УДК 618.346-007.251-02-092:575

Передчасний розрив плодових оболонок: нові генетичні чинники та можливий патогенез їхньої реалізації

І.В. Венцківська[1], І.В. Страшко[2], К.О. Венцівський[2], О.С. Загородня[1]
[1]Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ
[2]Перинатальний центр, м. Київ

У статті наведено результати вивчення поліморфізму генів групи глутатіон-S-трансферази у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок.
Мета дослідження: **пошук патогенетичних чинників передчасного розриву плодових оболонок та удосконалення алгоритму ведення пацієнток із цим ускладненням за недоношеної вагітності.**
***Матеріали та методи*. Обстежено 68 вагітних з передчасним розривом плодових оболонок за недоношеної вагітності та 37 породіль в активній фазі першого періоду передчасних пологів на тлі цілого плодового міхура. У всіх вагітних визначено поліморфізм генів глутатіон-S-трансферази, а також активність основних показників перекисного окиснення ліпідів та ферментів антиоксидантної системи.**
***Результати*. Наведене вірогідне домінування серед вагітних з передчасним розривом плодових оболонок носіїв гомозиготної форми одного або кількох із зазначеної групи генів. Виявлене напруження процесів перекисного окиснення ліпідів визначено як патогенетичний чинник допологового розриву амніотичних мембран. Залежність підвищеного вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів від поліморфізму генів другої фази детоксикації продемонстровано високими значеннями коефіцієнта Спірмана – від 0,71 до 0,74.**
***Заключення*. Генетичний поліморфізм ферментів другої фази детоксикації є чітко асоційованим з накопиченням вторинних продуктів окиснення, що може свідчити про порушення метаболізму на межі клітинної мембрани. Це, власне, і є чинником передчасного розриву плодових оболонок. Такі патогенетичні особливості зумовлюють розвиток та генералізацію запального процесу.**
Ключеві слова*: передчасний розрив плодових оболонок, недоношена вагітність, глутатіон-S-трансфераза, перекисне окиснення ліпідів.*

Передчасний розрив плодових оболонок ускладнює кожні десяті пологи, проте у разі недоношеної вагітності цей стан діагностують майже у 30% випадків. Особливо трагічним передчасний розрив мембран є при екстремально недоношеній вагітності, оскільки продовження вагітності для плода із критично низькою масою тіла асоційоване зі зростанням ризику інфікування та зменшенням шансів на виживання [9]. Велика кількість науковців присвятила свої дослідження вивченню патогенезу передчасного розриву плодових оболонок, проте, з практичної точки зору, більш актуальним є питання тактики ведення вагітної з цим ускладненням щодо розвитку інфекційної реакції та максимально можливого пролонгування вагітності [10]. Наразі актуальною є концепція 5-денного терміну очікування або блокування пологової діяльності, що дозволяє провести повний курс профілактики дихальних розладів плода одночасно з антибактеріальною профілактикою висхідної інфекції. Результати такої тактики є різними, що залежить від гестаційного терміну (для плодів з гестаційним віком менше 28 тиж кожний день пролонгування вагітності збільшує шанси на виживання на 1%) та наявного на час розриву оболонок інфікування плода та оболонок [6]. В умовах Перинатального центру м. Києва триває дослідження з **метою** пошуку патогенетичних чинників передчасного розриву плодових оболонок та удосконалення алгоритму ведення пацієнток із цим ускладненням за недоношеної вагітності [3]. Зокрема, було досліджено поліморфізм генів глутатіон-S-трансферази у якості чинника порушеної регуляції тканинного обміну, а також зміни показників перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Було обстежено 68 вагітних із передчасним розривом плодових оболонок у гестаційні терміни 24–34 тиж (I група) та 37 породіль, госпіталізованих в активній фазі першого періоду передчасних пологів в терміни 24–34 тиж та цілим плодовим міхуром (II група). У контрольну (III) групу увійшли 34 породіллі у першому періоді своєчасних пологів на тлі цілого плодового міхура.

У всіх учасниць дослідження було визначено поліморфізм мутації гена GSTP 313 A-G, а також делеції генів GSTM та GSTT. Матеріал для проведення цієї ланки дослідження відбирали у вагітних зразу під час госпіталізації (5 мл венозної крові), фіксували кефаліновмісним транспортним розчином та заморожували до температури -40°С.

