

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВЕРОЯТНОСТИ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПУТЕМ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Гриневич Т. Н. (tgrinevich@yandex.by), Ляликов С. А. (lalikov@tut.by),
Степура Т. Л. (mikhno_t@yahoo.com)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Наличие наследственной тромбофилии сопряжено с повышенным риском развития осложнений беременности, в том числе привычным невынашиванием. Большинство видов тромбофилий характеризуются гиперкоагуляционным состоянием, являющимся основой механизма развития тромботических гестационных осложнений.

Целью исследования являлась разработка способа прогнозирования вероятности гиперкоагуляционного состояния во время беременности путем анализа генетического статуса женщин.

Материал и методы. На полиморфизмы, ассоциированные с невынашиванием, обследовано 117 женщин. Интегральную оценку системы гемостаза проводили с помощью системы ротационной тромбоэластометрии.

Результаты. Генетические маркеры тромбофилий встречаются с одинаковой частотой как у женщин с привычным невынашиванием, так и у женщин с реализованной репродуктивной функцией. Поэтому для оценки комбинации генов и количества, одновременно выявленных мутаций с помощью дискриминантного анализа нами была построена модель прогнозирования развития гиперкоагуляционного состояния во время беременности.

Выводы. 1. Предложенная модель позволяет с чувствительностью 75,0%, специфичностью 85,7% прогнозировать возникновение гиперкоагуляционного состояния во время беременности. 2. Использование данной модели даст возможность формировать группу женщин высокого риска по развитию тромботических гестационных осложнений для своевременной диагностики и коррекции выявленных нарушений во время беременности.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, тромбофилия, гиперкоагуляция.

Тромбофилия (от гр. *thrombos* — ком, сгусток, *phileo* — люблю) — состояние, характеризующееся чрезмерной (неадекватной) коагуляцией крови и тромбообразованием, ведущими к ишемии тканей и органов. Наличие наследственной тромбофилии сопряжено с повышенным риском развития осложнений беременности, в том числе с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) [4]. На данный момент исследован аллельный полиморфизм более 90 генов, относящихся к генной сети патологии беременности. Наибольший интерес представляет изучение полиморфизмов генов гемостаза (FV, FII, FXIII, FGB), генов, влияющих на фолатный статус (MTHFR), генов, принимающих участие в процессах имплантации и плацентации (PAI-1) и генов тромбоцитарных рецепторов (GPIIb) [2].

Результаты исследований роли наследственной тромбофилии в проблеме привычного невынашивания беременности крайне противоречивы. Эти противоречия могут являться следствием популяционной специфичности или некорректного выбора обследуемых, малым объемом исследований, отсутствием учета так называемых «ген-генных взаимодействий» — неблагоприятных сочетаний аллельных вариантов разных генов. Кроме того, необходимо учитывать тот факт, что носительство полиморфных вариантов разных генов вносит неодинаковый вклад в формирование осложнений беременности, отличающийся как по направленности действия (протективное или негативное), так и по

его выраженности. Соответственно, при оценке риска развития осложнений беременности необходимо включать в анализ гены, имеющие разнонаправленный эффект (как промоторный, так и протективный) и учитывать функциональную значимость (направление действия, степень его проявления) каждой из аллелей исследуемых генов. Следует отметить, что, несмотря на стремительно увеличивающиеся возможности ДНК-тестирования, до настоящего времени отсутствуют четкие алгоритмы анализа результатов генетического обследования для оценки риска акушерских осложнений беременности у женщин с ПНБ.

Большинство видов тромбофилий, в том числе и наследственных, характеризуются повышением свертываемости крови, т.е. гиперкоагуляционным состоянием. Уже с самых ранних сроков физиологическая беременность сама по себе является тромбофилическим состоянием, при котором уже в 5-6 раз повышается риск венозных тромбозов. Наследственные тромбофилические дефекты гемостаза усугубляют физиологическую гиперкоагуляцию во время беременности и нередко активизируют процессы внутрисосудистого тромбогенеза с последующим неблагоприятным исходом беременности [5]. В настоящее время единственным глобальным коагулологическим методом, позволяющим диагностировать большинство нарушений гемостаза, в том числе при наследственных тромбофилиях, является ротационная тромбоэластометрия (ROTEM, Pentapharm GmbH), позволяющая

комплексно оценить различные дефекты свертывания крови, а также выявить гипо- и гиперкоагуляционные состояния [1]. Оценка системы гемостаза методом ротационной тромбоэластометрии совместно с анализом разных вариантов аллельных генов, ассоциированных с невынашиванием, позволит оценить их вклад в развитие гиперкоагуляционного состояния.

