

Тромботические и геморрагические риски у беременных женщин

*Колосков А.В.,^{1,2} Батурина О.А.,¹ Лыцев А.А.,³ Филиппова О.И.,^{1,2} Столица А.А.,²
Целикова Е.В.,² Бессмельцев С.С.⁴*

¹ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, кафедра трансфузиологии

191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, т. (812) 415-19-17
avkoloskov@inbox.ru

² ГБУЗ «Городская больница № 26»

196247, Россия, Санкт-Петербург, ул. Костюшко, д. 2, т. (812) 375-30-10
milidoctor@mail.ru

³ ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»

197110, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3, т. (812) 235-01-10
laa0209@mail.ru

⁴ ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
193024, Россия, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16, т. (812) 274-66-40,
bloodscience@mail.ru

Резюме: В период беременности происходят значительные изменения состояния свертывающей системы крови, которые могут приводить к тромботическим и/или геморрагическим осложнениям. Клинические проявления патологии системы гемостаза в период гестации во многом зависят от особенностей свертывающей системы крови у пациентки до беременности, наследственной предрасположенности, реакции на изменения гормонального фона и сопутствующей патологии. С целью выявления возможных корреляционных связей мы провели сопоставление результатов молекулярно-генетических исследований у женщин, обращавшихся за гематологической помощью во время беременности, с жалобами, свидетельствующими о нарушениях свертывающей системы крови, а также с результатами исследования агрегационной способности

тромбоцитов. Объектом исследования явились 42 беременные женщины в возрасте от 23 до 40 лет, обратившиеся за медицинской помощью в амбулаторный гематологический центр во 2 триместре беременности. По результатам генетического исследования все пациентки были разделены на три группы: пациентки с мутацией в гене фактора V (Arg506Gln), пациентки с мутацией в гене протромбина (G20210A) и пациентки, не имеющие указанных мутаций. По результатам исследования сделаны выводы: 1. Для выявления возможных нарушений свертывающей системы крови не следует использовать молекулярно-генетические исследования в отрыве от анализа клинической картины (наличие тромботического или геморрагического диатеза), результатов исследования показателей тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза. 2. Наличие у пациента гетерозиготной мутации гена фактора V (Arg506Gln) или гетерозиготной мутации гена протромбина (G20210A) не исключает реализацию у индивидуума геморрагического фенотипа вследствие доминирования коагулопатического расстройства свертывающей системы крови.

Ключевые слова: наследственная тромбофилия, мутация гена фактора V (Arg506Gln), мутация гена протромбина (G20210A), болезнь Виллебранда

Thrombotic and hemorrhagic risks for pregnant women

Koloskov A.V., ^{1,2} Baturina O.A., ¹ Lyshchev A.A., ³ Philippova O.I., ^{1,2} Stolitsa A.A., ² Tselikova E.V., ² Bessmeltsev S.S. ⁴

¹ *SBIHE «Nord-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov under the Ministry of Public Health and Social Affairs of Russian Federation», St.Petersburg, Russia*

² *City Hospital № 26, St.Petersburg, Russia*

³ *City Clinical Hospital № 31, St.Petersburg, Russia*

⁴ *FSBI «Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of FMBA Russia», St.Petersburg, Russia*

Abstract: During pregnancy there are significant changes in the state of coagulation, which can lead to thrombotic and / or hemorrhagic complications. Clinical manifestations of pathology of

the hemostatic system in the period of gestation is largely dependent on the characteristics of the blood coagulation system in the patient prior to pregnancy, genetic predisposition, response to hormonal changes and comorbidity. In order to identify possible correlations, we have compared the results of molecular genetic studies of women who attended the hematology care during pregnancy, with complaints suggestive of blood coagulation disorders, as well as with the results of platelet aggregation. The object of the study were 42 pregnant women aged 23 to 40 years, seek medical care in outpatient hematology center in the 2nd trimester of pregnancy. According to the results of genetic studies, all patients were divided into three groups: patients with a mutation in the gene for factor V (Arg506Gln), a patient with a mutation in the prothrombin gene (G20210A) and patients without these mutations. The study conclusions: 1. To identify possible violations of the blood coagulation system should not be used molecular genetic studies in isolation from the analysis of the clinical picture (the presence of thrombotic or hemorrhagic diathesis), the study results indicators platelet and plasma hemostasis . 2 . If the patient has a heterozygous mutation of factor V (Arg506Gln) or heterozygous prothrombin gene mutation (G20210A) does not preclude the implementation of the individual hemorrhagic phenotype due to the dominance of coagulopathic disorders of blood coagulation .