Дослідження генетичного поліморфізму проводили з використанням методу алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції з наступним гідролізом амплікантів відповідною рестриктивною ендонуклеазою. Геномну ДНК зі зразків крові виділяли за стандартною методикою з використанням протеїнази К, фенолгідроформної екстракції та осаджування етанолом. Ідентифікацію алельних домінант проводили за наявності сайту розпізнавання для відповідної рестриктивної ендонуклеази за допомогою електрофорезу в агарному гелі. За наявності мутації виявляють появу двох низькомолекулярних смуг, що утворюються під дією ферменту. При цьому повне розщеплення продукту полімеразної ланцюгової реакції свідчило про наявність в ДНК гомозиготної (ГМ) форми мутації гена GSTP 313 A-G, часткове – гетерозиготної (ГТ). Про делецію генів GSTM та GSTT свідчила просто наявність однієї смуги. Генетичні дослідження проводили на базі ДЗ «Референс-центр молекулярної діагностики МОЗ України».

Крім того, у всіх вагітних було визначено основні показники ПОЛ: концентрацію первинних продуктів – дієнових кон'югат (ДК) та вторинних – малонового альдегіду (МА). Показники було визначено методом спектрометричного аналізу в нмоль/г білка. Тим самим методом було досліджено основні ферменти антиоксидантної системи (АОС) – каталази та супероксиддисмутази (СОД).

Таблиця 1

Поліморфізм генів глутатіон-S-трансферази в обстежених вагітних

Поліморфізм гена	Група I, n=68		Група II, n=37		Група III, n=34	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Нормальний генотип GSTP	10	14,7§	20	54,1	21	61,7
ГТ GSTP 313 A-G	23	33,8§	12	32,4	9	26,5
ГМ GSTP 313 A-G	35	51,5§	5	13,5	4	11,8
Нормальний генотип GSTM	12	17,6§	19	51,3	19	55,9
ГТ GSTM del	23	33,8	9	24,3	11	32,3
ГМ GSTM del	33	48,5§	9	24,3	4	11,8
Нормальний генотип GSTT	9	13,2§	21	56,8	23	67,6
ГТ GSTT del	22	32,4§	12	32,4	8	23,5
ГМ GSTT del	37	54,4§	4	10,8	3	8,8

Примітка. § – $л_{емпір.}$ більше за $л_{крит.}$ у порівнянні із групою III.

Таблиця 2

Концентрація продуктів ПОЛ в обстежених пацієнток під час госпіталізації

Продукт ПОЛ	Група I, n=68	Група II, n=37	Група III, n=34
ДК, нмоль/г білка	16,5±0,49	17,6±0,98	9,7±0,45
МА, нмоль/г білка	23,6±0,21*	4,26±0,34	3,9±0,26

Примітка. * – p≤0,05 у порівнянні із групою III.

Статистичне оброблення отриманих результатів здійснено за допомогою критеріїв Стьюдента та Колмогорова–Вілсона. Для підтвердження залежності порушення процесів ПОЛ та поліморфізму генів другої фази детоксикації було застосовано коефіцієнт Спірмана, який свідчить про міру статистичної залежності між двома змінними величинами.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пошук чинників, легко доступних для вивчення та ефективних щодо прогнозування передчасної пологової діяльності, є основним напрямком наукових розробок у сфері дослідження передчасних пологів. І хоча ініціація та прогресування, а також узгодженість процесів скорочення матки та розкриття шийки матки є складним процесом, який ніяк не можна пояснити особливістю функціонування одного або кількох ферментних систем, визнаною є роль поліморфізму численних генів. Виходячи із дизайну та мети даного дослідження, серед численних запропонованих генетичних чинників ризику було обрано поліморфізм генів, що кодують ферменти другої фази детоксикації.

Ферменти родини глутатіон-S-трансферази належать до ензимів другої фази детоксикації, головна мета якої полягає у деактивації токсинів, ксенобіотиків та продуктів першої фази детоксикації шляхом відщеплення глутатіону та перетворення цих субстанцій на гідрофільні нетоксичні продукти, що легко виводяться з організму. Крім того, участь цих ферментів є значною в процесах антиоксидантного захисту – важливого компонента регуляції гомеостазу [7, 8].

Поліморфізм генів в обстежених вагітних викладено у табл. 1.

