

©Т.О. Лоскутова

СТАН СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ВАГІТНИХ З ГІПЕРТЕНЗИВНИМИ РОЗЛАДАМИ ТА ГЕННИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ*Державна установа «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
кафедра акушерства та гінекології*

СТАН СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ВАГІТНИХ З ГІПЕРТЕНЗИВНИМИ РОЗЛАДАМИ ТА ГЕННИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ. В роботі було проведено тестування поліморфізму генів тромбофілії, «ендотеліальної дисфункції» і «судинної системи», а також визначення стану системи гемостазу у вагітних з преєклампсією. Встановлено, що для преєклампсії легкого ступеня характерно підвищення функціональної активності тромбоцитів, помірна активація коагуляційної ланки, при непорушеному фібринолізі. Для преєклампсії середнього і важкого ступеня характерні порушення судинно-тромбоцитарного ланки гемостазу, активація коагуляційної ланки, пригнічення системи фібринолізу. Частіше генні поліморфізми, особливо тромбофілічної дії, зустрічалися в групі з преєклампсією середнього або важкого ступеня і супроводжувалися змінами у всіх ланках гемостазу. Визначення генних поліморфізмів дозволяє виявляти жінок з підвищеним ризиком розвитку преєклампсії та проводити індивідуальну профілактику цього ускладнення вагітності.

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БЕРЕМЕННЫХ С ГИПЕРТЕНЗИВНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ И ГЕННЫМИ ПОЛИМОРФИЗМАМИ. В работе было проведено тестирование полиморфизма генов тромбофилии, «эндотелиальной дисфункции» и «сосудистой системы», а также определение состояния системы гемостаза у беременных с преэклампсией. Установлено, что для преэклампсии легкой степени характерно повышение функциональной активности тромбоцитов, умеренная активация коагуляционного звена, при ненарушенном фибринолизе. Для преэклампсии средней и тяжелой степени характерны нарушения сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, активация коагуляционного звена, угнетение системы фибринолиза. Чаще генные полиморфизмы, особенно тромбофилического действия, встречались в группе с преэклампсией средней или тяжелой степени и сопровождалась изменениями во всех звеньях гемостаза. Определение генных полиморфизмов позволяет выявлять женщин с повышенным риском развития преэклампсии и проводить индивидуальную профилактику этого осложнения беременности.

STATE SYSTEM OF HEMOSTASIS IN PREGNANT WOMEN WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND GENETIC POLYMORPHISM. Testing of thrombophilia, "endothelial dysfunction" and "vascular system" genes polymorphism and the definition state of the system of hemostasis was conducted in pregnant women with preeclampsia. It was found that mild pre-eclampsia is characterized by increased functional activity of platelets, moderate activation of coagulation management, undisturbed by fibrinolysis. Moderate and severe forms of pre-eclampsia is characterized by disorders in vascular-platelet hemostasis, activation of coagulation, inhibition of fibrinolysis. Often genetic polymorphisms, especially thrombophilic were occurring in the group with moderate or severe preeclampsia and accompanied by changes at all levels of hemostasis. Determination of genes polymorphism allows to estimate women with the high risk of development of preeclampsia and begin individual prophylaxis of this complication of pregnancy.

Ключові слова: вагітність, преєклампсія, генні поліморфізми, система гемостазу, тромбофілія.

Ключевые слова: беременность, преэклампсия, генные полиморфизмы, система гемостаза, тромбофилия.

Key words: pregnancy, preeclampsia, gene polymorphisms, haemostasis, thrombophilia.

ВСТУП. За даними ВООЗ, гіпертензивний синдром - друга після емболії причина материнської смертності [1,2], що пов'язано з недооцінкою ступеня тяжкості, несвоєчасним і неадекватним лікуванням та запізнілим розродженням. Дослідження генів сприйнятливості до преєклампсії є актуальним, засноване на найбільш широко прийнятих гіпотезах її патогенезу: неповна інвазія трофобласта і генералізована дисфункція ендотелію. Наявність генетичної схильності до дисфункції ендотелію, підвищеного тромбоутворення, артеріальної гіпертензії є причиною посилення тромбогенних властивостей ендотелію, посилення агрегації тромбоцитів, збільшення проникності судин, розвитку хронічного ДВЗ синдрому [3-5]. Встановлено, що підвищений рівень Д-димеру в фертильному циклі і в І триместрі вагітності виявляється у 40,0% пацієнток групи ризику акушерських (синдром втрати плода, преєклампсія, передчасне відшарування плаценти) і тромботичних ускладнень [6]. Серед вагітних з важкою преєклампсією виявлено