Keywords: inherited thrombophilia, mutation of factor V (Arg506Gln), prothrombin gene mutation (G20210A), von Willebrand disease

В период беременности в организме женщины происходят значительные изменения состояния свертывающей системы крови, которые могут приводить к тромботическим и/или геморрагическим осложнениям. Клинические проявления патологии системы гемостаза в период гестации во многом зависят от особенностей свертывающей системы крови у пациентки до беременности, наследственной предрасположенности, реакции организма женщины на изменения гормонального фона, сопутствующей патологии. Клиническая значимость изменений системы гемостаза, происходящих во время беременности и родов, определяет неослабевающее внимание исследователей и практикующих врачей к данной проблеме.

В настоящее время для исследования системы гемостаза доступно множество лабораторных методов, позволяющих получить информацию, характеризующую отдельные звенья свертывающей системы крови, в том числе, и на молекулярном уровне. Однако не все применяемые лабораторные методики одинаково информативно отражают

состояние свертывающей системы крови и нередко полученные результаты вызывают затруднение в клинической (диагностической) интерпретации. Нам представляется уместным привести афоризм известного немецкого ученого Рудольфа Вирхова - «чем больше увеличение, тем хуже видно». Зачастую результаты лабораторных исследований не коррелируют с текущей клинической картиной, что может приводить к неправильной оценке (диагностическим ошибкам) состояния системы гемостаза у беременных женщин. Диагностические ошибки, в свою очередь, могут приводить к назначению непоказанных, а иногда и вовсе противопоказанных лекарственных препаратов [1]. Тем не менее, большинство диагностических проблем, связанных с оценкой свертывающей системы крови, обусловлено объективными трудностями в диагностике нарушений системы гемостаза. С целью выявления возможных корреляционных связей мы провели сопоставление результатов молекулярно-генетических исследований у женщин, обратившихся за гематологической помощью во время беременности, с жалобами, свидетельствующими о нарушениях свертывающей системы крови, а также с результатами исследования агрегационной способности тромбоцитов.

Материалы и методы.

Объектом исследования явились 42 беременные женщины в возрасте от 23 до 40 лет, обратившиеся за медицинской помощью в амбулаторный гематологический центр во 2 триместре беременности.

Гематологическое обследование пациенток выполнялось по стандартной процедуре [2] и включало сбор жалоб, сбор анамнеза, объективный осмотр, оценка имеющихся результатов лабораторных исследований и назначение дополнительных лабораторных исследований.

Для оценки функционального состояния тромбоцитов у беременных женщин исследовалась их агрегационная способность по методу Борна с помощью анализатора агрегации тромбоцитов АТ-02 (Россия). Метод основан на непрерывном измерении изменения коэффициента светопропускания перемешиваемой и термостатируемой суспензии тромбоцитов, происходящего под действием агрегирующего агента.

Забор крови выполнялся у пациенток в утренние часы после легкого завтрака (жирные продукты исключались). С целью исключения контактной активации

тромбоцитов все манипуляции с пробой крови проводились в пластиковой или силиконированной лабораторной посуде (пробирки, кюветы, пипетки).

Кровь получали путём пункции локтевой вены сухой острой иглой без шприца. Для создания кратковременного венозного стаза на плечо пациентки накладывался жгут. Для исключения активации тромбоцитов при прохождении через иглу использовались одноразовые стерильные иглы длиной не более 50 мм и с широким просветом (не менее 0,9 мм). После пункции локтевой вены, первые капли крови оставляли на ватном тампоне, чтобы избежать попадания в пробирку тканевого тромбопластина, выделяющегося в момент прокола тканей. Свободно вытекающую кровь собирали в пробирку, перемешивая с антикоагулянтом (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1 часть антикоагулянта к 4 частям крови) не допуская образования воздушных пузырьков.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы, стабилизированную кровь центрифугировали 10 минут при комнатной температуре и скорости 1000 об/мин (150g). Часть богатой тромбоцитами плазмы отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови получают бестромбоцитную плазму центрифугированием при комнатной температуре в течение 20 мин при 4000 об/мин (2300g). Бестромбоцитная плазма использовалась для калибровки шкалы оптической плотности агрегометра и для разведения богатой тромбоцитами плазмы до стандартного уровня концентрации тромбоцитов $200-250 \times 10^9/\text{л}$.

