

МИКРОВЕЗИКУЛЯЦИЯ ПРИ ИММУНОКОНФЛИКТНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НОВОРОЖДЕННЫХ

А.Ф. Субханкулова, Д.М. Зубаиров, Ф.Б. Субханкулова, Б.Г. Садыков

*Кафедра биохимии (зав. — акад. АНТ, проф. Д.М. Зубаиров),
кафедра акушерства и гинекологии № 2 (зав. — проф. И.Ф. Фаткуллин)
Казанского государственного медицинского университета*

Гемолитическая болезнь плода и новорожденного (ГБН) при иммуноконфликтной беременности — наиболее частая причина перинатальной заболеваемости и смертности детей [7, 13]. Эта проблема до настоящего времени остается актуальной прежде всего в связи с отсутствием методов или средств, позволяющих устранять уже наступившую сенсибилизацию к антигену Rh. Частота ГБН довольно высокая (5:1000).

Действующим агентом в механизме иммунного гемолиза является комплемент, а антитела играют роль связывающего звена между комплементом и эритроцитами. При воздействии комплемента на сенсибилизированный эритроцит из клетки через поврежденную мембрану проходят ионы калия, фосфаты и рибонуклеотиды. Это ведет к расстройству ионного баланса клетки и к разрушению эритроцита. Образующиеся при некрозе и апоптозе фрагменты клеточных мембран способны замыкаться и образовывать пузырьки диаметром от 0,05 до 3,0 мкм. Размер микровезикул зависит от природы агента, воздействующего на клетку-мишень. Микровезикулы формируются в частности на клеточной поверхности эритроцитов, слущиваясь с цитоплазматической мембраны. Электронно-микроскопически было показано, что эти частицы представляют собой унламилярные микровезикулы со средним диаметром 0,2 мкм [14].

Приток кальция в эритроциты, вызванный ионофором [9] или опосредованный комплексом C5b-9 комплемента, равно как и в эндотелиальные клетки [10], ведет к частичной потере мембранной фосфолипидной асимметрии и экспонированию на поверхность прокоагулянтного фосфатидилсерина, сопровождаемому слущиванием микровезикул с соответствующего места плазматической мембраны. Обнаружение микровезикул осуществляется рядом ме-

тодов: путем ультрафильтрации, электронной микроскопии, иммунологическими методами, по гемскоагуляционной активности и активности 5'-нуклеотидазы.

Диагностика ГБН включает комплекс клинико-лабораторных исследований, проводимых в дородовом и послеродовом периодах. Одним из основных применений диагностической энзимологии в настоящее время является определение активности ферментов с целью обнаружения острого или хронического повреждения клеток. Например, лишь на наружной поверхности мембраны можно выявить активность 5'-нуклеотидазы [6].

5'-нуклеотидаза (5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.5) избирательно гидролизует эфирную связь в 5'-рибонуклеотиде с образованием рибонуклеозида и неорганического фосфата. Биохимические исследования этого энзима показали, что он является трансмембранным гликопротеином [11] и содержит фосфатидилинозитный якорь.

Интенсивность микровезикуляции по маркерному ферменту 5'-нуклеотидазе оценивали у 98 пациенток на протяжении беременности по триместрам, из них у 14 женщин с физиологически протекавшей беременностью (контрольная группа) и у 84 резус-изосенсибилизированных беременных. У рожениц контрольной группы родились здоровые дети, у резус-изосенсибилизированных беременных — дети с врожденной желтушной формой гемолитической болезни (32), с послеродовой желтушной формой (21), новорожденные с резус-отрицательной принадлежностью крови (16) и здоровые с резус-положительной принадлежностью крови (7). У 8 женщин на различных сроках беременности наступила внутриутробная гибель

плода (отежная форма ГБН и внутриутробная смерть с мацерацией).

Группы женщин (контрольная и основная) по возрасту, состоянию здоровья и перенесенным заболеваниям были идентичны. Различались они по репродуктивному анамнезу. Так, 6 из 14 женщин контрольной группы были первобеременными, все резус-изосенсибилизированные беременные — повторнородящими.

Исследования активности фермента показали, что 5'-нуклеотидаза в сыворотке крови у женщин контрольной группы во II триместре беременности составляла $63,82 \pm 8,34$ нкат/л, в III триместре — уже $80,93 \pm 8,91$ нкат/л, то есть прослеживалась тенденция к усилению микровезикуляции с нарастанием срока беременности. На рис. 1 представлены данные, полученные при исследовании активности фермента у 84 резус-изосенсибилизированных беременных.