Порушення другої фази детоксикації може мати наслідком недостатню реалізацію механізмів антиоксидантного захисту. Продукти ПОЛ чинять деструктивний вплив на клітинну мембрану, порушують нормальну конфігурацію фосфоліпідів, активують арахідоновий каскад, запускаючи синтез простагландинів. Вагітність є періодом підвищеного навантаження на чинники антиоксидантного захисту, оскільки вимагає інтенсивної проліферації клітин, а саме – ПОЛ є тим типом тканинного дихання, що необхідний для побудови нових мембран. Продукти ПОЛ, крім пошкоджувальної дії на мембрани ендотелію та тромбоцитів, мають активуючий вплив на клітинну ланку імунітету, що врешті призводить до стимуляції експресії прозапальних цитокінів. Описана роль ферментів глутатіон-S-трансферази у регуляції простагландинового обміну, а саме – у спрямуванні циклооксигенази на синтез простагландину D, що має найбільш виражену протизапальну активність, виступаючи антагоністом решти молекул цього класу. Відмінністю простагландину D також є відсутність його спорідненості як з маткою, так і з шийкою матки. Тому мутація генів, що кодують ферменти зазначеної групи, супроводжуючись їхньою функціональною неспроможністю, непрямим шляхом призводить до збільшення активності простагландинів E та F, які мають безпосереднє значення в індукції пологової діяльності.

Саме перший механізм локальної дії на матку та, головним чином, на плодові оболонки можна передбачити стосовно ролі поліморфізму генів у походженні передчасної пологової діяльності – носії мутантних генів в абсолютній більшості представлені у І групі, де пологова діяльність була ініційована ПРПО [2]. Так, у І групі 84,3% вагітних були носіями мутантної форми гена GSTP. Для інших генів, що вивчались, частота носійства мутантних форм також перевищила 80%, що є значно більше, ніж серед роділь, передчасна пологова діяльність у яких розпочалась за цілого плодового міхура (група II). У цих пацієнток найбільш поширеним був поліморфізм гена GSTT, у ГМ та ГТ формі його виявлено у 46,6%. Останнє відповідає літературним даним стосовно частоти такого поліморфізму у популяції [8].

Процеси ПОЛ та антагоністичні їм реакції АОС є невід'ємною складовою життєдіяльності організму. Вагітність є не просто періодом підвищеного навантаження на всі системи метаболізму, але і закономірної активації процесів окиснення, що типово для анаболічної ланки обміну речовин. Особливо зростає концентрація продуктів ПОЛ у жінок з активною пологовою діяльністю, як із своєчасною, так і з передчасною (табл. 2).

Таблиця 3

Концентрація ферментів АОС у сироватці крові обстежених вагітних

Фермент АОС	Група I, n=68	Група II, n=37	Група III, n=34
Каталаза, нмоль/г білка	16,9±0,51*	6,0±0,71	9,7±0,45
СОД, нмоль/г білка	15,6±0,64*	3,2±0,64	2,9±0,26

Примітка. * – p≤0,05 у порівнянні із групою III.

Результати такого обстеження продемонстрували, що у всіх вагітних, включених до дослідження, на момент госпіталізації була виявлена підвищена концентрація первинного продукту ПОЛ – ДК. Нормальні значення цього показника коливаються в межах 3–5 нмоль/г білка. Таке явище у пацієнток групи контролю можна пояснити активною пологовою діяльністю, яка супроводжується прискоренням всіх метаболічних процесів, у тому числі – руйнування ліпідів клітинної стінки, що, крім усього іншого, є підгрунтям в утворенні головного регулятора скорочень матки – простагландинів. Важко визначити, чи зростання вмісту ДК у вагітних із розривом плодових оболонок без пологової діяльності є свідченням її наближення, чи причиною власне розриву плодових оболонок, що виникає в результаті порушення властивості амніотичних мембран.

Істотні відмінності між групами виявлено на рівні концентрації вторинного продукту ПОЛ – МА. Його нормальні концентрації у сироватці як у невагітних, так і у вагітних жінок коливаються в межах 3–5 нмоль/г білка. У групах роділь як із своєчасними пологами, так і з передчасними на тлі цілого плодового міхура концентрація цього чинника перебуває в межах фізіологічної норми. Це свідчить про те, що активація процесів окиснення ліпідів супроводжується адекватною активацією ферментної та неферментної ланок АОС. У групах ПРПО концентрація МА перевищує фізіологічну норму у 4–5 разів. Це свідчить про те, що розриву оболонок передував тривалий період дисбалансу між факторами окиснення та АОС. Однією із причин такого дисбалансу може бути вроджена недостатність неферментативної її ланки, а саме – порушення сіркозалежних механізмів відновлення за рахунок недостатності генів глутатіон-S- трансферази [4].