Исследование выполняли в срок, не превышающий 1 час с момента забора крови. В качестве агрегирующих агентов использовались АДФ, коллаген и ристомин.

Первичную (обратимую) агрегацию тромбоцитов оценивали по реакции на добавление к плазме пороговой дозы АДФ. Пороговая доза агрегирующего агента подбиралась как минимальная доза, вызывающая агрегацию тромбоцитов у подавляющего большинства доноров. Тромбоциты после дезагрегации остаются жизнеспособными, но на некоторое время (30 – 60 мин) теряют способность повторно агрегировать. О характере секреции (реакции высвобождения) свидетельствует величина II волны агрегации. АДФ, добавляемая в оптимальной конечной концентрации, вызывает двуволновую необратимую агрегацию тромбоцитов, II волна вызывается высвобождением из кровяных пластинок эндогенных агонистов и её отсутствие у испытуемого свидетельствует о серьёзном нарушении тромбоцитарной секреции.

Также для изучения характера секреции использовали исследование агрегации тромбоцитов под влиянием суспензии коллагена в оптимальной концентрации. За оптимальную принималась такая концентрация коллагена, которая при добавлении в количестве 1 часть суспензии к 9 частям стандартизованной тромбоцитарной плазмы донора, вызывает падение оптической плотности тромбоцитарной плазмы на 50%. Сам коллаген не является агрегирующим агентом в строгом смысле этого слова. Коллагеновая агрегация совершается исключительно под влиянием АДФ и других эндогенных индукторов высвободившихся из плотных гранул хранения части тромбоцитов, адгезировавших к фибриллам коллагеновой суспензии.

Для оценки адгезивных свойств использовали исследование с ристомицином. Ристомицин, так же как и структуры субэндотелия, активирует участвующих в процессе адгезии тромбоцитарный рецептор GP Ib и фактор Виллебранда плазмы. Величина I волны ристомициновой агрегации, отражает процесс агглютинации тромбоцитов под влиянием антибиотика ристомицина в концентрации 1,0-1,5 мг/мл (концентрацию раствора подбирали таким образом, чтобы с донорской плазмой получалась двуволновая необратимая агрегация). II волна агрегации с ристомицином отражает процесс секреции тромбоцитов.

В исследование были включены пациентки, у которых для исследования полиморфизмов генов системы гемостаза использовался метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в полиакриламидном геле. Учитывались результаты тестирования гена фактора V (Arg506Gln) (Лейденская мутация) и протромбина (G20210A) которые, согласно общепринятой концепции [3], входят в понятие «наследственная тромбофилия».

На основании результатов генетического исследования все пациентки были разделены на три группы: имеющие мутацию в гене фактора V (Arg506Gln), имеющие мутацию в гене протромбина (G20210A) и не имеющие указанных мутаций.

Результаты.

В первую группу включено 12 пациенток в возрасте от 24 до 40 лет (среднее $28 \pm 3,2$ лет) из них 11 являлись носителями гетерозиготной мутации Лейден, а у одной пациентки имела место гомозиготная мутация Лейден.

Тромботический анамнез (тромбоз глубоких вен бедра) зафиксирован в двух наблюдениях: в одном случае носительства гомозиготной мутации Лейден (пациентка 23 лет, развитие тромбоза на фоне беременности, потребовалась установка фильтра в систему нижней полой вены, постоянная антикоагулянтная терапия низкомолекулярным гепарином, рецидива тромбоза не было) и в одном случае носительства гетерозиготной мутации Лейден (развитие тромбоза в возрасте 30 лет, за 3 года до беременности, на фоне беременности проводилась профилактика с использованием низкомолекулярного гепарина, рецидива тромбоза не было). В обоих случаях беременность протекала без патологии со стороны матери или плода и завершилась в срок рождением живого младенца без признаков патологии.

