравнению с группой 1.

Уровень растворимой формы молекулы межклеточной адгезии (sICAM-I) и свороточного аннексина 5 в периферической крови у женщин с привычным невынашиванием беременности был выше, чем у женщин с физиологически протекающей беременностью. Достоверных различий по содержанию в сыворотке sICAM-I и аннексина 5 у женщин в группах с привычным невынашиванием беременности без АФС и женщин с привычным невынашиванием беременности с АФС выявлено не было (рисунок 2). При исследовании уровня эндотелина-1 в сыворотке периферической крови была выявлена тенденция, характеризовавшаяся повышением уровня эндотелина-1 у женщин с привычным невынашиванием беременности по сравнению с уровнем эндотелина-1 в сыворотке крови женщин с физиологически протекающей беременностью, которая, однако, носила недостоверный характер.

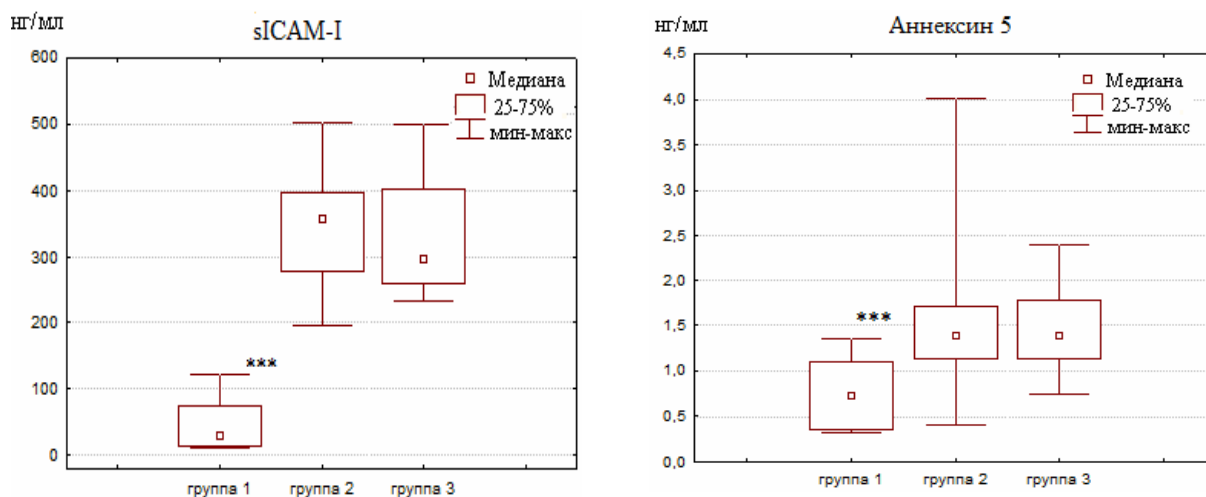


Рисунок 2. Содержание sICAM-I и сывороточного аннексина 5 в периферической крови. Группа 1 – женщины с физиологически протекающей беременностью; группа 2 - женщины с привычным невынашиванием беременности; группа 3 - женщины с привычным невынашиванием беременности и АФС. Достоверность различий: *** - $p < 0,001$ – по сравнению с группами 2 и 3.

Таким образом показано, что концентрация маркеров повреждения эндотелия, таких как тромбомодулин, sICAM-I, сывороточный аннексин 5, фактор Виллебранда повышается в периферической крови у женщин с ПНБ, что косвенно говорит о развитии дисфункции эндотелиальных клеток, повышении их прокоагулянтной активности и, следовательно, повышении риска тромбообразования у этой категории пациенток. Вместе с тем, отсутствие выраженных отличий в уровнях содержания этих косвенных маркеров требуют более достоверных способов оценки эндотелиальной дисфункции, позволяющей объективно охарактеризовать степень повреждения эндотелия.

Оценка цитопатического эффекта сыворотки периферической крови женщин в отношении эндотелиальных клеток линии EA.Hy926

Определение маркеров, циркулирующих в периферической крови при повреждении эндотелиальных клеток, явилось предпосылкой для оценки дисфункции эндотелия прямым способом. С этой целью мы провели исследование цитопатического влияния сывороток периферической крови в отношении эндотелиальных клеток на модельной линии EA.Hy926.