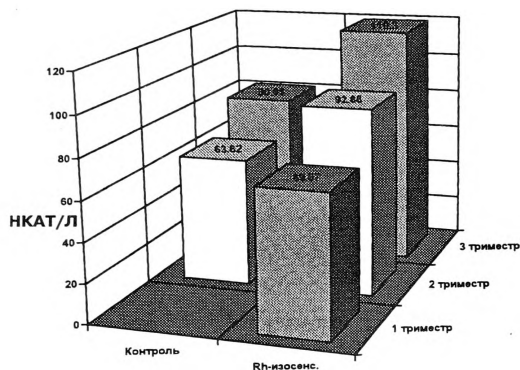


Рис. 1. Интенсивность микровезикуляции (активность маркерного фермента 5'-нуклеотидазы) в сыворотке крови при физиологической и резус-конфликтной беременности по триместрам.

Как видим по данным рис. 1, имеет место возрастание микровезикуляции на протяжении беременности с достижением максимума в III триместре, как и в контроле. При сравнении активности фермента при физиологически протекающей беременности (контрольная группа) и резус-изосенсибилизированной во II и III триместрах между ними выявлено различие ($P < 0,05$).

Приводим результаты активности 5'-нуклеотидазы в сыворотке крови у резус-изосенсибилизированных беременных в зависимости от исходов родов (табл. 1).

Таблица 1

Активность 5'-нуклеотидазы в сыворотке крови у резус-изосенсибилизированных беременных в зависимости от исходов родов (нкат/л)

Исходы родов	5'-нуклеотидазная активность у матерей	
	во II триместре беременности (19—31 нед)	в III триместре беременности (32—40 нед)
Новорожденные с резус-отрицательной принадлежностью крови	$94,9 \pm 7,1$	$102,2 \pm 7,6$
Новорожденные с послеродовой желтушной формой ГБН	$94,5 \pm 6,4$	$116,8 \pm 8,4$
Новорожденные с врожденной формой ГБН	$78,1 \pm 6,1$	$103,2 \pm 6,2$
Новорожденные с отежной формой ГБН	$86,2 \pm 7,4$	$121,0 \pm 7,3$

Наличие или отсутствие внутриутробного поражения, вынашивание резус-отрицательного плода не оказывают существенного влияния на процесс микровезикуляции в организме матери во время беременности. Однако и при таком анализе полученных результатов также прослеживается увеличение активности фермента с нарастанием срока беременности.

5'-нуклеотидазную активность в родах определяли у 62 рожениц, у 20 из них имело место физиологическое течение беременности и родов, у 32 — резус-конфликт, а у 10 резус-изосенсибилизированных женщин новорожденные родились с резус-отрицательной принадлежностью крови. Активность фермента в родах во всех группах не превышала нормы, в контрольной группе этот показатель был даже несколько выше (табл. 2), но у всех не превышал значений для лиц женского пола соответствующего возраста [4, 8].

Мы сравнили уровень микровезикуляции в родах с этим же показателем в III триместре беременности в соответствующих группах. По нашим данным, в 2 группах рожениц с резус-конфликтом (врожденная и послеродовая желтушная формы) и резус-изосенсибилизацией (вынашивающих резус-отрицательный плод) процесс протекал несколько слабее, чем в аналогичных группах. В контрольной же группе (при физиологическом течении беременнос-

ти и родов) в родах он был выше, чем в III триместре беременности (109,8 и 79,9 нкат/л соответственно).

Наши данные указывают на значительное, двукратное увеличение активности маркерного фермента микровезикуляции в ретроплацентарной крови у родильниц контрольной группы по сравнению с таковым в венозной крови у этих женщин в родах. Так, если в родах она была равна 109,8 нкат/л, то в ретроплацентарной крови — 224,5 нкат/л.