Геморрагический анамнез отмечался у четырех пациенток с носительством гетерозиготной мутации Лейден (во всех случаях имел место геморрагический диатез петехиально-пятнистого типа со склонностью к спонтанному появлению синячков диаметром от 1 до 3 см., явлениями гиперполименорреи и у одной пациентки, в дополнение к указанным проявлениям, в детстве отмечались носовые кровотечения, требовавшие обращения за медицинской помощью (передняя тампонада носа)). Нарушение (снижение) агрегационной способности тромбоцитов со всеми тестовыми реагентами (АДФ, ристомидин, коллаген) было выявлено у трех пациенток (в том числе у пациентки с наиболее выраженными проявлениями геморрагического диатеза). При этом никто из данных пациенток не получал какой-либо дезагрегантной или антикоагулянтной терапии. Нормальные показатели агрегатограммы имели место у одной пациентки с проявлениями геморрагического диатеза. Во всех случаях имело место неосложненное течение беременности, завершившиеся срочными родами здоровым ребенком.

При дополнительном обследовании пациентки с выраженными проявлениями геморрагического диатеза и нарушением агрегации тромбоцитов, выполненном через 5 месяцев после родоразрешения (с физиологической кровопотерей), выявлено снижение активности фактора Виллебранда до 32% и снижение активности фактора VIII до 40%.

В шести наблюдениях у пациенток с носительством гетерозиготной мутации Лейдена каких-либо проявлений геморрагического и/или тромботического диатеза не наблюдалось, показатели агрегации тромбоцитов также не выявили значимых отклонений

от нормальных величин. Во всех случаях беременность у женщин протекала нормально и закончилась срочными родами.

Во вторую группу включено 10 пациенток в возрасте от 25 до 37 лет (среднее 28,7 ± 2,4 лет), носительниц гетерозиготной мутации гена протромбина. Тромботический анамнез и актуальные тромбозы отсутствовали во всех проанализированных случаях.

Геморрагический анамнез отмечался у четырех пациенток с носительством гетерозиготной мутации гена протромбина. Две пациентки отмечали носовые кровотечения в детском возрасте, спонтанное возникновение синячков диаметром от 1 до 3 см. и явления гиперполименорреи. Еще у двух пациенток, помимо перечисленных проявлений геморрагического диатеза отмечались кровотечения после удаления зуба. Во всех случаях при выполнении исследования функционального состояния тромбоцитов было выявлено снижение агрегационной способности тромбоцитов со всеми тестовыми реагентами (АДФ, ристомицин, коллаген). У всех женщин имело место неосложненное тромботическими событиями течение беременности, завершившиеся срочными родами здоровым младенцем.

При дополнительном обследовании пациентки с геморрагическим диатезом в виде спонтанной синячковости, носовых кровотечений, гиперполименорреи и кровотечением после удаления зуба (и лабораторно определяемом снижении агрегационной способности тромбоцитов), выполненном через 6 месяцев после родов, было выявлено снижение активности фактора Виллебранда до 35% и снижение активности фактора VIII до 30%. Еще у одной пациентки с геморрагическим диатезом в виде спонтанно образующихся синячков, носовых кровотечений и гиперполименорреи (и лабораторно определяемом снижении агрегационной способности тромбоцитов) при оценке активности фактора Виллебранда и фактора VIII, выполненной через 7 месяцев после родов, выявлено их снижение до уровня 42% и 44%, соответственно. В обоих случаях объем кровопотери в родах (на основании выписки из учреждения родовспоможения) составлял около 800 мл.

У пяти пациенток с носительством гетерозиготной мутации гена протромбина геморрагический анамнез отсутствовал, и при лабораторном исследовании агрегационной способности тромбоцитов не было выявлено нарушения их функционального состояния.

В одном наблюдении у пациентки без признаков геморрагического диатеза было выявлено снижение агрегационной способности тромбоцитов с АДФ и коллагеном.

В третью группу было включено 20 пациенток в возрасте от 24 до 38 лет (среднее $28,1 \pm 2,3$ лет), не имеющих мутаций в гене фактора V и в гене протромбина. Поводом для направления на консультацию к врачу-гематологу у этих пациенток послужило выявление при генетической диагностике, назначенной врачом акушером-гинекологом, гомо и/или гетерозиготной мутации в гене тромбоцитарного рецептора GPIa и/или гомо и/или гетерозиготной мутации в гене тромбоцитарного рецептора GPIIb. Как известно [3], данные мутации не входят в понятие «наследственные тромбофилии». Тромботический анамнез и актуальные тромбозы отсутствовали во всех проанализированных случаях.

