

УДК 618; 39-085.37

© И. И. Линников, 2013.

ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА

В. И. Линников

Кафедра акушерства и гинекологии №2 (зав. – профессор А. А. Зелинский), Одесский национальный медицинский университет; 65082, г. Одесса, Валиховский переулок, 2; E-mail: office@odmi.edu.ua
Медико-генетический центр «Гермедтех» (директор – А. А. Апельханц); Украина, г. Одесса, ул. Новосельского, 68; E-mail: linnikovsyava@gmail.com

IMMUNOTHERAPY IN COMPLEX TREATMENT OF ANTYPHOSPHOLIPID SYNDROME

V. Linnikov

SUMMARY

The article presents the results of the laboratory and clinical studies of the drug intravenous immunoglobulin (IV-Ig) Bioven Mono in treatment of fetal loss syndrome caused by antiphospholipid syndrome. In the group of pregnant women who received therapy IV-Ig, a decrease of the levels of antiphospholipid antibodies, markers of thrombophilia, reduction of the frequency of pregnancy complications and an improvement of perinatal indicators have been observed. It has been concluded that the immune-modulating effect is probably related to its positive impact on the function of T-regulatory lymphocytes.

ІМУННА ТЕРАПІЯ У КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ

В. І. Лінніков

РЕЗЮМЕ

Представлено результати лабораторно-клінічних досліджень застосування препарату внутрішньовенного імуноглобуліну (ВВІГ) біовен моно при лікуванні синдрому втрати плода, який обумовлений антифосфоліпідним синдромом. У групі вагітних, які одержували терапію ВВІГ, відзначено зниження рівнів антифосфоліпідних антитіл, маркерів тромбофілії, зменшення частоти ускладнень вагітності та покращання перинатальних показників. Виявлено, що імуномодельючий ефект препарату вірогідно пов'язаний з його позитивним впливом на функцію Т-регуляторних лімфоцитів.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, система гемостаза, синдром потери плода, иммунокомпетентные лимфоциты, внутривенный иммуноглобулин биовен моно.

Антифосфолипидные антитела (АФА) оказывают многогранное влияние на систему гемостаза, повреждая все его защитные звенья: эндотелиальный барьер, функцию естественных антикоагулянтов, эндогенный фибринолиз, и активируя тромбоцитарное звено гемостаза и прокоагулянтные факторы. Сочетание протромботических и нетромботических эффектов, включая активацию локального воспалительного ответа, влияние на трофобласт и характеристики эмбриона, приводит к развитию характерной клинической картины – целому спектру тромботических осложнений в артериальных, венозных сосудах, в системе микроциркуляции по типу ангиопатии, а также к репродуктивным потерям и тяжелым поздним акушерским осложнениям, таким как гестоз и преэклампсия, фетоплацентарная недостаточность, задержка роста плода.

Изучение антифосфолипидного синдрома (АФС) невозможно без междисциплинарного подхода. В настоящее время к изучению АФС привлечены клиницисты всех специальностей. Настало время применить эти знания при трактовке разнообразной клиники

АФС, изучении критических состояний, рецидивирующих тромбозов и акушерских осложнений [1, 2].

В этиопатогенезе АФС и обусловленного им синдрома потери плода (СПП) остается много недостаточно изученных вопросов. В последние годы появилось ряд исследовательских работ, которые свидетельствуют о важнейшей роли нарушений функции иммунной системы в развитии этой патологии [1, 3, 4, 12]. Однако необходимо заметить, что в настоящее время нет определенных терапевтических рекомендаций в отношении иммунотерапии АФС. Большое внимание исследователи уделяют иммуносупрессии глюкокортикоидами (при определенном негативном влиянии их на физиологическое течение гестации и непосредственно на плод), а также применению препаратов иммуноглобулинов. Обсуждаются возможности пассивной иммунотерапии путем внутривенного введения иммуноглобулинов (ВВІГ) и имеется ряд сообщений о ее эффективности при невынашивании беременности [6, 12, 14].

Среди наиболее эффективных иммуномоделирующих лекарственных средств, используемых в

различных областях медицины, важное место принадлежит препаратам для внутривенного введения. Положительный эффект терапии иммуноглобулинами отражен в ряде рандомизированных клинических исследований [9, 13].

В последние годы внимание исследователей привлекает изучение естественных регуляторных Т-клеток (Treg), которые могут играть важную роль в индукции толерантности к аллоантигенам плода [3, 5]. Данные последних лет о способности Treg-клеток ингибировать цитотоксическую активность CD8⁺ Т-лимфоцитов [8] и NK-клеток [14, 16] позволяют рассматривать Treg-клетки в качестве основных претендентов на роль клеток, контролирующих иммунный баланс в системе «мать-плод», а также предположить их участие в патогенезе АФС при беременности. Однако такого рода сообщения в доступной нам литературе практически отсутствуют.