достовірно зниження кількості антитромбіну III, збільшення інгібітору активатора плазміну, Д-димеру, комплексів тромбін-антитромбін [7]. Дослідження вчєних показали, що значне зниження числа тромбоцитів, виражений стан гіперкоагуляції у вагітних з преєклампсією важкого ступеня є предиктором закінчення вагітності [7]. Враховуючі все вище викладене метою дослідження стало вивчення стану та виявлення змін в системі гемостазу у вагітних з гіпертензивними розладами та генними поліморфізмами

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було обстежено 177 жінок в третьому триместрі вагітності. Критерієм включення в основну групу дослідження стала наявність гіпертензивних порушень під час вагітності. Групу 1А склали 64 вагітних з гестаційною артеріальною гіпертензією або преєклампсією легкого ступеня. Групу 1В - 69 вагітних з преєклампсією середнього або важкого ступеня тяжкості. Вагітні були розподілені по групах на підставі величини артеріального тиску, рівня протеїнурії, додаткових усклад-

нень и відповідно до клінічного протоколу МОЗ України № 676. Контрольну групу сформували 44 умовно здорових вагітних в третьому триместрі.

Дослідження функціональної активності тромбоцитів і активності фактора Віллебранда проводили на агрегометрі AP 2110 «СОЛАР» (Білорусія). Визначення протромбінового індексу (ПІ), активованого часу рекальцифікації (АЧР), фібриногену проводили на автоматичному коагулометрі Amelung Coagulometr KC 4A. Природний лізис згустку і ретракцію фібринового згустку визначали за методом Котовської М.А. та Кузніка Б.І. [8]. Для діагностики внутрішньо судинного згортання крові визначали розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК), фенантроліновим тестом з допомогою діагностикуму «РФМК-тест» фірми Технологія Стандарт (Росія), а також рівень Д-дімеру в плазмі крові імунотурбодиметричним аналізом за допомогою латекс - теста Tina-quant a D-Dimer (Roche Diagnostics, США) на системі Roche/Hitachi Cobas c 6000.

У всіх групах методом алель специфічної полімеразної ланцюгової реакції, з наступною детекцією методом електрофорезу в 3% агарозному гелі, проводили визначення поліморфізмів у генах фактора V Leiden, протромбіну 20210 G>A, інгібітору активатора плазміногену 1 типу (PAI-1) 5G/4G, фібриногену в 455 G>A, параоксонази-1 192 Q>R, метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) 677 C>T і поліморфізм 235 M>T в гені ангіотензиногену (AGT). Використовувався

комплект реагентів «SNP-експрес» виробництва НВФ «Літех» (Росія). Геномна ДНК виділялася з лейкоцитів цільної крові за допомогою реагенту «ДНК-експрес-кров» («Літех» Росія). Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2000 і GrafPad Prism 5 для Windows. Для порівняння якісних показників використовували критерій χ^2 . Для зручності розрахунків кожному генотипу (нормальна гомозигота, гетерозигота і патологічна гомозигота) були привласнені номери 1, 2 і 3 відповідно. Для порівняння кількісних величин використовували непарний критерій t. Для визначення кореляції між кількісними характеристиками користувалися методом кореляції по Спірману. За значимий брали рівень достовірності $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Результати визначення генних поліморфізмів у вагітних з преєкламписією різного ступеня представлені в таблиці 1. За результатами генетичного дослідження встановлено, що в групах з преєкламписією частіше зустрічались носії T235T гена ангіотензиногена, ніж серед здорових вагітних. Мутація гена детермінує підвищений рівень експресії ангіотензиногену, істотно змінює взаємодію ангіотензиногену з ренином і ангіотензинперетворюючим ферментом, що може спричинитися розвиток преєкламписії у вагітних - носіїв мутації. До мутацій генів системи гемостазу відносять мутацію фактора V Leiden, поліморфізми в гені протромбіну 20210 G>A, в гені PAI-1 5G/4G, в