Підвищена активність процесів ПОЛ у групах ПРПО була поєднана з незначним зростанням вмісту ферментів АОС. Така реактивність свідчить про спробу адаптації організму (табл. 3).

Зростання концентрації МА відбувається симетрично до збільшення активності СОД. Отже, вивчення активності процесів ПОЛ та АОС свідчить про певні типові для вагітних із ПРПО ознаки, а саме – не лише притаманне всім роділлям збільшення концентрації первинних продуктів ПОЛ, але і підвищення вмісту вторинних його продуктів. Остання ознака свідчить про тривалу активацію процесів окиснення, яка, власне, і могла стати причиною порушення еластичності плодових оболонок.

Підвищене напруження процесів ПОЛ може, зокрема, бути наслідком недостатньої активності ферментної ланки АОС, що не підтверджується даними лабораторного обстеження – на момент госпіталізації концентрація основних ферментів була підвищеною. Проте неферментною ланкою АОС є відновлення сірки, в якому задіяні ферменти другої фази детоксикації [5].

Для підтвердження залежності порушення процесів ПОЛ та поліморфізму генів другої фази детоксикації було застосовано коефіцієнт Спірмана, який свідчить про міру статистичної залежності між двома змінними величинами. Так, у I групі розрахований коефіцієнт Спірмана становив 0,74 для мутації GSTP та концентрації МА, що свідчить про залежність зростання вмісту вторинних продуктів ПОЛ від недостатності наведеного ферменту. Так само показовими були значення коефіцієнтів у цій групі для мутації GSTT (0,72) та GSTM (0,71). Для груп, де передчасна та своєчасна пологова діяльність розпочалась за цілого плодового міхура, значення коефіцієнта щодо всіх досліджених генів не перевищувало 0,3.

ВИСНОВКИ

1. Генетичний поліморфізм ферментів другої фази детоксикації чітко є асоційованим з накопиченням вторинних продуктів ПОЛ, яке може свідчити про порушення метаболізму на межі клітинної мембрани, що, власне і є чинником передчасного розриву плодових оболонок.

2. Пацієнтки із ПРПО при недоношеній вагітності незалежно від терміну мають вихідні порушення антиоксидантного захисту, які зумовлюють розвиток та генералізацію запального процесу. Такі патогенетичні особливості слід враховувати при розробленні тактики ведення пацієнток із ПРПО саме щодо попередження септичних ускладнень.

Преждевременный разрыв плодных оболочек: новые генетические факторы и возможный патогенез их реализации

И.Б. Венцковская, И.В. Страшко, К.О. Венцковский, А.С. Загородняя

В статье приведены результаты изучения полиморфизма генов группы глутатион-S-трансферазы у беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек.

Цель исследования: поиск патогенетических факторов преждевременного разрыва плодных оболочек и усовершенствование алгоритма ведения пациенток с этим осложнением при недоношенной беременности.

Материалы и методы. Обследовано 68 беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек при недоношенной беременности и 37 рожениц в активной фазе первого периода преждевременных родов на фоне целого плодного пузыря. У всех беременных определен полиморфизм генов глутатион-S-трансферазы, а также активность основных показателей перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной системы.

Результаты. Показано достоверное доминирование у беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек носителей гомозиготной формы одного или нескольких из указанной группы генов. Обнаруженное напряжение процессов перекисного окисления липидов определено как патогенетический фактор дородового разрыва амниотических мембран. Зависимость повышенного содержания продуктов перекисного окисления липидов от полиморфизма генов второй фазы детоксикации продемонстрировано высокими значениями коэффициента Спирмана – от 0,71 до 0,74.

Заключение. Генетический полиморфизм ферментов второй фазы детоксикации четко является ассоциированным с накоплением вторичных продуктов окисления, что может свидетельствовать о нарушении метаболизма на грани клеточной мембраны. Это, собственно, и является фактором преждевременного разрыва плодных оболочек. Такие патогенетические особенности способствуют развитию и генерализации воспалительного процесса.

Ключевые слова: *преждевременный разрыв плодных оболочек, недоношенная беременность, глутатион-S-трансфераза, перекисное окисление липидов.*

Preterm membrane rupture – new genetic factors and possible way of their realization

I.B. Venckivs'ka, I.V. Strashko, K.O. Venckivs'kiy, O.S. Zagorodnya

The results of the study of gene polymorphism of glutathione-S-transferase in pregnant women with premature rupture of membranes are considered in the article.