Активность маркерного фермента 5'-нуклеотидазы в сыворотке ретроплацентарной крови у изосенсибилизированных женщин, родивших новорожденных с резус-отрицательной принадлежностью крови, была в 5 раз выше, чем в сыворотке венозной крови рожениц (табл. 2). Из табл. 2 видно, что у изосенсибилизированных женщин, которые родили детей, впоследствии заболевших послеродовой желтушной формой ГБН, активность 5'-нуклеотидазы в сыворотке ретроплацентарной крови была в 4 раза выше, чем в венозной крови матерей в родах, а у женщин, родивших детей с признаками врожденной желтушной формы ГБН, активность фермента в сыворотке ретроплацентарной

крови более чем в 5 раз превышала таковую в сыворотке венозной крови.

Увеличение активности 5'-нуклеотидазы в ретроплацентарной крови у резус-конфликтных пациенток обеих групп ($P < 0,05$), видимо, зависит от процесса деструкции, неизбежно возникающего в конце беременности. При отделении последа от стенок матки в III периоде родов образуется ретроплацентарная гематома, составляющая основу изливающейся затем ретроплацентарной крови, в которую поступает большое количество микровезикул из клеточных мембран. При резус-конflikте деструктивные явления более выражены [1, 2, 3, 5].

Активность 5'-нуклеотидазы в ретроплацентарной крови резус-иммунизированных родильниц, отражающая микровезикуляцию, позволяет объективно оценивать этот процесс.

Основным методом лечения тяжелых форм ГБН является заменное переливание крови (ЗПК). Его преимущество заключается в устранении главной причины болезни — гемолиза эритроцитов плода путем выведения поврежденных клеток, антител, способствующих гемолизу, и токсичного непрямого билирубина. Мы сравнили активность 5'-нуклеотидазы со значениями непрямого билирубина в сыворотке пуповинной крови в группах новорожденных (см. рис. 2). По нашим данным, нормальному уровню непрямого билирубина (61 мкмоль/л) в пуповинной крови здоровых новорожденных соответствует нормальная активность 5'-нуклеотидазы ($90,01 \pm 6,14$ нкат/л). У здоровых детей с резус-отрицательной принадлежностью крови он составил $74,47 \pm 7,12$ нкат/л, а у новорожденных с послеродовой желтушной формой ГБН — $80,56 \pm 7,77$ нкат/л. При врожденной желтушной форме гемолитической болезни уровни непрямого билирубина и 5'-нуклеотидазы в сыворотке пуповинной крови были повышены приблизительно в 2 раза. Коэффициент корреляции между этими показателями составил 0,42 ($P < 0,05$). Причина усиленной микровезикуляции при гемолитической болезни новорожденных очевидна. Фиксация антител на резус-положительных эритроцитах ведет к формированию и активации мембраноатакующего комплекса C5b-9 компонента.

Таблица 2

5'-нуклеотидазная активность в родах при физиологической и резус-конфликтной беременности (нкат/л)

Исходы родов	Сыворотка крови рожениц	
	венозная	ретроплацентарная
У здоровых рожениц здоровые новорожденные (контрольная группа)	109,8±7,4	224,5±9,8
У рожениц с изосенсибилизацией новорожденные с резус-отрицательной принадлежностью крови	98,8±10,4	483,5±19,8 $P_{2-4} < 0,05$
У рожениц с резус-конфликтом новорожденные с послеродовой желтушной формой ГБН	101,3±9,4	414,3±16,2 $P_{3-4} < 0,05$
с врожденной желтушной формой ГБН	79,9±7,3	433,5±18,3 $P_{1-4} < 0,05$

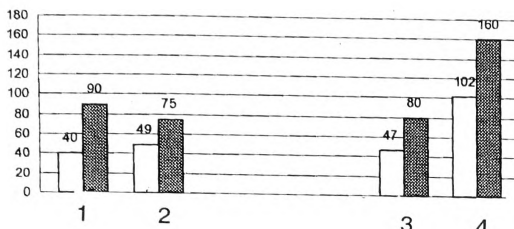


Рис. 2. Соотношение уровня билирубина (мкмоль/л) и активности 5'-нуклеотидазы (нкат/л) в пуповинной крови новорожденных при различных исходах родов. Обозначения: незаштрихованные столбцы — непрямого билирубин, заштрихованные — 5'-нуклеотидаза; 1 — здоровые новорожденные (контрольная группа), 2 — новорожденные с резус-отрицательной принадлежностью крови, 3 — с послеродовой желтушной формой гемолитической болезни, 4 — с врожденной желтушной формой.