Таблиця 1. Частота виявлення поліморфізмів генів і патологічних алелів у вагітних з преєкламписією

ГРУПИ ДОСЛІДЖЕННЯ	ГЕНОТИП, %		
	MM	MT	TT
ANG 235 M ' T			
1A група (n=64)	37,5	34,38	28,13*
1B група (n=69)	24,64*	49,28	26,09*
Контроль (n=44)	47,73	43,18	9,09
Протромбін 20210 G ' A	GG	GA	AA
1A група (n=64)	96,88	3,13	0
1B група (n=69)	76,81 ^{1A}	15,94 ^{1A}	7,25
Контроль (n=44)	100	0	0
Leiden 1691 G ' A	GG	GA	AA
1A група (n=64)	87,5	10,94	1,58
1B група (n=69)	72,46*	27,54 ^{1A}	0
Контроль (n=44)	93,18	6,82	0
PAI-1 5G/4G	5G/5G	5G/4G	4G/4G
1A група (n=64)	18,75*	60,94*	20,31
1B група (n=69)	24,64*	50,72	24,64 ^{1A}
Контроль (n=44)	52,27	38,64	9,09
Фібриноген в 455 G ' A	GG	GA	AA
1A група (n=64)	54,69	35,94*	9,38
1B група (n=69)	28,99*	57,97 ^{1A}	13,04
Контроль (n=44)	75	20,45	5,54
MTHFR 677C ' T	CC	CT	TT
1A група (n=64)	64,09	25	10,94
1B група (n=69)	57,97	28,99	13,04*
Контроль (n=44)	70,45	29,55	0
Параоксоназа 1 192 Q ' R	QQ	QR	RR
1A група (n=64)	48,44	39,06	12,5
1B група (n=69)	53,62	27,54	18,84
Контроль (n=44)	65,91	18,18	15,91

Примітки: * - різниця показників статистично вірогідна з контролем ($p < 0,05$), ^{1A} - різниця показників статистично вірогідна з 1A групою ($p < 0,05$).

гені фібриногену в 455 G>A. Дані мутації ініціюють процеси гіперкоагуляції. Найбільш важливим і небезпечним є наявність перших двох мутацій, тому що їх патологічний ефект виявляється навіть в гетерозиготному стані. При дослідженні наявності поліморфізму в гені протромбіну 20210 G>A з'ясовано, що носіїв мутантного гена в 1В групі було 7,25 %, гетерозиготних носіїв - 15,94 %, у 1А групі - 3,13%, в контрольній групі - у 100% відзначалося відсутність мутантного гена. Мутація фактора V Leiden достовірно частіше визначалась в 1В групі - 27,54 %, ніж в К (6,82 %, $p < 0,05$). Було встановлено, збільшення кількості гетерозигот гена фібриногена в 455 GA в 1А (35,94 %) та 1В (57,97 %) групах в порівнянні з контролем 20,45 % ($p < 0,05$). При аналізі поліморфізму в гені PAI-1 5G/4G відмічено достовірне збільшення патологічних гомозиготних форм 4G/4G у вагітних 1В групи - 24,64 %, у порівнянні з контролем - 9,09 % ($p < 0,05$). У дослідженні [9] встановлено, що поліморфізм PAI-1 пов'язаний з більш високим рівнем та активністю PAI-1 в плазмі, що веде до гіпофібринолізу, тромбозу і розвитку плацентарної недостатності. Аналіз поліморфізму в гені MTHFR 677 C>T виявив достовірне підвищення частоти генотипу TT в групі з ПЕ важкого ступеня - 13,04 % (К=0 %, $p < 0,05$).