Гибель эндотелиальных клеток после обработки их сыворотками периферической крови женщин с физиологически протекающей беременностью составляла 13,5% {3,9;22,6}, женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС - 40,2% {34,5;52,3}, с привычным невынашиванием беременности с АФС - 54,2% {44,5;66,3}.

В результате проведенных исследований установлено, что цитопатический эффект сывороток крови наиболее выражен у женщин с АФС по сравнению с цитопатическим эффектом сывороток крови женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС ($p < 0,001$) и женщин с физиологически протекающей беременностью ($p < 0,001$) (рисунок 3).

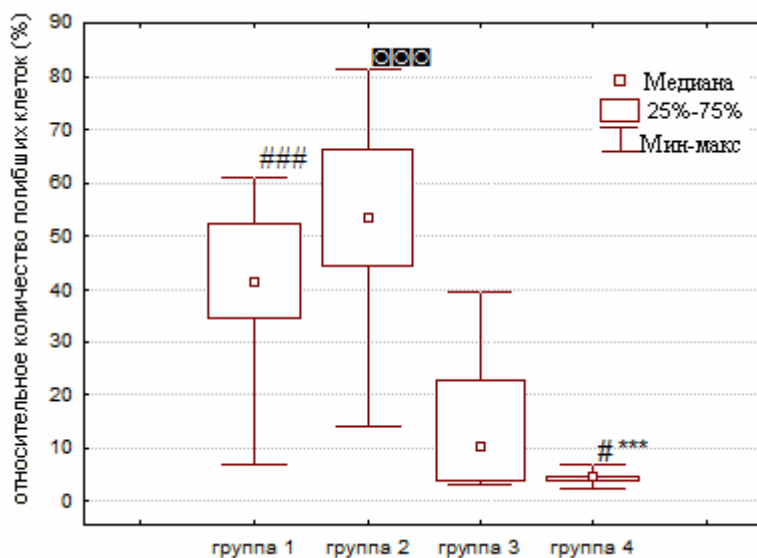


Рисунок 3. Цитопатический эффект сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток линии EA.Hy926. Клетки линии EA.Hy926, инкубированные в присутствии сывороток периферической крови женщин: группа 1 - с ПНБ без АФС; группа 2 с - ПНБ и АФС; группа 3 - с физиологически протекающей беременностью; группа 4 – интактные клетки линии EA.Hy926. Достоверность различий: # - $p < 0,05$ по сравнению с группой 3; *** - $p < 0,001$ по сравнению с группами 1 и 2; ### - $p < 0,001$ по сравнению с группами 2,3 и 4; ■■■ - $p < 0,001$ по сравнению с группой 1,3 и 4.

С целью оценки влияния аутоантител в различных концентрациях на степень эндотелиопатического действия нами было проанализировано цитопатическое влияние сывороток периферической крови женщин с АФС в зависимости от уровня выявленных аутоантител. Достоверных различий нам выявить не удалось, но прослеживалась тенденция, характеризовавшаяся увеличением цитопатического эффекта сывороток при нарастании в них титра антител. Корреляционной зависимости между уровнем антител и степенью цитопатического влияния сывороток в отношении клеток эндотелия также выявлено не было.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что сыворотки крови женщин с привычным невынашиванием беременности оказывают прямое цитопатическое влияние на эндотелиальные клетки. Более выражен цитопатический эффект у пациенток с АФС.

Цитопатический эффект инактивированной сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток линии EA.Hy926

Для оценки вклада системы комплемента в повреждение эндотелия и развитие эндотелиальной дисфункции нами было проведено исследование эндотелиопатического влияния инактивированных при 56°C в течение 40 минут сывороток крови.