Цель работы состояла в клинико-лабораторной оценке применения препарата ВВИГ биовен моно на течение беременности и ее исход у беременных с СПП, обусловленным антифосфолипидным синдромом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью решения поставленной задачи нами были включены в исследование 63 беременные с СПП, обусловленным АФС. В зависимости от проводимой терапии они были разделены на 2 группы.

В группе I (n=35) пациентки получали традиционную антикоагулянтную, антиагрегантную и антиоксидантную терапию. Пациентки II группы (n=28), помимо традиционной терапии, получали препарат из группы ВВИГ – биовен моно («Биофарм», Украина) – в курсовой дозе 200 мл (5% раствора 25 мл) внутривенно капельно 1 раз в неделю, 3 недели подряд в первом и втором триместрах.

Препарат не оказывает тератогенного влияния, имеет двойную вирусинактивацию и отвечает требованиям ВОЗ в отношении внутривенных иммуноглобулинов.

В контрольную группу вошло 25 беременных с физиологическим течением беременности.

По срокам беременности, данным акушерского и гинекологического анамнезов, соматической патологии группы были сопоставимы.

Лабораторные исследования антифосфолипидных антител включали определение волчаночного антикоагулянта, концентрации антикардиолипино-

вых, антифосфатидилсериновых антител, антител к β²-гликопротеину, аннексину V, протромбину.

Диагностика тромбофилического состояния крови включала определение агрегации тромбоцитов: степень и скорость индукции ристомидином, АДФ в концентрации 2 мкМ, выявление концентрации растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ), молекулярных маркеров тромбофилии – ТАТ (фрагментов тромбин-антитромбин), D-димера (полимеризация фибрина).

Оценивали также содержание основных субпопуляционных иммунокомпетентных клеток в периферической крови обследуемых беременных с использованием метода проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Beckton Dickenson, США). Определяли с помощью стандартных наборов абсолютное и относительное содержание лимфоцитов с фенотипом CD3⁺ (Т-лимфоцитов), CD3⁺ CD4⁺ (Т-хелперов), CD3⁺ CD8⁺ (цитотоксических Т-лимфоцитов), CD16⁺ CD56⁺ (NK-клеток). Оценивали также количество регуляторных Treg-клеток, которые обладают способностью подавлять специфическую пролиферацию и эффекторные функции лимфоцитов. Для определения Treg-моноклеары периферической крови, выделенные на градиенте плотности, окрашивали специфическими антителами к CD3, CD4, CD5, CD25, CD127; Treg-клетки определяли по фенотипу CD3⁺ CD4⁺ CD25 High, CD127 Low [3].

Определение состояния системы гемостаза, уровней антител, иммунологические исследования были проведены до начала лечения, а затем в конце третьего триместра беременности, молекулярные маркеры тромбофилии ТАТ и D-димер – ежемесячно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении показателей гемостазиограммы до начала лечения у беременных с СПП, обусловленным АФС, и беременных контрольной группы отмечалась активизация тромбоцитарного и плазменного звеньев системы гемостаза: нарастание максимальной агрегации (Тма) тромбоцитов при стимуляции АДФ в концентрации 2 мкМ, что сопровождалось появлением гиперфункциональных нетипичных агрегатограмм в 100% наблюдений и достоверно значимым, по сравнению с контрольной группой, снижением общего количества тромбоцитов, что свидетельствовало об активации системы гемостаза (табл. 1).

Таблица 1

Показатели гемостазиограммы, уровней антител и иммунограммы у беременных до начала лечения

Показатели	Контрольная группа (n=25)	I группа (n=35)	II группа (n=28)
Тромбоциты, тыс.	310,5±24,6	138,5±21,2*	129,0±29,6*
Степень агрегации, %	62,7±4,6	91,5±5,7*	94,8±5,9*