Аналіз показників системи згортання (табл. 2) показав, що зі збільшенням тяжкості захворювання збільшується коагуляційний потенціал крові. Була вста-

новлена наявність зворотного кореляційного зв'язку між показниками МНС ($r = -0,388$, $p < 0,05$), АЧТЧ ($r = -0,586$, $p < 0,05$) і ступенем тяжкості захворювання. Дані зміни характеризують підвищену активність факторів внутрішнього шляху згортання крові при наростанні тяжкості захворювання. При оцінці кількості РФМК, Д-дімера, що відображають наявність внутрішньосудинного тромбоутворення, відзначено достовірне ($p < 0,05$) їх підвищення при наростанні тяжкості захворювання (табл. 2), що прямо вказує на наявність патологічно активного фібрину та існування синдрому ДВЗ в хронічній формі. При чому рівень Д-дімера більше корелює з важкістю захворювання ($r = 0,479$, $p < 0,05$), ніж кількість РФМК ($r = 0,201$, $p < 0,05$).

Особливий інтерес представляє дослідження фактора Віллебранда (ФВ), як маркера пошкодження ендотелію при прееклампсії. При наявності прееклампсії зміст ФВ значно зростає і корелює зі ступенем тяжкості ПЕ ($r = 0,369$, $p = 0,0002$), крім того в групі з ПЕ середнього або важкого ступеня визначено наявність зворотного зв'язку між активністю фактору та фібринолітичною активністю ($r = -0,453$, $p = 0,025$), та прямого зв'язку із концентрацією фібриногену ($r = 0,637$, $p = 0,001$). Наростання тяжкості захворювання супроводжується зниженням кількості тромбоцитів (табл. 1), що може бути пов'язано з витрачанням тромбоцитів в процесі мікротромбоутворення. Виявлена слабка зворотна кореляція між кількістю тромбоцитів

Таблиця 2. Аналіз стану системи гемостазу у вагітних з прееклампсією

Показники системи гемостазу	Групи дослідження		
	1А, n=64	1В, n=69	К, n=44
Протромбіновий індекс, %, $M \pm m$	97,52±0,99	99,32±1,0	97,1±0,9
МНС, $M \pm m$	1,02±0,01	0,92±0,02 ^{*,1А}	1,03±0,01
АЧТЧ, с, $M \pm m$	28,93±0,3*	25,94±0,39 ^{*,1А}	31,01±0,38
АЧР (каоліновий), с, $M \pm m$	51,76 ±0,75	51,69±1,05	52,57±0,8
Фібриноген, г/л, $M \pm m$	3,8±0,12	4,33±0,18 ^{*,1А}	3,48±0,12
РФМК, $M \pm m$, мг/100 мл	16,52±1,79	24,75±4,07 ^{*,1А}	15,0±1,96
Д-дімер мкг/мл, $M \pm m$	1,13±0,09*	1,52±0,18 ^{*,1А}	0,48±0,03
Фібринолітична активність, %, $M \pm m$	10,61±0,65	8,6±0,46 ^{*,1А}	10,10±0,89
Ступень ретракції, %, $M \pm m$	52,68±1,26	53,79±0,95	51,36±1,62
Власна ретракція, %, $M \pm m$	42,29±1,14	44,63±0,99	41,21±1,62
Гематокрит, %, $M \pm m$	0,31±0,01*	0,34±0,01 ^{*,1А}	0,3±0,01
Активність фактора Віллебранду, %	192,1±6,86*	196,7±17,98*	148,0±5,02
Кількість тромбоцитів, *10 ⁹ /л, $M \pm m$	219±7,81	186,9±7,83*	221,2±6,01

Примітки: * - різниця показників статистично вірогідна з контролем ($p < 0,05$), ^{1А} - різниця показників статистично вірогідна з 1А групою ($p < 0,05$).

і ступенем тяжкості захворювання ($r = -0,292$, $p = 0,0005$). В обох групах дослідження був встановлений дуже високий прямий кореляційний зв'язок між активністю ФВ і ступенем агрегації тромбоцитів: в 1А групі 0,937 ($p < 0,00001$), в 1В групі 0,965 ($p < 0,00001$).

