

Состояние гемостаза здоровых плодов

М.А.Бессонова¹, Г.Н.Буслаева¹, Е.В.Никушкин², Т.Е.Цимбалова², В.А.Гнетецкая³

¹Российский государственный медицинский университет;

²Центральная клиническая больница с поликлиникой Управления делами Президента РФ, Москва;

³Центр планирования семьи и репродукции, Москва

Исследование гемостаза плода и новорожденного остается актуальной задачей перинатальной медицины, несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и лечении тромбогеморрагических расстройств у новорожденных. Причиной недостаточного изучения гемостаза плода и новорожденного являются технические трудности сбора анализов, забор небольшого количества крови, затруднение оценки гемостаза в раннем возрасте, из-за наличия быстрых количественных и качественных его изменений. В статье представлены исследования гемостаза 27 здоровых плодов на сроке гестации 20–28 нед. Пуповинная кровь плодов была получена методом кордоцентеза. В гемостазе оценивались средние уровни антитромбина III, протеина С, плазминогена, α_2 -антиплазмина, ингибитора активатора плазминогена и д-димера. При изучении гемостаза плодов обнаружены более низкие, чем у новорожденных, уровни изучаемых показателей и тенденция к их возрастанию при увеличении срока гестации. Результаты свидетельствуют о том, что гемостаз плодов – это динамичная система, постепенно развивающаяся и поддерживающая равновесие между активаторами и ингибиторами коагуляции, а также с фибринолитической системой на протяжении внутриутробной жизни.

Ключевые слова: гемостаз, плод, антитромбин III, протеин С, плазминоген, α_2 -антиплазмин, ингибитор активатора плазминогена, д-димер

The state of hemostasis in healthy fetuses

M.A.Bessonova¹, G.N.Buslaeva¹, E.V.Nikushkin², T.E.Tsimbalova², V.A.Gnetetskaya³

¹Russian State Medical University;

²Central Clinical Hospital with Polyclinics of Administration of President of the Russian Federation, Moscow;

³Center for Family Planning and Reproduction, Moscow

The study of hemostasis of the fetus and the neonate remains a topical task of perinatal medicine, despite the achievements in diagnosing and treatment of thrombohemorrhagic disorders in the neonate. The cause of insufficient studying of hemostasis of the fetus and the neonate are technical difficulties of collecting material for tests, little quantities of blood sampling, difficult evaluation of hemostasis in infants because of its fast quantitative and qualitative alterations. The article presents a study of hemostasis in 27 healthy fetuses at terms of gestation 20–28 weeks. Umbilical blood of the fetuses was obtained by the method of cordocentesis. In hemostasis, the average levels of antithrombin III, protein C, plasminogen, α_2 -antiplasmin, plasminogen activator inhibitor and d-dimer were assessed. In hemostasis of the fetuses the levels of the indices studied were found to be lower than in the neonate and they tended to increase with an increase of the term of gestation. The results indicate that hemostasis of fetuses is a dynamic system that gradually develops and maintains an equilibrium between the activators and inhibitors of coagulation, and also a balance with the fibrinolytic system during intrauterine life.

Key words: hemostasis, fetus, antithrombin III, protein C, plasminogen, α_2 -antiplasmin, plasminogen activator inhibitor, d-dimer

Тромбогеморрагические расстройства являются частым осложнением тяжелых форм неонатальных заболеваний и одной из главных непосредственных причин смертности в этом периоде [1]. Общеизвестное положение о склонности новорожденных как к геморрагическим, так и к тромботическим осложнениям до сих пор не имеет однозначной трактовки. Недостаточно исследованы резервные возможности системы гемостаза как в норме, особенно у недоношенных детей, так и при различных патологических состояниях [2]. Исследования гемостаза плода недостаточно полно

представлены в отечественной и зарубежной литературе и касаются не всех звеньев свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем.

Изучение гемостаза плода достаточно трудоемкий и длительный процесс, в связи с тем, что система коагуляции в период внутриутробного развития является динамичной, забор анализов производится с помощью инвазивной процедуры – кордоцентеза, объемы исследуемой крови не превышают 1,0–2,0 мл, а для исследования активаторов и ингибиторов коагуляции необходимо использование микрометодик.

