

УДК 618.3-008.6:614.8.026.1:575.113:612.115

© Т. А. Лоскутова, К. В. Воронин, 2011.

РИСК ПРЕЭКЛАМПСИИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Т. А. Лоскутова, К. В. Воронин

Кафедра акушерства и гинекологии (зав. кафедрой – проф. В. А. Потапов),
Днепропетровская государственная медицинская академия, г. Днепропетровск.

RISK OF PRE-ECLAMPSIA IN PREGNANT WOMEN WITH COAGULATION GENES POLYMORPHISM T. A. Loskutova, K. V. Voronin

SUMMARY

It was analyzed the frequencies allelic variants genes of hemostasis system in pregnant women with preeclampsia. Hereditary defects of hemostasis were found in 41.9% of women with mild preeclampsia and in 44% with severe preeclampsia, in the structure were prevailed defects that cause the reduction of fibrinolytic activity. The presence of genetic forms of thrombophilia, especially multigenic forms is an additional risk factor for preeclampsia and can cause more severe forms of preeclampsia.

РИЗИК ПРЕЕКЛАМПСІЇ У ВАГІТНИХ З ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ ЗГОРТАЮЧОЇ СИСТЕМИ Т. О. Лоскутова, К. В. Воронін

РЕЗЮМЕ

В дослідженні був проведений аналіз частот алельних варіантів генів системи гемостазу у вагітних з преєклампсією. Спадкові дефекти гемостазу були виявлені у 41,9% жінок з преєклампсією легкого ступеню і у 44,0% з преєклампсією середнього і важкого ступеню, в структурі переважали дефекти, що обумовлюють зниження фібринолітичної активності. Наявність генетичних форм тромбофілії, особливо мультигенних форм є додатковим фактором ризику розвитку преєклампсії та перебігу її в більш важкій формі.

Ключевые слова: беременность, преэклампсия, полиморфизм генов, система гемостаза.

Данные литературы свидетельствуют о неуклонном росте частоты преэклампсии. Несмотря на стремительный рост медицинских технологий, в мире от преэклампсии ежегодно умирает до 50000 женщин [6]. Поиск молекулярных маркеров, ассоциированных с развитием преэклампсии – важная задача для понимания патогенеза, лечения и профилактики заболевания. В основе развития преэклампсии (ПЭ) лежит эндотелиальная дисфункция, именно полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции и сосудистой системы может объяснить индивидуальные различия в происхождении и течении заболевания [1, 4]. Существуют гены-кандидаты способные увеличивать риск преэклампсии или выполнять защитную функцию. Наличие генетических форм тромбофилии проявляется в повышенном тромбообразовании и сопряжено с развитием акушерских осложнений, в частности преэклампсии [1, 3, 4]. Наследственные формы тромбофилии могут быть обусловлены полиморфизмом -455G>A гена фибриногена, который кодирует β-субъединицу фибриногена (FGB). Результатом замены G на A в гене FGB является повышенный уровень фибриногена и усиленное тромбообразование. К повышенному тромбообразованию приводят также мутации в системе фибринолиза. Установлено, что ингибитор активатора плазминогена I типа (PAI 1) является од-

ним из основных регуляторов фибринолитических реакций в крови. Полиморфный вариант 4G приводит к повышенной экспрессии гена и, соответственно, повышенному уровню PAI-1 в крови, в результате чего происходит снижение активности фибринолиза и повышается риск развития тромбообразования [7]. Целью настоящего исследования явилось проведение анализа частот алельных вариантов генов свертывающей системы у беременных с преэклампсией, изучение ассоциации проанализированных молекулярных маркеров со степенью тяжести заболевания, а также с параметрами гемостаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для реализации поставленной цели были обследованы 92 женщины в третьем триместре беременности. I исследуемую группу составили 31 беременная с гестационной артериальной гипертензией и преэклампсией легкой степени, II группу – 25 беременных с преэклампсией средней и тяжелой степени. Контрольную группу (K) сформировали 36 здоровых беременных. Беременные были распределены по группам на основании величины артериального давления, уровня протеинурии, дополнительных осложнений и в соответствии с клиническим протоколом МЗ Украины №676. Определение алельных вариантов гена FGB 455G>A и PAI 1 типа 5G/4G