Геморрагический анамнез отмечался у шести пациенток из данной группы. Четыре пациентки отмечали носовые кровотечения в детском возрасте, спонтанное возникновение синячков диаметром от 1 до 3 см. и явления гиперполименорреи. Еще у двух пациенток, помимо перечисленных проявлений геморрагического диатеза отмечались кровотечения при ранениях. Во всех случаях при выполнении исследования функционального состояния тромбоцитов было выявлено снижение агрегационной способности тромбоцитов со всеми тестовыми реагентами (АДФ, ристомин, коллаген). Во всех наблюдениях беременность протекала без осложнений и завершилась срочными родами здоровым ребенком. В двух случаях объем кровопотери в родах (по данным медицинских документов из учреждений родовспоможения) составлял около 800 мл.

У 14 пациенток из данной группы геморрагический анамнез отсутствовал, и при лабораторном исследовании агрегационной способности тромбоцитов не было выявлено нарушения их функционального состояния. Все женщины данной группы не имели каких-либо осложнений во время беременности и родов.

Обсуждение и выводы.

Выявление при случайном обследовании гетерозиготных мутаций гена фактора V и в гене протромбина не является уникальным событием, что соответствует хорошо известным данным о частоте встречаемости этих мутаций с частотой 2 – 7% и 2 %, соответственно. Гомозиготные мутации встречаются принципиально реже [4].

Мутации гена фактора V (Arg506Gln) и гена протромбина (G20210A) традиционно включены в понятие «наследственные тромбфилии». Не вызывает сомнения, что наличие данных генетических особенностей у индивидуумов повышает вероятность тромботических событий, но, в тоже время, этот риск не является абсолютным [3,4]. Как показали результаты выполненного исследования наличие гетерозиготной мутации мутации в гене фактора V (Arg506Gln) и гетерозиготной мутации в гене протромбина (G20210A) не исключает наличие у индивидуума геморрагического фенотипа, реализуемого в форме геморрагического диатеза петехиально-пятнистого типа. У пациенток с проявлениями геморрагического диатеза при выполнении исследования функционального состояния тромбоцитов обнаружено снижение агрегационной способности тромбоцитов при использовании в качестве тестовых реагентов АДФ, ристомидина и коллагена. Хочется отдельно подчеркнуть, что снижение агрегационной способности тромбоцитов было выявлено у пациенток во втором триместре беременности, не смотря на то, что в этот период беременности в норме должна иметь место физиологическая гиперкоагуляция. Более того, у одной пациентки с гетерозиготной мутацией гена фактора V (Arg506Gln) и у двух пациенток с гетерозиготной мутацией гена протромбина (G20210A) при выполнении обследования в послеродовом периоде (в среднем через 6 месяцев после родов) было выявлено снижение активности факторов Виллебранда (32%, 35% и 42%, соответственно) и снижение активности фактора VIII (40%, 30%, 44%), что, как минимум, не позволяет исключить у пациенток болезни Виллебранда 1 типа [1].

Таким образом, нам представляется логичным сделать следующие выводы:

1. Для выявления возможных нарушений свертывающей системы крови не следует использовать молекулярно-генетические исследования в отрыве от анализа клинической картины (наличие тромботического или геморрагического диатеза), результатов исследования показателей тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза.

2. Наличие у пациентов гетерозиготной мутации гена фактора V (Arg506Gln) или гетерозиготной мутации гена протромбина (G20210A) не исключает реализацию у индивидуума геморрагического фенотипа вследствие доминирования коагулопатического расстройства свертывающей системы крови.

Носят ли выявленные взаимоотношения устойчивый характер – покажут дальнейшие исследования.

Список литературы.

1. Колосков А.В., Столица А.А., Филиппова О.И. Болезнь Виллебранда у женщин // MEDLINE.RU: сетевой журнал. - 2013. - Том 14. - С. 113 – 134. Режим доступа: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art10.html>, свободный
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии: в 2 томах, т.2., - М., «Медицина» - 1985. – 368 с.
3. Bates S., Greer I.A., Middeldorp S. et al. VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines // Chest. – 2012. – 141 (Suppl). - P. e691S–e736S.
4. **Wu O., Robertson L., Twaddle S., et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis.** The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of **Thrombophilia Screening** (TREATS) study // **Health Technol. Assess.** – 2006. - 10(11). – P. 1-110.