Эмбриональный гемостаз – динамическая система, которая развивается стадиями, постепенно достигая уровня взрослых, но всегда поддерживает равновесие между активаторами и ингибиторами коагуляции, а также фибринолизом на всем протяжении внутриутробной жизни [3]. Многие коагуляционные белки в эмбриональный период

Для корреспонденции:

Буслаева Галина Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры детских болезней №1 педиатрического факультета Российского государственного медицинского университета Росздрава

Адрес: 117049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1

Телефон: (495) 959-8754

Статья поступила 16.08.2007 г., принята к печати 21.01.2008 г.

уже синтезированы, но с середины внутриутробного периода продукция этих белков приостанавливается до момента родов. Причины всех этих процессов в настоящее время не известны [4].

Гемостаз – процесс, обеспечивающий в организме предупреждение и прекращение кровотечений. Осуществляется он тремя взаимодействующими между собой функционально-структурными компонентами – стенками кровеносных сосудов, клетками крови и плазменной ферментной системой свертывания [5]. Имеется два основных пути запуска свертывания крови. Внешний путь связан с поступлением из тканей в кровь тканевого тромбопластического фактора (фактора III). Второй путь активации свертывания – внутренний – происходит без участия тканевого тромбопластина за счет ферментных факторов, содержащихся в крови или плазме.

В антикоагулянтной системе наиболее мощным и универсальным является антитромбин III (AT III), который инактивирует не только тромбин, но и все другие активированные ферментные факторы свертывания (XIIa, XIa, IXa и Xa); на его долю приходится более 75% всей антикоагулянтной активности плазмы. Он же является плазменным кофактором гепарина, под влиянием которого трансформируется из постепенно действующего в быстро действующий ингибитор свертывания.

Важнейшую роль в поддержании жидкого состояния крови играют также такие физиологические антикоагулянты как гепарин, протеины С и S, тромбомодулин и др. [6].

Фибринолитическая система организма функционально направлена на естественный лизис, образующегося в процессе перманентного локального гемостаза фибринового остова тромба на разных этапах формирования: от фибриномономера, РКМФ и до фибрина. Она состоит из: плазминового – основного звена фибринолиза – и неплазминового – фибринолитических компонентов лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов, непосредственно расщепляющих фибрин [7].

В плазминовое звено фибринолиза включаются: плазминоген; тканевый (эндотелиальный) активатор плазминогена; проактиватор последнего; киназы – тканевые и бактериальные (стрептокиназа, стафилокиназа и др.); ингибиторы плазмина (антиплазмины); ингибиторы активаторов (антиактиваторы) плазминогена [8].

Плазминоген – профермент, широко распространенный в организме. Это гликопротеид, синтезируемый в печени, костном мозге, почках, причем весьма быстро, так как его концентрация может вырасти от 0 до нормальных значений в течение 24 ч. Под действием некоторых активаторов плазминоген превращается в плазмин – сериновую протеиназу, расщепляющую лизил-аргининовые и лизил-лизиновые связи в белковых субстратах, главным образом в фибрине и фибриногене [9].

Неотъемлемый компонент фибринолитической системы – ингибиторы. Антиплазминовыми свойствами обладают: α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин, α_1 -антитрипсин, AT III, C1-инактиватор.

Одноцепочечный гликопротеин – α_2 -антиплазмин образует комплексы только с плазмином и трипсином. Взаимодействие плазмина и α_2 -антиплазмина протекает в 2 стадии: быстрого обратимого образования фермент-ингиби-

торного комплекса и стадию медленной трансформации последнего в необратимый. Плазмин теряет реактивность к ингибитору при образовании комплексов со стрептокиназой. В результате взаимодействия α_2 -антиплазмина с фибрином и образования комплекса фибриновые сгустки становятся менее чувствительными к фибринолизу плазмином. Фибринолиз осуществляется в присутствии фибринстабилизирующего фактора (транс-глутаминазы, фактора XIII), тромбина и Ca^{2+} . Ингибирование фибринолиза пропорционально количеству α_2 -антиплазмина, соединенного с фибрином. Спонтанный фибринолиз вызывается активацией связанного фибрином плазминогена и эффективно ингибируется α_2 -антиплазмином, также связанным с фибрином [10].