проводили с помощью аллельспецифической полимеразной цепной реакции, с последующей детекцией методом электрофореза в 3% агарозном геле. Использовался комплект реагентов «SNP-экспресс» производства НПФ «Литех» (Россия). Геномная ДНК выделялась с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» («Литех», Россия).

Определение количества форменных элементов крови проводилось на автоматическом анализаторе. Исследование функциональной активности тромбоцитов и активности фактора Виллебранда проводили на агрегометре AP 2110 «СОЛАР» (Белоруссия) с графической регистрацией интенсивности и динамики агрегации тромбоцитов при перемешивании их со стимуляторами агрегации адреналином и ристоцетином, определением скорости агрегации тромбоцитов за 30 с (%/мин), степени агрегации, времени достижения максимальной агрегации. Определение протромбинового индекса (ПИ), активированного времени рекальцификации (АВР), фибриногена проводили на автоматическом коагулометре Amelung Coagulometr KC 4A. Определение естественного лизиса сгустка и ретракции фибринового сгустка определяли по методу М.А. Котовщиковой и Б.И. Кузник [2]. Для диагностики внутрисосудистого свертывания крови определяли растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) фенантролиновым тестом с помощью диагностикума «РФМК-тест» фирмы Технология Стандарт (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Беременные были равномерно распределены в группах по возрасту. В I группе средний возраст составил $28,3 \pm 1,1$, во II группе – $26,2 \pm 1,0$ и в контрольной – $26,0 \pm 0,9$ лет ($p > 0,05$). Количество первородящих в I группе было 58%, во II группе – 68% и в контрольной – 60%. Срок родоразрешения во II группе ($33,9 \pm 0,7$ недели) был достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в I ($37,8 \pm 0,4$) и К ($38,0 \pm 0,3$) группах. При анализе репродуктивного анамнеза было выявлено: что бесплодие имело место у 18,2% женщин I группы и 7,7% женщин II группы, синдром привычной потери плода отмечался у 9,0% и 19,2% соответственно. Предыдущие беременности были осложнены преэклампсией тяжелой степени у 6,4% и 8,0% женщин I и II групп, в контрольной группе этого осложнения беременности не наблюдалось. Согласно данным литерату-

ры, повторное развитие преэклампсии у 90,0% связано с наследственными дефектами системы гемостаза [3]. Среди осложнений данной беременности, которые были диагностированы у 82,0% обследуемых беременных, наиболее часто встречались угроза прерывания, анемия различной степени, рвота беременных.

В анамнезе у беременных с преэклампсией чаще встречалось невынашивание беременности: у 16,1% – в I группе, у 24% – во II группе ($K=14,3\%$), бесплодие имело место у 16,1% в I группе и 16,0% во II группе, преждевременные роды были отмечены у 6,5% и 8,0% соответственно.