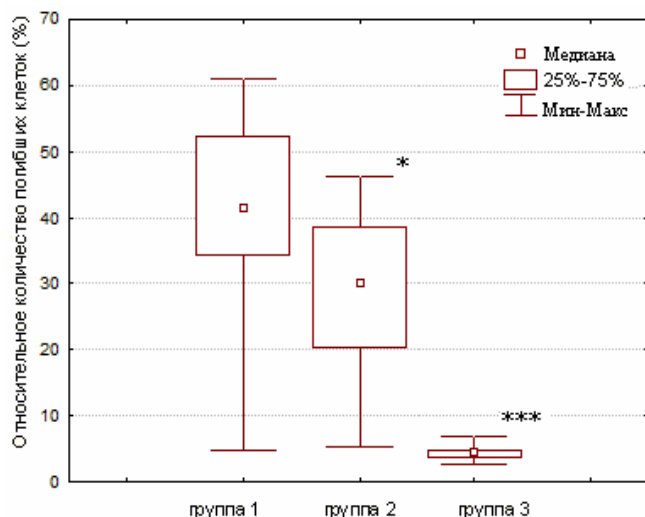
Установлено, что гибель эндотелиальных клеток после обработки их инактивированными сыворотками периферической крови женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС составляла 29,9% {20,4;38,7}; гибель эндотелиальных клеток после обработки их сыворотками крови тех же женщин с неинактивированным комплементом составляла 40,2% {34,5;52,3}, $p < 0,05$ (рисунок 4А). После обработки эндотелиальных клеток инактивированными сыворотками периферической крови женщин с ПНБ и АФС гибель клеток составляла 22,5% {12,5;39,6}; в то время как гибель эндотелиальных клеток после обработки их нативными сыворотками крови тех же женщин составляла 54,2% {44,5;66,3}, $p < 0,05$ (рисунок 4Б). После обработки эндотелиальных клеток инактивированными сыворотками периферической крови женщин с физиологически протекающей беременностью гибель клеток составляла 6,9% {3,4;18,4}; в то время как гибель эндотелиальных клеток после обработки их нативными сыворотками крови тех же женщин составляла 10,4% {3,5;29,6} достоверных различий в данной группе выявлено не было.

Анализ цитопатического влияния инактивированных сывороток периферической крови в зависимости от уровня антифосфолипидных антител, выявленных в данных сыворотках, в отношении эндотелиальных клеток достоверных различий не показал.

Таким образом, инактивированные сыворотки периферической крови, как у женщин с АФС, так и у женщин без АФС оказывают меньший цитопатический эффект в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с сыворотками периферической крови тех же женщин с неинактивированным комплементом.

Эти данные могут свидетельствовать об участии системы комплемента в повреждении эндотелия и развитии эндотелиальной дисфункции, что является патогенетическим звеном в формировании тромбогенного эффекта при антифосфолипидном синдроме и согласуется с литературными данными [Бицадзе В.О., 2014; Meroni P.L., 2011; Романов А.О., 1996]

А)



Б)

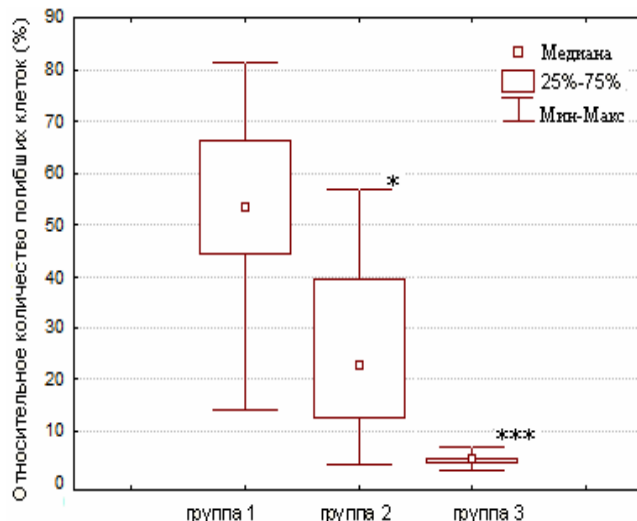


Рисунок 4. Цитопатический эффект инактивированной сыворотки периферической крови женщин с привычным невынашиванием: А) без АФС Б) с АФС в отношении эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 по сравнению с неинактивированной сывороткой. Группа 1 - клетки линии EA.Hy926, инкубированные в присутствии неинактивированной сыворотки периферической крови; группа 2 - клетки линии EA.Hy926, инкубированные в присутствии тех же сывороток, но с инактивированным комплементом; группа 3 – интактные клетки линии EA.Hy926. Достоверность различий: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой 1; *** - $p < 0,001$ по сравнению с группами 1 и 2.

Разработка метода лабораторной оценки эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения

Одной из задач исследования явилась разработка лабораторных подходов к оценке эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения с целью прогнозирования их эффективности при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и диагностированным АФС.