К основным ингибиторам активатора плазминогена относится ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1). Синтезируется он эндотелиальными клетками и гепатоцитами в культуре, различными линиями гепатомы, меланомными и другими клетками, накапливается в α -гранулах тромбоцитов и в плазме. PAI-1 ингибирует активность тканевого активатора плазминогена и крокиназы путем образования с ними неактивного и не распадающегося комплекса. Клетки синтезируют активный PAI-1, выделяют его в плазму, в которой он *in vitro* инактивируется с полупериодом 2–4 ч при 37° [11, 12]. Существуют также такие антиактиваторы, как ингибитор тканевого активатора плазминогена 2-го типа (PAI-2), выделенный из плаценты и культур макрофагов различного происхождения (присутствует в крови беременных), и ингибитор тканевого активатора плазминогена 3-го типа (PAI-3), который является относительно слабым ингибитором и подавляет активацию плазминогена протеином С [13, 14]. В нормальной плазме PAI-2 и PAI-3 не обнаруживаются. Около 60% антиактиваторной активности приходится на PAI-1. В культуре PAI-1 инактивируется при участии тромбина и протеина С, которые связывают его в комплекс (протеин С, таким образом, обладает антитромбиновым и профибринолитическим действием). За удаление активного PAI-1 из циркуляции отвечает печень. PAI-1 – белок острой фазы, повышение его активности – неспецифический показатель остроты процесса, но не конкретной болезни; прогностическое значение этот признак имеет лишь для больных венозными тромбозами [10, 14].

При расщеплении волокон фибрина образуются фрагменты – д-димеры. При определении с помощью специфических антисывороток содержания д-димеров, можно судить, в какой степени в исследуемой крови выражен фибринолиз. Повышенное содержание д-димера (фрагмента фибриногена) является одним из главных маркеров активации системы гемостаза, поскольку отражает как образование фибрина в исследуемой крови, так и его лизис. Выявление в плазме д-димера свидетельствует об активации в ней фибринолиза и используется для исключения тромбоза и диагностики ДВС-синдрома.

Фибринолитическая (плазминовая) система находится в динамическом равновесии со свертывающей системой крови, обеспечивая тем самым целостность сосудистого русла человека. Однако плазминовая система не только обеспечивает удаление фибрина из сосудистого русла, но

и участвует в других биологических феноменах, таких, как репарация тканей, злокачественная их трансформация, макрофагальные реакции, овуляция и имплантация эмбриона [9].

Недостаточное количество сведений о состоянии гемостаза здоровых плодов в отечественной и зарубежной литературе побудило нас к изучению у них становления антикоагулянтной и фибринолитической систем.

Пациенты и методы

Обследовано 29 беременных женщин, перенесших диагностический кордоцентез для исключения хромосомных заболеваний плода. Критериями включения их в исследование были: возраст старше 35 лет; заболевание краснухой во время настоящей беременности, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез; изменения, выявленные при раннем пренатальном скрининге; ультразвуковые маркеры врожденных заболеваний у плода.

Гестационный возраст обследованных плодов составил от 20 до 28 нед от зачатия; всем 29 плодам был проведен генетический анализ. У 2 плодов (мальчика и девочки) обнаружена трисомия по 21 хромосоме (синдром Дауна). Исследование показателей гемостаза проводилось 27 здоровым плодам.

При изучении антикоагулянтной и фибринолитической систем у обследуемых плодов нами определены средние величины показателей гемостаза: антитромбина III (АТ III), протеина С, плазминогена, α_2 -антиплазмина, ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (РАI-1) и д-димера, в зависимости от срока гестации плодов.

Измерение показателей плазменного гемостаза (антитромбина III, протеина С, плазминогена, α_2 -антиплазмина, ингибитора активатора плазминогена и д-димера) проводилось на автоматическом анализаторе Behring Coagulation Timer (ВСТ), фирмы Behring, Германия, с использованием реактивов, калибраторов, стандартных и контрольных материалов фирмы Behring, Германия.

Антитромбин III, протеин С, плазминоген и α_2 -антиплазмин определялись методом с хромогенным субстратом, с использованием наборов Berichrom Antithrombin III (А) и Berichrom Protein C, Berichrom Plasminogen, Berichrom α_2 -Antiplasmin. Результаты оценивались анализатором ВСТ автоматически кинетическим методом (Kinetic with enzyme) по

калибровочной кривой, построенной с использованием стандартной человеческой плазмы с паспортным значением антитромбина III 100%, протеина С 99%, плазминогена 98%, α_2 -антиплазмина 92%.