Целью настоящего исследования являлась разработка способа прогнозирования вероятности гиперкоагуляционного состояния во время беременности путем анализа генетического статуса женщин с привычным невынашиванием беременности, что позволит формировать группы риска и осуществлять продуктивную прегравидарную подготовку с последующим проведением своевременной коррекции нарушений, выявленных во время беременности.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе УЗ «ГК БСМП» г. Гродно. Обследованы 117 женщин с привычным невынашиванием беременности. Возраст наблюдаемых женщин составил от 22 до 46 лет, медиана (Me) – 30,0 лет, нижняя квартиль (Q25) – 26,0, верхняя квартиль (Q75) – 32,0 года. В процессе работы сформировались две исследовательские группы: I группа – 50 небеременных пациенток с привычным невынашиванием беременности, Me – 30 лет, Q25 – 22 лет, Q75 – 43 лет, II группа – 67 беременных с привычным невынашиванием беременности в анамнезе, Me – 30,2 лет, Q25 – 22 лет, Q75 – 46.

Критериями включения были привычное невынашивание беременности, т.е. наличие в анамнезе женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель, и наличие информированного согласия на проведение исследования. Критерием невключения были отказ от участия в исследовании, наличие в течение двух недель, предшествующих обследованию, острых или обострения хронических заболеваний, анатомических дефектов матки, эндокринных нарушений. Клиническое обследование включало детальное изучение соматического анамнеза, акушерско-гинекологического анамнеза (характер становления и нарушения менструальной функции, репродуктивная функция), семейного и тромботического анамнеза.

Контрольную группу составили 34 женщины с двумя и более физиологическими родами в анамнезе, не имеющие клинических проявлений повышенного тромбообразования. У женщин этой группы были известны благоприятный акушерский анамнез, отсутствие самопроизвольных выкидышей и других акушерских осложнений. Возраст женщин контрольной группы составил от 24 до 48 лет, медиана (Me) – 37,2 года, нижняя квартиль (Q25) – 28,0 лет, верхняя квартиль (Q75) – 42,0 года.

Молекулярно-биологическое обследование заключалось в выявлении полиморфизмов генов: коагуляционного фактора V (Лейденская мутация) Arg506Gln, протромбина (коагуляционный

фактор II) G20210A, метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) – полиморфизмы C677T и A1298C, ингибитора активатора плазминогена I типа (PAI-1) 675 4G/5G, коагуляционного фактора XIII (F13A1) Val35Leu, фибриногена (бета FGB) 455G-A, альфа-субъединицы тромбоцитарного гликопротеина 1b, (GPIIb/IIIa) Thr145Met с помощью метода ПЦР.

Геномную ДНК из лейкоцитов цельной крови пациенток с привычным невынашиванием выделяли согласно инструкции производителя в асептических условиях с использованием набора комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-экспресс-кровь» (НПО «Литех»).

Исследование генетических полиморфизмов в генах коагуляционного фактора V Arg506Gln 1691G/A (Лейденская мутация) и гена протромбина (коагуляционный фактор II) 20210G/A проводилось аллель специфической полимеразной цепной реакцией с последующей детекцией методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» производства НПФ «Литех» (Россия) согласно инструкции по применению.

Для качественного анализа наличия или отсутствия мутации в генах MTHFR Ala222Val (C677T), MTHFR Glu429Ala (A1298C), мутации ингибитора активатора плазминогена I типа-675 4G/5G, гена коагуляционного фактора XIII F13A1 Val35Leu производилась полимеразная цепная реакция «SNP-экспресс-SHOT» с использованием реагентов фирмы «Литех» (Россия) согласно инструкции по применению. Качественный анализ наличия или отсутствия мутации в гене фибриногена, бета FGB -455G-A проводили с помощью комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс-PB» (НПФ Литех). Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) детектировались в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene 6000/Q.