Анализ результатов данной беременности показал, что преждевременные роды наблюдались в 65,4% случаев среди беременных с преэклампсией средней и тяжелой степени, именно наличие ПЭ и отсутствие эффекта от ее лечения являлись показанием для индуцированных досрочных родов. По способу родоразрешения обращает внимание высокая частота оперативных родов в группах с преэклампсией: в I группе путем операции кесарева сечения – 38,7%, во II – 64,5%, в контрольной группе – 17,1% ($p < 0,05$). Показанием к кесареву сечению у 48,0% беременных II группы было отсутствие эффекта от консервативного лечения преэклампсии, нарастание явлений преэклампсии при отсутствии условий для родоразрешения через естественные родовые пути, кроме того, среди показаний для оперативного родоразрешения были острый дистресс плода и беременность, наступившая в результате ЭКО. Весо-ростовые характеристики новорожденных во II группе были достоверно ниже, чем в I (3123 ± 92 г и $51,2 \pm 0,5$ см) и контрольной (3431 ± 73 г и $51,8 \pm 0,4$ см) группах и составили 2083 ± 168 г и $44,7 \pm 1,1$ см ($p < 0,05^{1K}$). Оценка по Апгар на 1 и 5 минутах была в I группе $6,6 \pm 0,1$ и $7,6 \pm 0,08$ балла, во II группе – $6,2 \pm 0,2$ и $7,2 \pm 0,1$ баллов ($p < 0,05^{1K}$) и в контрольной группе – $6,9 \pm 0,1$ и $7,9 \pm 0,1$. 22,5% новорожденных в I группе и 56% новорожденных во II группе имели задержку внутриутробного развития плода. Во II группе – 15, а в I – 2 новорожденных потребовали лечения в отделении интенсивной терапии и были переведены на второй этап оказания помощи в связи с их морфофункциональной незрелостью, в двух случаях отмечалась антенатальная гибель плода.

Результаты исследования системы гемостаза представлены в таблице 1.

Таблица 1

Анализ состояния системы гемостаза у беременных с преэклампсией

Показатели системы гемостаза	I группа	II группа	Контрольная группа
Протромбиновый индекс, %	$99,6 \pm 1,4^*$	$99,5 \pm 1,3$	$95,9 \pm 1,1$
АВР (каолиновое), с	$50,1 \pm 1,0^*$	$51,8 \pm 2,0$	$53,9 \pm 1,3$
Фибриноген, г/л	$3,8 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1^*$	$3,3 \pm 0,1$
РФМК, мг/100 мл	$13,2 \pm 0,5^*$	$16,8 \pm 0,5^*$	$6,8 \pm 0,6$
Фибринолитическая активность, %	$10,2 \pm 1,0$	$10,8 \pm 0,8$	$11,0 \pm 1,0$

Количество тромбоцитов *10 ⁹	219±14	229±25	212±11
Степень агрегации тромбоцитов при индукции адреналином, %	66,8±8,0*	59,9±9,0	42,8±4,7
Скорость агрегации тромбоцитов за 30с, %/мин	21,2±6,5*	13,8±3,4	10,7±2,8
Активность фактора Виллебранда, %	172,8±13,6*	191,2±9,7*	136,4±12

Примечание: $p < 0,05$ – * достоверные различия с показателями контрольной группы.

Анализ гемостазиограммы свидетельствует, что с усугублением тяжести заболевания усиливаются процессы внутрисосудистого тромбообразования, что подтверждается повышением уровня маркеров тромбофилии – РФМК, наблюдается усиление степени и скорости агрегации тромбоцитов, что подтверждает роль дисфункции эндотелия в генезе преэклампсии. Данный факт также подтверждается усилением активности фактора Виллебранда при нарастании тяжести преэклампсии.