Ингибитор активатора плазминогена определяли также на хромогенном субстрате, с наборами Berichrom PAI. Результаты оценивали тем же методом, по калибровочной кривой, построенной с использованием калибраторов с паспортным значением ингибитора активатора плазминогена от 0 до 5,82 Ед/мл.

Д-димер определяли иммунологическим методом с помощью наборов ВС D-Dimer и оценивали автоматически по калибровочной кривой, с паспортным значением Д-димера 4300 мкг/л.

Результаты исследования и их обсуждение

Здоровые плоды были разделены по гестационному возрасту на 2 группы: 20–23 ($n = 19$) и 24–28 ($n = 8$) нед гестации: в каждой группе определяли показатели систем свертывания и фибринолиза (таблица) и сравнивали их между собой и уровнем нормы для доношенных новорожденных.

Наши данные не полностью совпадают с литературными, свидетельствующими о более значимых различиях в уровнях показателей противосвертывающей системы (АТ III и протеина С) в зависимости от сроков гестации; авторами выявлено повышение этих показателей с увеличением гестационного возраста, однако число пациентов в этом исследовании также было небольшим [1].

У здоровых новорожденных к моменту рождения повышаются уровни физиологических антикоагулянтов: АТ III и протеина С, а также плазминогена и ингибитора его активатора. Количество α_2 -антиплазмина в крови новорожденных увеличивается незначительно сравнительно с таковым у плодов, а уровень д-димера резко нарастает, значительно превышая его у взрослых; исследований содержания д-димера у плодов в доступной нам литературе не встречалось.

Таким образом, мы выявили относительно низкий уровень показателей противосвертывающей и фибринолитической систем в крови здоровых плодов, а также отметили тенденцию к их повышению при увеличении гестационного возраста, без достижения однако нормальных значений гемостаза у здоровых новорожденных. Не обнаружено значимых различий при сравнении средних величин показателей гемостаза у здоровых плодов на сроках гестации 20–23 и 24–28 нед. Имеющаяся тенденция к возрастанию уровней протеина С, плазминогена, α_2 -антиплазмина и ингибитора активатора плазминогена при увеличении гестационного возраста может свидетельствовать о постепенном созревании противосвертывающей и фибринолитической систем плодов.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что гемостаз плодов – это динамичная система, постепенно развивающаяся и поддерживающая равновесие между активаторами и ингибиторами коагуляции, а также с фибринолитической системой на протяжении внутриутробной жизни. Анализ этапов становления гемостаза здоровых плодов остается актуальной задачей, привлекающей внимание ученых и требующей дальнейшего изучения.

Таблица. Показатели гемостаза плодов из группы сравнения в зависимости от сроков гестации ($M \pm m$)

Показатель	Среднее значение	20–23 нед	24–28 нед	Норма донош. новорожденных [3, 15, 16]
АТ III, %	20,0 ± 0,65	20,2 ± 0,83	19,5 ± 0,91	59,4 (42–80)
Протеин С, %	7,5 ± 0,57	7,3 ± 0,43	8,1 ± 1,72	28,2 (14–42)
Плазминоген, %	12,2 ± 1,09	11,6 ± 1,32	13,8 ± 1,93	58,0 (47–68)
α_2 -антиплазмин, %	54,9 ± 3,09	53,5 ± 3,0	59,6 ± 9,58	85,0 (70–100)
РАI-1, Ед/мл	1,5 ± 0,33	1,4 ± 0,37	1,7 ± 0,45	1,8 (1,6–2,0)
Д-димер, мкг/л	25,8 ± 1,58	26,1 ± 2,08	25,0 ± 2,10	924,6 (716,0–1133,1)