Активность 5'-нуклеотидазы определяли у новорожденных с гемолитической болезнью также в процессе выполнения ЗПК. Эти исследования были проведены у 14 новорожденных при ЗПК от одного до 3 раз. У всех к началу первого ЗПК имел место почасовой прирост непрямого билирубина. У 11 из 14 детей активность 5'-нуклеотидазы к началу первого ЗПК также возрасла (179,6 нкат/л). 7 из 14 новорожденных было проведено по два ЗПК. К моменту окончания второго ЗПК у всех детей активность 5'-нуклеотидазы не выявлялась. Исчезновение ее активности в наших наблюдениях отражает, по-видимому, не отсутствие микровезикул, а ингибирование фермента стабилизатором крови цитратом, связывающим Ca^{2+} (5'-нуклеотидаза — Ca^{2+} -зависимый фермент). Уровень же непрямого билирубина у новорожденных оставался повышенным еще в течение 1—3 суток и был в пределах, не требующих ЗПК.

ВЫВОДЫ

1. В крови женщин по мере нарастания срока беременности усиливается процесс микровезикуляции клеточных мембран.

2. При резус-конфликтной беременности процесс микровезикуляции более интенсивен, чем при физиологически протекающей беременности.

3. При внутриутробном поражении плода гемолитической болезнью (врожденная желтушная форма) наряду с повышением уровня непрямого билирубина в сыворотке крови резко усиливается процесс микровезикуляции.

4. Определение активности 5'-нуклеотидазы при гемолитической болезни новорожденных можно использовать в качестве дополнительного метода диагностики микровезикуляции при этой патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейсенбаева М.Г.// Здравоохран. Казахстана. — 1971. — № 1. — С. 41—42.
2. Гриценко И.И., Шилейко В.А. Взаимоотношения организмов матери и плода в условиях несовместимости их по резус-фактору. — М., 1972.
3. Гуревич П.С. и др.// Педиатрия. — 1988. — № 6. — С. 10—14.
4. Зубаиров Д.М., Андрушко Н.А. Способ оценки тромбопластинемии по определению активности маркерного фермента 5'-нуклеотидазы. / Методические рекомендации. — Казань, 1987.
5. Мартынова Н.Н., Колесников С.Н. Научные труды Новосибирского медицинского института. — 1975. — Т. 61. — С. 48—48.
6. Невилл мл. Получение фракций, обогащенных поверхностными клеточными мембранами. / В кн. Биохимическое исследование мембран. Под ред. Э.М. Мэдди. Ред. пер. Н.В. Збарский. — М., 1979.
7. Савельева Г.И. I Республиканский съезд акушеров-гинекологов и педиатров: Тезисы докладов. — Казань, 1988.
8. Юсупова А.Н. Клиническое значение оценки внешнего пути свертывания крови с помощью определения 5'-нуклеотидазы для диагностики тяжести позднего токсикоза беременных: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Казань, 1987.
9. Allan D., Mitchell R.H.//Nature. — 1975. — Vol. 258. — P. 348.
10. Hamilton K.K., Hattori R., Esmon C.T., Sims P.J.//J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265. — P. 3809.
11. Lachowsky A., Evans V., Parat A.// Biochem. biophys. Acta. — 1981. — Vol. 644. — P. 121—126.
12. Orford M.R., Saggerson E., David I.// Neurochem. — 1996. — Vol. 67. — P. 795—804.
13. Tovey L.A.D.// Brit. J. Obstet. Gynaecol. — 1986. — Vol. 9. — P. 960—966.
14. Zwaal R.F.A., Confurius P., Bevers E.M.// Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1180. — P.1.

Поступила 14.09.98.

MICROVESICULATION IN IMMUNOCONFLICT PREGNANCY AND HEMOLYTIC DISEASE OF NEWBORNS

A.F. Subkhankulova, D.M. Zubairov,
F.B. Subkhankulova, B.G. Sadykov

S u m m a r y

The microvesiculation process of cell membranes increases in blood of women during pregnancy development. In women with Rh-conflict pregnancy the course of the microvesiculation process is more intensive than in physiologic pregnancy. In intratubal affection of the fetus by hemolytic disease (the congenital icteric form) the microvesiculation process increases sharply in blood serum parallel to the increase of unconjugated bilirubin level. The determination of 5'-nucleotidase activity in hemolytic disease of newborns can be used as an additional diagnosis method of microvesiculation in this pathologic state.