Продолжение таблицы 1

Показатели	Контрольная группа (n=25)	I группа (n=35)	II группа (n=28)
Скорость агрегации, %/мин	69,8±3,4	99,5±4,6*	93,3±3,7*
РКМФ, мг/%	4,5±0,5	21,3±1,3*	20,9±1,4*
ТАТ, мкг/мл	2,2±0,5	5,6±0,4*	5,1±0,7*
D-димер, мкг/мл	0,40±0,08	1,70±0,07*	1,80±0,04*
АФА (кардиолипидные антитела), г/л	2,8±1,9	20,4±4,9*	22,7±4,7*
АТ к β^2 -гликопротеину, МЕ/мл	14,7±3,5	40,3±5,5*	44,8±4,9*
АТ к протромбину, МЕ/мл	3,9±1,8	7,9±1,9*	9,7±1,5*
АЕ к аннексину V, МЕ/мл	1,7±0,9	3,9±0,6*	4,1±0,7*
CD3 ⁺ , %	74,5±5,9	73,7±8,8	75,3±6,9
CD4 Т-хелперы, %	45,9±4,9	47,7±4,7	46,6±4,8
CD8 ⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), %	26,4±1,5	35,4±1,2*	34,5±3,2*
CD19 ⁺ (В-лимфоциты), %	9,9±0,7	6,9±1,2*	17,1±0,9*
CD16 ⁺ , CD56 ⁺ (NK-клетки), %	7,9±0,7	8,3±0,8	6,6±0,9*
Трег-клетки	8,10±1,10	3,25±0,29*	3,76±0,47*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

В периферической крови различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток доля Трег-клеток была значительно выше от общего количества CD4⁺-лимфоцитов у беременных с СПП и АФС. Значение данного показателя было достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем у беременных с физиологической гестацией (табл. 1). Существенных различий не было отмечено в группах, обследованных по содержанию CD3⁺ и CD4⁺, Т-лимфоцитов. В то

же время было установлено достоверное ($p < 0,05$) повышение содержания CD19⁺ клеток, несколько больший уровень CD8⁺ Т-лимфоцитов. Оценка содержания CD16⁺/CD56⁺ (NK-клеток) межгрупповых отличий не выявила.

После проведенных двух курсов иммунотерапии в первом и втором триместрах беременности сравнивали лабораторные показатели беременных I и II групп с контрольной группой (табл. 2).

Таблица 2

Показатели гемостазиограммы, уровней антител и иммунограммы в третьем триместре беременности после проведенной терапии

Показатели	Контрольная группа (n=25)	I группа (n=35)	II группа (n=28)
Тромбоциты, тыс.	325,6±8,8	280,0±20,5*	310,6±19,6
Степень агрегации, %	58,6±4,3	69,3±2,3*	64,7±2,1
Скорость агрегации, %/мин	61,5±3,2	68,5±3,3*	64,4±2,1
РКМФ, мг/%	4,7±0,5	5,4±0,8	4,8±0,6
ТАТ, мкг/мл	2,9±0,3	3,5±0,3	3,1±0,2
D-димер, мкг/мл	0,70±0,08	0,80±0,04	0,70±0,07
АФА (кардиолипидные антитела), г/л	2,6±0,8	8,1±1,2*	3,3±0,8
АТ к β^2 -гликопротеину, МЕ/мл	13,7±3,5	22,6±2,4*	15,4±1,6

Показатели	Контрольная группа (n=25)	I группа (n=35)	II группа (n=28)
АТ к протромбину, МЕ/мл	3,8±1,6	6,5±1,4*	3,1±1,1
АТ к аннексину V, МЕ/мл	1,9±0,8	3,4±0,9*	2,1±0,9
CD3 ⁺ , %	76,1±3,2	74,8±4,3	73,9±5,2
CD4 ⁺ (Т-хелперы), %	44,8±3,6	45,4±5,1	46,4±4,2
CD8 ⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), %	25,9±3,8	34,2±2,7*	26,6±2,2
CD19 ⁺ (В-лимфоциты), %	9,4±0,7	15,4±1,4*	10,2±1,2
CD16 ⁺ , CD56 ⁺ (NK-клетки), %	8,2±1,4	10,1±0,9*	8,9±1,2
Трег-клетки	6,46±0,83	3,63±0,76*	6,17±1,42

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Оценка показателей гемостазиограммы у обследуемых пациенток выявила ряд отличий, прежде всего в тромбоцитарном звене. Показатели приобрели значения, характерные для физиологической гестации. При этом необходимо отметить, что нормализация этих показателей быстрее происходила у обследуемых беременных II группы: количество тромбоцитов – (280,3±20,5) и (310,6±19,6) тыс.; степень агрегации – (69,3±3,8) и (64,7±2,1)%; скорость агрегации – (68,5±4,5) и (64,4±2,1)%/мин соответственно. Маркеры тромбофилии также приобретали нормальные показатели по отношению к контрольной группе быстрее у беременных II группы: РКМФ – (5,4±0,8) и (4,8±0,6) мг/%; ТАТ – (3,5±0,3) и (3,1±0,2) мкг/мл; D-димер – (0,80±0,04) и (0,70±0,07) мкг/мл соответственно.