The objective: to find the pathogenetic factors of premature rupture of membranes and improve the algorithm of reference of patients with this complication in preterm pregnancy.

Patients and methods. The study involved 68 pregnant women with premature rupture of membranes at term pregnancy and 37 women in the active phase of the first period of preterm birth with intact membranes. Gene polymorphism of glutathione-S-transferase, and the activity of key indicators of lipid peroxidation and antioxidant enzyme system were identified in all patients.

Results. The dominance among pregnant women with premature rupture of membranes carriers homozygous form of one or more of this group of genes is demonstrated. The observed intensity of lipid peroxidation identified as a pathogenic factor in prenatal rupture of amniotic membranes. The dependence of the high content of lipid peroxidation products of phase II detoxification gene polymorphism is demonstrated by high values of the Spirman coefficient – from 0,71 to 0,74.

Conclusion. The phase II detoxification genetic polymorphism is clearly associated with the accumulation of secondary products of oxidation, which may indicate metabolic disorders on the edge of the cell membrane, which actually is a factor in premature rupture of membranes. These features contribute to the pathogenesis of inflammation and generalization.

Key words: *preterm membrane rupture, glutation-S-transferase, lipid peroxidation.*

Сведения об авторах

Венцковская Ирина Борисовна – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

Страшко Ирина Владимировна – Перинатальный центр, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

Загородняя Александра Сергеевна – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

Венцковский Кирилл Олегович – Перинатальный центр, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9; тел.: (050) 687-32-68. *E-mail: gyner2007@gmail.com*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1.Ахмад Халед Німер Абу Халіл. Роль сполучнотканинних елементів плідних оболонок у виникненні їх передчасного розриву при недоношеній вагітності: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.: спец.14.01.01 «Акушерство і гінекологія». – Харків, 2009. – 20 с.

2.Венцковский Б.М. Полиморфизм генов глутатион-S-трансферазы – независимый фактор риска преждевременного разрыва плодных оболочек /Б.М. Венцковский, А.С. Загородняя, Т.В. Цапенко, И.В. Страшко / Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2015. – № 6 (42). – С. 8–15.

3. Загородня О.С. Поліморфізм другої фази детоксикації в генезі передчасного розриву плодових оболонок /О.С. Загородня, С.Ст. Леуш, В.О. Ткаліч, І.В. Страшко//Здоровье женщины. – 2015. – № 5 (101). – С. 99–101.

4. Квашніна Л.Б. Профілактика порушень ендотеліальної функції у дітей у період переходу від здоров'я до синдрому вегетативної дисфункції /Л.Б. Квашніна, Т.Б. Ігнатова //Современная педиатрия. – 2016. – № 5 (77). – С. 16–24.

5. Морозова Н.И. Возможности профилактики у женщин с нарушениями инволюции матки /н.и. Морозова, В.П. Квашенко, О.М. Бабенко, Н.А. Морозова, И.Н. Еременко// Медико-социальные проблемы семьи – 2014. – т. 19, № 1. – с. 14–15.

6. ACOG Commitee of Practice Bulletens-Obstetrics, authors. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologist. (ACOG practice Bulletin No80: premature rupture of membranes)//Obstet Gynecol. – 2007. – N 109. – P. 1007–1019.

7. Allan J. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia /J. Alllan, C. Wild, S. Rollinson, E. Willett, A. Moorman et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2001. – N 98. – P. 11592–11597.

8. Bulmakhanov T.S. Polymorphisms at GSTM1, GSTP1, GSTT1 Detoxification Genes Loci and Risk of Breast Cancer in Kazakhstan Population/ T.S. Balmukhanov, A.K. Khanseitova, V.G. Nigmatova, E.E. Ashirbekov, Sh. Zh. Talaeva, N.A. Aitkhozhina// Breast Cancer Research. – 2013. – № 2. – P. 114–118 http: //dx. doi. org/ 10. 4236/ abcr. 2013. 24019

9. Garite T.J. Management of premature rupture of membranes / T.J. Garite // J.Clinical Perinatology. – 2001. – Vol. 28. – P. 837–847.

10. Wolfensberger A. Neonatal mortality and morbidity after aggressive long-term tocolysis for preterm premature rupture of membranes: a methodologic review /Wolfensberger A., Zimmermann R., Mandach U. //Fetal Diagn.Ther. – 2006. – № 21. – P. 366–373.

Статья поступила в редакцию 31.01.17