Для решения поставленной задачи использовалась экспериментальная модель, где часть культуры эндотелиальных клеток предварительно обрабатывали иммуноглобулином для внутривенного введения, а часть оставляли не обработанной, затем клетки культивировали с сывороткой крови женщин и определяли методом проточной цитометрии процент нежизнеспособных эндотелиальных клеток, обработанных ВВИГ и не обработанных ВВИГ. В результате анализировалась способность ВВИГ оказывать защитный эффект в отношении эндотелиальных клеток от эндотелиотоксических факторов, находящихся в сыворотке крови пациентки. В ходе экспериментов установлено, что ВВИГ обладают эндотелиопротективным

эффектом. Отмечено снижение цитопатического влияния сывороток крови на эндотелиальные клетки после их обработки ВВИГ в отличие от эндотелиальных клеток, необработанных ВВИГ (рисунок 6).

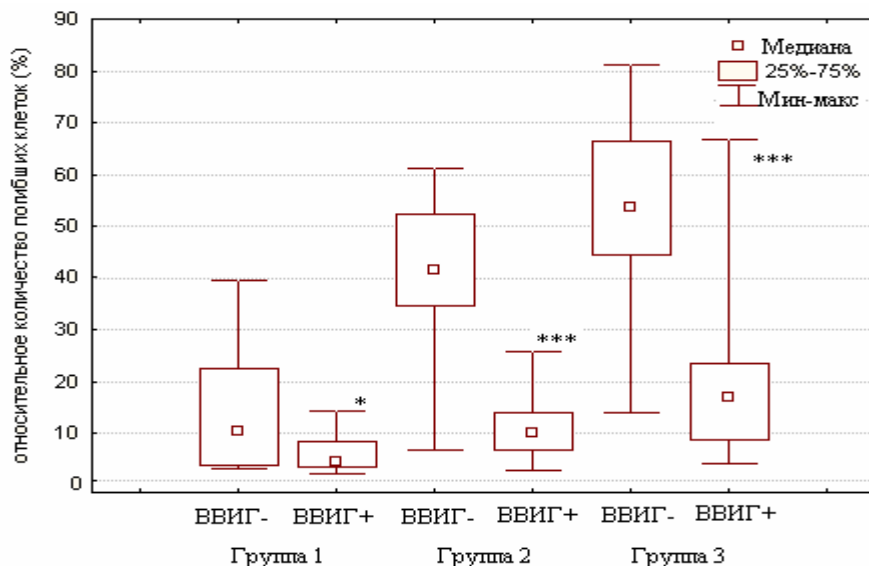


Рисунок 6. Влияние ВВИГ на изменение чувствительности эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 к цитопатическому эффекту сыворотки крови. Клетки линии EA.Hy926, инкубированные в присутствии сывороток периферической крови женщин: группа 1 - с физиологически протекающей беременностью; группа 2 - с диагнозом привычное невынашивание беременности без АФС; группа 3 - с диагнозом привычное невынашивание беременности с АФС. Достоверность различий: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой 1 (ВВИГ-); *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой 2 (ВВИГ-) и группой 3 (ВВИГ-)

При анализе данных, полученных в контрольной группе женщин с физиологически протекающей беременностью, у всех пациенток ($n=31$) наблюдали снижение цитопатического эффекта сыворотки периферической крови после обработки клеток ВВИГ до 4,4% {3,5;8,4} по сравнению с цитопатическим эффектом сывороток периферической крови в отношении эндотелиальных клеток, не обработанных ВВИГ, составлявшим 13,5% {3,9;22,6}, ($p < 0,05$).

С целью формализации полученных данных мы рассчитывали цитопротективный коэффициент (ЦК), который показывает, насколько снизилась цитотоксичность сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток после их обработки ВВИГ по сравнению с интактными клетками. Цитопротективный коэффициент рассчитывается по формуле: $ЦК(\%) = 100 - 100X / X_1$, где

X – относительное количество (%) нежизнеспособных эндотелиальных клеток,

обработанных иммуноглобулином, после культивирования с сывороткой периферической крови; X1 - относительное количество (%) нежизнеспособных эндотелиальных клеток, не обработанных иммуноглобулином после культивирования с сывороткой периферической крови.