В результате проведенного исследования было установлено, что мутация гена FGB-455G>A в I группе регистрировалась у 6,4%, во II – у 8% (K=8,3%) беременных, гетерозиготное состояние отмечалось у 32,3% беременных в I группе и у 48% во II группе (K=27,8%). Мутация гена PAI 1 встречалась у 35,5% пациенток I группы и 36,0% II группы (K=19,4%), а гетерозиготное носительство отмечалось у 35,5% и 48,0% соответственно (K=19,4%). Полиморфизм гена PAI 1 типа 5G/4G, согласно данным литературы [7], ассоциируется с более высокой концентрацией PAI 1, что ведет к снижению фибринолитической активности. В нашем исследовании было установлено, что наличие гомозиготной формы PAI 1 4G/4G коррелирует со сниженной фибринолитической активностью ($r=0,3$, $p < 0,05$). Так как наличие мутаций нескольких генов, кодирующих состояние системы гемостаза, может потенцировать друг друга, была определена частота мультигенных форм тромбофилии в группах исследования. Женщин, имевших мутации по двум исследуемым генам обнаружено, не было. Однако, в I группе в 2,3 раза чаще, чем в контрольной встречались женщины, имевшие мутацию PAI 1 типа 4G/4G и гетерозиготное носительство FGB β -455G>A (12,9% vs 5,6%), а во II – в 1,4 раза чаще (8% vs 5,6%). Гетерозиготное носительство PAI 1 типа 5G/4G и мутация FGB β -455G>A отмечалась у 16% пациенток с преэклампсией средней и тяжелой степени (K=5,6%). Среди двух женщин с антенатальной гибелью плода у одной имелась монозиготная мутация PAI 1 типа 4G/4G, у второй – гетерозиготная форма PAI 1 типа 5G/4G, и у обеих нормальная гомозигота FGB β . Сочетание мутации PAI 1 типа 4G/4G и нормальной гомозиготы FGB β встречалось у 22,6% в I группе, у 20,0% – во II группе (K=13,9%). Женщин, не имевших мутаций по двум исследуемым генам, во II группе не было, а в I их количество не отличалось от группы

контроля (16,1% vs 13,9%), исходя из этого, можно сделать вывод, что сочетание двух нормальных гомозигот является защитным вариантом в плане развития преэклампсии или обеспечивает течение преэклампсии в более легкой форме. Анализ наследственного анамнеза показал, что гипертоническую болезнь имели 38,7% родственников в I группе, 60,0% – во II группе (K=25%), ишемическую болезнь сердца – 29,0% и 28,0% соответственно (K=14,2%), а сосудистые катастрофы в виде инфаркта и инсульта – 9,7% и 12,0% соответственно (K=2,8%). Примечательно, что во II группе у 6 (24,0%) женщин носителей гомозиготной мутации PAI 1 4G/4G наследственный анамнез был отягощен гипертонической болезнью, а сосудистые катастрофы у ближайших кровных родственников имели 12,0% носителей гомозиготной формы PAI 1 4G/4G.

ВЫВОДЫ

1. Наследственные дефекты гемостаза были выявлены у 41,9% женщин с преэклампсией легкой степени и у 44% – с преэклампсией средней и тяжелой степени, в структуре преобладали дефекты, обуславливающие снижение фибринолитической активности.

2. Наличие генетических форм тромбофилии, особенно мультигенных форм, является дополнительным фактором риска развития преэклампсии и ее течения в более тяжелой форме.

3. Проведение генетического тестирования необходимо проводить женщинам группы высокого риска развития преэклампсии для своевременной диагностики изменений в системе гемостаза, их коррекции и профилактики возможных тромбогеморрагических осложнений.

Перспективы дальнейших исследований связаны дальнейшим исследованием проблем тромбофилии при беременности и разработке дифференцированной акушерской тактики с учетом выявленных нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айламазян Э. К. Гестоз: теория и практика / Э. К. Айламазян, Е. В. Мостовая. – М.: МЕДпрессинформ, 2008. – 272 с.
2. Зубовская Е. Т. Методы исследования системы гемостаза: учеб.-метод. пособие / Е. Т. Зубовская, С. Г. Светлицкая. – Минск: БелМАПО, 2005. – 365 с.

3. Макацария А. Д. Профилактика повторных осложненной беременности в условиях тромбофилии / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе. – М.: Триада-Х, 2008. – 152 с.
4. Макацария А. Д. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе. – М.: Триада-Х, 2003. – 904 с.
5. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги: Наказ від 31.12.2004 р. / Міністерство охорони здоров'я України. – К., 2004. – № 676.
6. Khalil R. A. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models / R. A. Khalil, J. P. Granger // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – № 1. – P. 29–45.
7. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia / N. Yamada, T. Arinami, K. Yamakawa-Kobayashi [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 45, № 3. – P. 138–141.