Как видно из таблицы 2, если уровень АФА в I группе беременных составил (8,1±1,2) г/л, то у беременных II группы, получавших терапию ВВИГ, значение показателя было значительно меньше ($p < 0,05$) – (3,3±0,8) г/л. Уровень антител к β^2 -гликопротеину был достоверно ($p < 0,05$) меньше – (15,4±1,6) МЕ/мл по сравнению с беременными I группы – (22,6±2,4) МЕ/мл. Таким образом, лечение ВВИГ биовен моно приводило к троекратному снижению уровня этих антител. Уровень антител к аннексину V до начала лечения ВВИГ во II группе составил 4,2±0,7 МЕ/мл, а после проведенной терапии достоверно ($p < 0,05$) снизился до 2,1±0,9 МЕ/мл. Также достоверно ($p < 0,05$) снизился уровень антител к протромбину – с (9,7±1,5) до (3,1±1,1) МЕ/мл. У обследуемых беременных I группы обнаруживался волчаночный антикоагулянт, тогда как у пациенток II группы он не определялся.

Как представлено в таблице 2, после проведенного лечения было отмечено изменение уровня Трег-клеток у женщин, получивших ВВИГ биовен моно – его уровень возрос практически до такого в контрольной группе – (6,17±1,42)%, в то время

как у беременных I группы количество этих клеток оставалось прежним – (3,63±0,76)%.

Существенных различий не было отмечено в группах обследованных беременных по содержанию в периферической крови CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов. В то же время применение ВВИГ способствовало нормализации уровня В-лимфоцитов: их содержание у пациенток II группы снизилось до (10,2±1,2)% и было по-прежнему достоверно ($p < 0,05$) ниже такового в I группе беременных (15,4±1,4)%. Отмечено было также выраженное снижение уровня CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов – (26,6±2,2)%. Последнее было достоверно ($p < 0,05$) ниже такового у пациенток I группы – (34,2±2,7)%. Оценка содержания CD16⁺/CD56⁺ (NK-клеток) выявила, что после лечения ВВИГ биовен моно было зарегистрировано повышение содержания этих лимфоцитов у беременных до (10,9±1,2)%, что было достоверно ($p < 0,05$) выше соответствующего значения в I группе обследуемых – (8,1±1,2)%.

Оценка частоты и характера осложнений течения беременности у обследуемых женщин показала, что в первом и втором триместрах угроза прерывания беременности была отмечена у 9 (25,7%) беременных I группы, а у беременных II группы достоверно ($p < 0,05$) реже – у 4 (14,3%).

Наиболее частыми осложнениями в третьем триместре беременности являлись угроза преждевременных родов, плацентарная недостаточность. Отличия в структуре осложнений в группах обследуемых беременных были достоверными. Так, в 5 (14,2%) случаях у беременных I группы отмечалась угроза преждевременных родов, значение этого показателя было достоверно ($p < 0,05$) выше, чем во II группе, где угроза преждевременных родов была лишь у 2 (7,1%) пациенток. Достоверно ($p < 0,05$) чаще – в 9 (25,7%) случаях – у пациенток, которым проводили традиционную антикоагулянтную и антиагрегантную

терапию, чем во II группе – 3 (10,7%), проявлялось нарушение маточно-плацентарного кровотока.

Оценка новорожденных по шкале Апгар показала, что значение показателя 8-9 баллов было отмечено у 85,7% новорожденных у II группы обследуемых и у 77,1% – I группы.

Полученные данные свидетельствуют, что терапия ВВИГ биовен моно существенным образом влияет на течение беременности и родов у женщин с СПП, обусловленным наличием АФС, снижая частоту осложнений и улучшая перинатальные исходы. В ряде исследований было показано, что с помощью активной и пассивной иммунотерапии во многих случаях удается предотвратить у беременных с СПП и АФС тромбофилические осложнения, вызванные антифосфолипидными антителами [15]. Полученные нами данные согласуются с этими исследованиями: отмечены нормализация показателей системы гемостаза, значительное снижение уровней антифосфолипидных антител у пациенток, которые получали ВВИГ биовен моно. По-видимому, состояние свертывающей системы крови у беременных опосредовано иммуномодулирующим и противовоспалительным действием ВВИГ. Полагают, что в основе этих механизмов действия лежат:

- воздействие на иммунную систему с помощью идиотипических антител, содержащихся в этих препаратах;
- уменьшение выработки аутоантител в результате подавления активности В-клеток;
- нейтрализация аутоантител и аутоантигенов;
- частичное восстановление иммунного баланса;
- влияние на активность эндотелия;
- подавление воспалительных реакций за счет кратковременной ретикулоэндотелиальной блокады рецепторов и уменьшения высвобождения воспалительных медиаторов;
- уменьшение образования новых или элиминирование имеющихся осложнений иммунных комплексов [7, 10, 11].