Медиана для цитопротективного коэффициента в группе женщин с физиологически протекающей беременностью составила 65,7% {55,0;82,9}. Граница референтного показателя цитопротективного коэффициента составила 55%. Следовательно, если цитопротективный коэффициент составлял более 55%, то он оценивался как положительный – иммуноглобулины для внутривенного введения способны оказать защитное действие в отношении клеток эндотелия от цитопатических факторов, содержащихся в сыворотке крови. Если цитопротективный коэффициент был менее 55%, то ВВИГ в меньшей степени оказывают защитное действие в отношении клеток эндотелия.

При оценке данных, полученных в группе женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС установлено, что у всех пациенток (n=42) цитопатический эффект сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток, не обработанных препаратом, составлял 40,2% {34,5;52,3} и снижался после обработки клеток препаратом ВВИГ до 10,1% {6,7;14,1}, $p < 0,001$. При этом в среднем цитопротективный коэффициент составлял 71,5% {57,4;84,2}.

При анализе данных, полученных в группе женщин с АФС (n=36) было показано, что цитопатический эффект сыворотки периферической крови в отношении эндотелиальных клеток, необработанных препаратом ВВИГ составлял 54,2% {44,5;66,3} и снижался после обработки клеток препаратом ВВИГ до 16,7% {8,8;23,6}, $p < 0,001$. При этом в среднем цитопротективный коэффициент составлял 70,1% {50,0;82,4}. Следует отметить, что у 10 пациенток данной группы цитопротективный коэффициент был менее 55%. Отмечено также, что содержание аутоантител у данной группы в 80% случаев находилось в среднем и высоком титре.

Для оценки клинической эффективности применения ВВИГ при привычном невынашивании беременности и АФС были проанализированы исходы беременности женщин, получавших ВВИГ совместно с традиционной терапией и женщин, получавших только традиционную терапию, заключающуюся в применении антиагрегантов и антикоагулянтов. Было установлено, что у женщин с привычным невынашиванием и АФС, получавших ВВИГ, (n=17) беременность заканчивалась срочными родами в 53% случаях, в 47% случаях беременность заканчивалась преждевременным родоразрешением. У женщин с привычным невынашиванием и АФС, не получавших ВВИГ (n=16) беременность

заканчивалась срочными родами в 37% случаях, в 63% случаях беременность заканчивалась преждевременным родоразрешением.

При сопоставлении данных расчета цитопротективного коэффициента и исходах беременности у женщин с АФС и применением ВВИГ установлено, что у женщин с ЦК более 55%, беременность заканчивалась срочными родами в 88% случаях, преждевременными родами в 22% случаях. У женщин с ЦК менее 55% беременность заканчивалась срочными родами в 25% случаях, преждевременными родами в 75% случаях.

Таким образом, оценку эффективности действия препарата у конкретного пациента можно проводить с помощью разработанного нами метода, используя цитопротективный коэффициент. Если коэффициент $>55\%$, то у таких пациентов использование ВВИГ прогнозируется как высокоэффективное. Если коэффициент $<55\%$, то у таких пациентов использование ВВИГ прогнозируется как малоэффективное. Вводимый нами показатель, безусловно, не может быть единственным параметром, регулирующим назначение ВВИГ, однако мы считаем, что он может использоваться как важный дополнительный критерий прогнозирования эффективности ВВИГ при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.

Проведенные исследования показали, что в сыворотке периферической крови у женщин с ПНБ и, в особенности, у женщин с АФС содержатся цитопатические факторы, нарушающие функцию эндотелия, что приводит к комплексу микроциркуляторных нарушений с дальнейшим развитием тромботических состояний. Дисфункцию эндотелия можно оценить как косвенно, по циркулирующим в периферической крови маркерам, таким как тромбомодулин, sICAM-1, фактор Виллебранда, аннексин 5, эндотелин-1, так и прямым способом по оценке эндотелиопатического действия сывороток крови, используя линию эндотелиальных клеток Hu926. Одним из эффективных методов защиты клеток эндотелия от повреждения является использование иммуноглобулинов для внутривенного введения. Иммуноглобулины, сохраняя функциональную активность эндотелиальных клеток, предотвращают развитие патологических состояний связанных с повреждением эндотелия и развитием эндотелиальной дисфункции. При этом *in vitro*, с помощью разработанного нами метода, можно прогнозировать эффективность действия ВВИГ при терапии женщин с ПНБ и АФС. Данный метод возможно также использовать для прогнозирования эффективности ВВИГ при терапии и других состояний, связанных с эндотелиальной дисфункцией.