ВИСНОВКИ. Таким чином більш часто генні поліморфізми, особливо тромбофілічної дії, зустрічались в групі з прееклампсією середнього або важкого ступеня і супроводжувались змінами в усіх ланках системи гемостазу. Для прееклампсії легкого ступеня характерно підвищення функціональної активності тромбоцитів, помірна активація коагуляційної ланки (зниження АЧТЧ в 1,12 рази, підвищення активності

фактора Віллебранда в 1,3 рази, підвищення рівня Д-дімеру в 2,35 рази), при непорушеному фібринолізі. Для прееклампсії середнього і важкого ступеня характерні порушення в судинно-тромбоцитарній ланці гемостазу: зниження кількості тромбоцитів в 1,19 рази, підвищення ступеня і швидкості їх агрегації; активація коагуляційної ланки: зниження в 1,12 рази МНО, в 1,2 рази АЧТЧ, підвищення кількості фібриногену в 1,24 рази, РФМК в 1,65 рази, Д-дімеру в 3,17 рази, рівня гематокриту в 1,13 рази, підвищення активності фактора Віллебранда в 1,33 рази; пригнічення системи фібринолізу: зниження фібринолітичної активності в 1,17 рази.

Виходячи з проведеного дослідження, слідує, що розвиток ПЕ пов'язаний зі станом гіперкоагуляції, причиною якого може бути поліморфізм генів, що викликають тромбофілію, ендотеліальну дисфункцію та підвищення артеріального тиску. Визначення генних поліморфізмів дозволяє виявити жінок зі схильністю до розвитку ПЕ, особливо важкого ступеня, задля більш пильного нагляду під час вагітності.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.

Незважаючи на вивчення багатьох ланок патогенезу преєклампсії до кінця залишаються не розробленими питання оцінки ступеня тяжкості преєклампсії у вагітних з генними поліморфізмами, прогнозування ступеня тяжкості та розвитку перинатальних та акушерських ускладнень. Немає чітко визначеної аку-

шерської тактики та досі дискусійними залишаються питання об оптимальних строках розродження у вагітних з гіпертензивними порушеннями, асоційованими з тромбофіліями.

За цих обставин виникає необхідність у здійсненні нових наукових досліджень, спрямованих на визначення критеріїв оцінки ступеня тяжкості гіпертензивних розладів, критеріїв прогнозу розвитку акушерських та перинатальних ускладнень враховуючи вид тромбофілії, гемостазіологічні та імунологічні критерії, параметри антиоксидантної системи, а також розробка акушерської тактики ведення вагітності, пологів, вибір способу та строку розродження у вагітних з гіпертензивними розладами, асоційованими з тромбофілією.

ЛІТЕРАТУРА.

1. Медведь В.И. Артериальная гипертензия при беременности в Европейских рекомендациях – 2007. Комментарии специалиста / В.И. Медведь // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2008. - №6 (15). – С. 23-28.
2. Сидорова И.С. Гестоз и материнская смертность / И.С. Сидорова, О.В. Зайратьянц, Н.А. Никитина // Акушерство и гинекология. -2008. - №2. -С. 13-15.
3. Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений / Л.В. Ванько, В.Г. Сафронова, Н.К. Матвеева, Г.Т. Сухих. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. -264 с.
4. Brenner В. Thrombophilia and pregnancy complications / В. Brenner // Pathophysiol. Haemost. Thromb. – 2006 – Vol. 35, № 1-2 – Р. 28-35.
5. Smith R.A. Risk factors, prevention and treatment of hypertension in pregnancy / R.A. Smith, P.N. Baker // Minerva. Gynecol. – 2005 – Vol. 57, № 4 – Р. 379-388.

6. Самбурова Н.В. Клиническое значение контроля маркеров активации свертывания крови при проведении протромботической терапии у беременных, рожениц и родильниц с тромбофилией: автореф. дис... канд. мед. наук: 14.00.01 / Наталья Виктория Самбурова; ГОУ ВПО «Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова». – Москва, 2008. – 26 с.

7. Coagulation/fibrinolysis disorder in patients with severe preeclampsia / Т. Kobayashi, N. Tokunaga, M. Sugimura et al. // Semin. Thromb. Hemost. – 1999 – Vol. 25, № 5 – Р. 451-454.

8. Зубовская Е.Т. Методы исследования системы гемостаза / Е.Т. Зубовская, С.Г. Светлицкая.: учеб.-метод пособие . – Минск.:БелМАПО, 2005.-365 с.

9. Тромбофилии в акушерской практике / [М.С. Зайнулина, Е.А. Корнюшина, А.С. Готов и др.]; под ред. Э.К. Айламазяна и В.С. Баранова. - [3-е изд.]. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 56 с.

Отримано 08.02.13