Литература

1. Шабалов Н.П., Цвелева Ю.В. Основы перинатологии. М.: МЕДпресс-информ, 2004; 504–24.
2. Иванов Д.О. (Совместно с Н.П.Шабаловым, Н.Н.Шабаловой). Механизмы компенсации в системе гемостаза новорожденных с тяжелой перинатальной патологией. Сборник материалов Российской конференции по детской гематологии. СПб., 1995; 51.
3. Reverdiau-Moalic P., Delahousse B., Body G., Bardos P., Leroy J., Gruel Y. Evolution of Blood Coagulation Activators and Inhibitors in the Healthy Human Fetus. *Blood*, 1996; 3(88): 900–6.
4. Manco-Johnson M.J. Development of Hemostasis in the Fetus. *Thrombosis Research*, 2005; 115(suppl.) 1: 55–63.
5. Lorant D.E., Li W., Tabatabaei N., Garver M.K., Albertin K.H. P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants. *Blood*, 1999; 94: 600–9.
6. Lord S.T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr. Opin. Hematol.* 2007; 14(3): 236–41.
7. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* Hrynenko T.V., Zadorozhna M.B., Iusova O.I. Regulation with alpha-2-antiplasmin of Glu-plasminogen activation by tissue activator on fibrin. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2006; 78(3): 106–12.
8. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 2005; 129(3): 307–21.
9. Mutch N.J., Thomas L., Moore N.R., Lisiak K.M., Booth N.A. TAFI, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *J Thromb. Haemost.* 2007; 5(4): 812–7. Epub 2007 Feb 2.
10. Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front. Biosci.* 2007; 12: 2957–66.
11. Gorlatova N.V., Cale J.M., Elokda H., Li D., Fan K., Warnock M., Crandall D.L., Lawrence D.A. Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol. Chem.* 2007; 282(12): 9288–96. Epub 2007 Feb 2.
12. Astedt B., Lindoff C., Lecander. Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy. *Semin. Thromb. Haemost.* 1998; 24(5): 431–5.
13. Arnout J., Hoylaerts M.F., Lijnen H.R. Hemostasis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006; (176 Pt 2): 1–41.
14. Moniwa N. Relationship of urokinase type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and protein C in fibrinolysis of human placenta. *Pol. J. Pharmacol.* 1996; 48(2): 215–20.
15. Andrew M., Paes B., Milner R., Johnston M., Mitchell L., Douglass M. Tollefsen, Powers P. Development of the Human Coagulation System in the Full-Term Infant. *Blood*, 70, Issue 1: 165–72, 07/01/87.
16. Tay, Siow-Phing a; Cheong, Soon-Keng a; Boo, Nem-Yun b. Circulating tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and D-dimer in umbilical cord blood of normal term neonates and adult plasma. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2003; 14(2): 125–9.

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Синдром Кушинга и надпочечниковая недостаточность, связанная с местным применением глюкокортикостероидов

Длительные аппликации местных глюкокортикостероидов (МГКС) вызывают обратимое подавление функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Дети первого года жизни, у которых применяются МГКС, относятся к группе высокого риска по развитию синдрома Кушинга и надпочечниковой недостаточности, особенно при нанесении препаратов на участки кожи, находящиеся под подгузниками. Авторы статьи, опубликованной в *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, приводят наблюдение 6 пациентов (4 девочки и 2 мальчика) в возрасте от 3 до 8 мес, которым матери наносили сильные МГКС (клубетазола пропионат и дифлюкорталона валерат) без назначения врача. Всем детям была проведена оценка состояния функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и других побочных эффектов терапии МГКС. После прекращения применения МГКС у детей были исследованы уровни АЛТ, АСТ, липидов, АКТГ и утренней концентрации кортизола в сыворотке крови. Также был проведен тест с АКТГ-стимуляцией и УЗИ органов брюшной полости для исключения стеатоза печени. Для предотвращения синдрома отмены кортикостероидов всем детям был назначен гидрокортизон в постепенно уменьшающейся дозе.

Результаты теста с АКТГ-стимуляцией показали, что у всех детей имеется подавление функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Увеличение размеров печени диагностировано также у всех пациентов, причем у 3 из них выявлен стеатоз печени. Кроме того, у 5 детей уровень печеночных трансаминаз был повышен. Пять пациентов находились под наблюдением в течение 6–14 мес. Один ребенок умер от генерализованной цитомегаловирусной инфекции. В заключение авторы подчеркивают, что врачи должны быть насторожены в отношении серьезных побочных эффектов терапии МГКС и контролировать длительность их применения. Кроме того, необходимо информировать родителей о побочных эффектах лечения МГКС, особенно в тех случаях, когда МГКС являются препаратами выбора.

Источник: Güven A., Gülümser O., Ozgen T. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007; 20(11): 1173–82.