ВЫВОДЫ

1. У женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС выявлялись антитела к β 2-гликопротеину-I в 37,1% случаев, антитела к кардиолипину - в 14,3% случаев, антитела к фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу и фосфатидиловой кислоте - в 7,1% случаев, антитела к аннексину 5 - в 29,9% случаев, антитела к протромбину - в 2,6% случаев, «волчаночный антикоагулянт» определялся в 42,8% случаях.
2. В сыворотке периферической крови женщин с привычным невынашиванием беременности уровень маркеров эндотелиальной дисфункции тромбомодулина, фактора Виллебранда, растворимой формы молекулы межклеточной адгезии (sICAM-I) и сывороточного аннексина 5 был выше, чем у женщин с физиологическим течением беременности ($p < 0,001$). Уровень тромбомодулина и фактора Виллебранда был выше у женщин с ПНБ с АФС по сравнению с уровнем этих же маркеров у женщин с ПНБ без АФС ($p < 0,05$).
3. Цитопатический эффект сывороток крови наиболее выражен у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС 54,2% {44,5;66,3}, по сравнению с цитопатическим эффектом сывороток крови женщин без АФС 40,2% {34,5;52,3}, $p < 0,001$ и сывороток крови женщин с физиологическим течением беременности 13,5% {3,9;22,6}, $p < 0,001$.
4. Иммуноглобулины для внутривенного введения оказывали эндотелиопротективный эффект, характеризовавшийся снижением цитопатического влияния сывороток периферической крови в отношении эндотелиальных клеток после обработки их препаратом ВВИГ: у женщин с привычным невынашиванием беременности без АФС на 71,5% {57,4;84,2}, у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС на 70,1% {50,0;82,4}.
5. Разработанный метод лабораторной оценки эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения с определением цитопротективного коэффициента, позволяет прогнозировать клиническую эффективность их применения у женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС.
6. Терапия женщин с привычным невынашиванием беременности и АФС препаратами иммуноглобулинов для внутривенного введения приводила к снижению числа преждевременных родов на 36%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Женщинам с привычным невынашиванием в период планирования беременности необходимо определять аутоантитела к кардиолипину, β 2-гликопротеину-I, «волчаночный антикоагулянт» и антитела к аннексину 5.
2. При наступлении беременности для диагностики развития дисфункции эндотелия у женщин с привычным невынашиванием и АФС рекомендуется определение маркеров эндотелиальной дисфункции, таких как тромбомодулин, фактор Виллебранда, sICAM-I и сывороточный аннексин 5.
3. До назначения иммунотерапии препаратом ВВИГ следует провести лабораторную оценку протективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения. Результат тестирования оценивается в виде цитопротективного коэффициента (ЦК). Если ЦК >55%, то у таких пациентов использование ВВИГ прогнозируется как высокоэффективное. Если ЦК <55%, то у таких пациентов использование ВВИГ прогнозируется как малоэффективное.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение темы является перспективным направлением для оценки механизмов эндотелиопатического эффекта сывороток крови, оценки связывания ВВИГ с эндотелиальными клетками и оценки механизмов цитопротективного действия ВВИГ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых российских научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации.

1. Чепанов С.В. Экспериментальное обоснование эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при акушерской патологии / С.В. Чепанов, Д.И. Соколов, Т.Н. Шляхтенко, Р.В.Капустин, Л.С. Огорокова, К.Л. Белякова, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология. - 2016. - № 5. - С. - 82-89.
2. Чепанов С.В. Способ прогнозирования цитопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и диагностированным антифосфолипидным синдромом / С.В. Чепанов, Д.И. Соколов, Т.Н. Шляхтенко, М.С. Зайнулина, М.И. Миращвили, С.А. Сельков // Патент на изобретение №2548754, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 24 марта 2015 г.
3. Макулова М.В. Растворимая форма молекулы межклеточной адгезии-1 и эндотелин-неспецифические маркеры эндотелиальной дисфункции при гестозе / М.В. Макулова, С.В. Чепанов, Д.И. Соколов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология. - 2015. - № 2. - С. 27-32.