По современным представлениям, в большинстве этих процессов участвуют Treg-клетки, что подтвердили и наши исследования. Было установлено, что применение препарата ВВИГ биовен моно способствовало нормализации баланса иммунокомпетентных клеток в периферической крови обследованных беременных, в частности продемонстрировано увеличение уровня Treg-клеток.

В ряде исследований показано, что применение иммуноглобулинов более эффективно у женщин с СПП, так как именно у них чаще определяется высокий уровень NK-клеток [9].

По мнению В. М. Сидельниковой (2005), показание для введения препаратов иммуноглобулинов определяется высоким уровнем лейкоцитоза со сдви-

гом формулы крови влево, повышенным уровнем NK-клеток в периферической крови и повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в крови или в слизи цервикального канала [4].

ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют, что одним из вероятных механизмов нормализующего действия ВВИГ является нормализация уровня T-регуляторных лимфоцитов у беременных с СПП и АФС.

2. Таким образом, подтверждение клинической эффективности используемого препарата служит основанием для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток, которые, очевидно, лежат в основе выявленных эффектов улучшения показателей гестационного процесса, родов и послеродового периода у женщин с антифосфолипидным синдромом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Линников В. И. Диагностика, принципы лечения и профилактики тромбофилических состояний, обусловленных первичным антифосфолипидным синдромом у беременных, рожениц и родильниц : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.01 / Линников Валерий Иванович ; Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии. – Москва, 2006. – 207 с.: ил.
2. Антифосфолипидный синдром – иммунная тромбофилия в акушерстве и гинекологии / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе, С. М. Баймурадова [и др.] ; под ред. А. Д. Макацария. – М. : Триада-Х, 2007. – 451 с. : ил. – Библиогр.: с. 443-451.
3. Сельков А. В. Методы определения содержания T-регуляторных клеток в периферической крови / А. В. Сельков., А. В. Селютин // Лабораторная диагностика. – 2008. – № 4. – С. 19–21.
4. Сидельникова В. М. Привычная потеря беременности / В. М. Сидельникова. – М. : Триада-Х, 2005. – 304 с.
5. Ярилин А. А. Регуляторные T-клетки, зависящие от фактора FOXP3, и перспективы их изучения при беременности / А. А. Ярилин, Ф. Д. Донецкова // Rus. J. Immunol. – 2005. – Vol. 9. – P. 149–152.
6. Branch D. W. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy / D. W. Branch., A. M. Peaceman, R. K. Silver // The Pregnancy Loss Study Group. Am J Obstet Gynecol. – 2000. – Vol. 182 (1Pt 1), Jan. – P. 122–127.
7. Carp H. Intravenous immunoglobulin and recurrent pregnancy loss / H. Carp, T. Sapir, Y. Shoenfeld // Clin. Rev. Allegy Immunol. – 2005. – Vol. 29, № 3. – P. 327–332.
8. Chen M. L. Regulatory T-cells suppress tumor-specific CD8 T-cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo / M. L. Chen., M. J. Pittet, I. Gorelik //

Proc. Nath. Acaci. Sci USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 409–424.

9. Christiansen O. D. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage / O. D. Christiansen // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 809–816.

10. Coulam C. D. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer / C. D. Coulam, R. G. Roussev // J. Ass. Reprod. Genet. – 2003. – Vol. 20. – P. 58–62.

11. Guerin L. R. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? / L. R. Guerin // Human Reproduction Update. – 2009. – Vol. 15, № 5. – P. 535–571.

12. Shoenfeld Y. IVIG therapy in autoimmunity and

related disorders our experience with a large cohort of patients / Y. Shoenfeld, U. Kutz // Autoimmunity. – 2005. – Vol. 38, № 2. – P. 123–137.

13. Stephenson M. Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial / M. Stephenson // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25, № 9. – P. 2203–2209.

14. Stricker R. B. Intravenous immunoglobulin therapy for immunologic abortion / R. B. Stricker, A. Stenleitner, E. E. Winger // Clin. Appl. Rev. – 2002. – Vol. 43. – P. 187–199.

15. Triolo G. IVIG in pregnancy / G. Triolo // Lupus. – 2004. – Vol. 13, № 9. – P. 731–736.

16. Tzronkowski P. CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells inhibit human cytotoxic activity of CTL and NK-cells in humans – impact of immunosensence / P Tzronkowski, E. Szit, E. Mysliwska // Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 119. – P. 307–312.