4. Шляхтенко Т.Н. Антифосфолипидный синдром при невынашивании беременности / Т.Н. Шляхтенко, Е.А. Алябьева, О.Н. Аржанова, С.А. Сельков, Т.А. Плужникова, С.В. Чепанов // Журнал акушерства и женских болезней. - 2015. - Т. 64. - № 5. - С. 69-76.
5. Ткаченко О.Ю. Сравнительный анализ информативности тест-систем разных производителей для определения антифосфолипидных антител для диагностики антифосфолипидного синдрома / О.Ю. Ткаченко, С.В. Лапин, Н.М. Лазарева, А.А. Шмонин, Л.Н. Соловьева, Е.А. Бондарева, С.А. Сельков, С.В. Чепанов // Медицинская иммунология. - 2015. - Т. 17. - № 5. - С. 145.
6. Чепанов С.В. Антитела к аннексину V у женщин с привычным невынашиванием беременности / С.В. Чепанов, Т.Н. Шляхтенко, М.С. Зайнулина, М.И. Миращвили, Д.И. Соколов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 7. - С. 29-32.
7. Чугунова А.А. Роль иммунологических нарушений в развитии осложнений течения беременности и родов у беременных с невынашиванием на фоне антифосфолипидного синдрома / А.А. Чугунова, А.В. Селютин, С.В. Чепанов // Российский иммунологический журнал. - 2012. - Т. 6 (14), № 2 (1). - С.190-191
8. Чугунова А.А. Содержание основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток у беременных с невынашиванием и антифосфолипидным синдромом при лечении препаратами иммуноглобулинов / А.А. Чугунова, М.С. Зайнулина, А.В. Селютин, Д.И. Соколов, В.А. Михайлова, С.В. Чепанов, С.А. Сельков // Акушерство и гинекология.-2012. - № 2. - С.30-36.
9. Сельков С.А. Иммунорегуляторные эффекты иммуноглобулинов для внутривенного введения / С.А. Сельков, Д.И. Соколов, С.В. Чепанов // Медицинская иммунология. -2013. -Т15. - №1. - С.5-12

Научные издания, статьи, тезисы докладов и статей

10. Chepanov S.V. Angioprotective Effect of Intravenous Immunoglobulin of Women with Recurrent Miscarriage and Antiphospholipid Syndrome / S.V. Chepanov, D.I. Sokolov, T.N. Shlachtenko, S.A. Selkov // 15th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Lupus. - 2016. - №Sep25. - P. 64-65.
11. Кривонос М.И. Состояние системы гемостаза у пациенток с наличием антифосфолипидных антител в протоколе ЭКО / М.И. Кривонос, М.С. Зайнулина, С.А. Сельков, С.В. Чепанов, Д.И. Соколов // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2016. - Приложение 1. - №3. - Стр. 224-225.
12. Шляхтенко Т.Н. Роль антител к хорионическому гонадотропину человека в репродуктивных неудачах / Т.Н. Шляхтенко, С.В. Чепанов // Материалы II национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства и обучающего преконгресс-курса XI Всемирного конгресса по перинатальной медицине» Журнал акушерства и женских болезней. - 2013. - том LXII спецвыпуск. - С. 86.

13. Чепанов С.В. Роль антител к аннексину V у женщин с привычным невынашиванием беременности / С.В. Чепанов // Материалы IV ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2013». - 2013. - С.100.
14. Чепанов С.В. Спектр аутоиммунных антител у женщин с привычным невынашиванием / С.В. Чепанов, А.А. Чугунова // Материалы III ежегодн. науч. конф. молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2012». –2012. – С. 54-55.
15. Алябьева Е.А. Влияние аутоиммунных нарушений на течение и исход беременности у женщин с привычным невынашиванием / Е.А. Алябьева, Т.Н. Шляхтенко, С.В. Чепанов // Сборник материалов XIII Всероссийского научного форума Мать и дитя. - 2012. - С. 8-9.
16. Шляхтенко Т.Н. Антифосфолипидный синдром в акушерской практике / Т.Н. Шляхтенко, С.В. Чепанов, Е.А. Алябьева // Сборник материалов XIII Всероссийского научного форума Мать и дитя. - 2012. - С. 206-207.