Интегральную оценку системы гемостаза проводили с помощью системы ротационной тромбоэластометрии (ROTEM Pentapharm GmbH) в соответствии с рекомендациями производителя. Были выполнены основные, скрининговые тесты и определены параметры свертывания цельной крови при инициации тромбообразования факторами внешнего (рекомбинантный тканевый фактор) – EXTEM тест и внутреннего (контактная активация эллаговой кислотой) пути – INTEM тест. При проведении указанных тестов определяли следующие параметры: время свертывания крови (CT), время формирования сгустка (CFT), угол альфа (ALP), амплитуда тромбоэластограммы в разное время (A10, A20, A30), максимальная плотность сгустка (MCF), максимальная эластичность сгустка (MCE), индекс фибринолиза (LI30), максимальный лизис (ML). Образцы для анализа были получены путем венепункции локтевой вены в пробирки VACUETTE с буферным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 (9NC Coagulation sodium citrate 3,2%) согласно стандартам NCCLS [6]. Исследования на ROTEM проводились в течение

4 часов после забора крови. До проведения анализа образцы хранились при комнатной температуре. Непосредственно перед пипетированием пробирки с образцом осторожно несколько раз переворачивались для предотвращения осаждения форменных элементов крови. Тесты на анализаторе ROTEM были выполнены согласно инструкции изготовителя с использованием соответствующих программ и прилагающихся к прибору фирменных реактивов.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q).

Результаты и обсуждение

Генетическая предрасположенность к нарушениям гемостаза у женщин с ПНБ как фактора риска гестационных и перинатальных осложнений оценивалась согласно выявленным генетическим детерминантам тромбофилии (гомозиготным и/или гетерозиготным генотипам) с учетом комбинаций исследуемых генов и подсчет количества одновременно выявляемых мутаций. Генетические формы тромбофилии были выявлены у 114 из 117 обследованных женщин с ПНБ (97,4%). Распределение частот генотипов по полиморфным вариантам исследуемых генов в группе женщин с привычным невынашиванием, контрольной группе и в группе сравнения представлены в таблице 1. В группу сравнения были выбраны средние результаты распространенности обследуемых полиморфизмов, полученные разными авторами с учетом потенциальной этнической схожести обследованных популяций.

Таблица 1. – Распределение частот генотипов по полиморфным вариантам исследуемых генов в группе женщин с ПНБ, контрольной группе и группе сравнения

Ген	Вариант генотипа	Частоты генотипов исследованных полиморфизмов, %		
		Женщины с ПНБ	Контрольная группа	Группа сравнения*
FII	20210 G/A	6,6	0	2-4
FV	1691 G/A	5,7	0	4-7
MTHFR	677 T/T	8,4	8,8	10-12
	677 C/T	40,2	32,4	35-47,3
MTHFR	1298 C/C	12,1	8,8	7,3-12,1
	1298 A/C	46,7	41,2	32,7-42,9
PAI-1	675 4G/4G	34,3	23,5	21-29
	675 4G/5G	38,1	55,9	47-55
FXIII	Val34Leu T/T	9,3	8,8	7,3-20
	Val34Leu G/T	44,9	38,2	32,7-40
FGB	455 A/A	11,1	-	2,2-7,3
	455 G/A	17,5	-	20-43,6
GP1BA	Thr145Met T/T	0	0	0,07-0,4
	Thr145Met C/T	16,3	8,8	16,0-27,4

Примечание *(Трифенова Е. А., 2012); (Дубоссарская З. М., 2014); (Воронин К. В., 2013); (Страмбовская Н. Н., 2013)

Полученные данные свидетельствуют о том, что генетические маркеры тромбофилий встречаются с одинаковой частотой как у женщин с ПНБ, так и у женщин с реализованной репродуктивной функцией, соматический и акушерский анамнез которых неотягощен. Наличие тех или иных аллельных вариантов генов играет роль своеобразного преморбидного фона, в рамках которого могут развиваться различные гестационные осложнения, включая ПНБ. Поэтому при определении генетического статуса пациентки важно оценивать не только наличие или отсутствие определенной мутантной аллели, но и учитывать, в каком сочетании находится данная аллель с аллелями других генов, имеющих отношение к невынашиванию беременности. В связи с чем в нашем исследовании мы провели оценку комбинации генов, а также оценили количество одновременно выявленных мутаций.

Мультигенная тромбофилия (два и более полиморфизмов) имела место у 99 (84,6%) женщин с ПНБ и 20 (58,8%) женщин контрольной группы ($p=0,001$). По одной мутации из восьми исследуемых полиморфизмов выявлено у 11 (32,3%) женщин контрольной группы и у 17 (14,5%) женщин с ПНБ ($p<0,02$). У 47 (40,2%) пациенток с ПНБ выявлено сочетание двух мутаций, у 35 (29,9%) – трех, у 10 (8,5%) – четырех, у 4 (3,4%) женщин – пяти мутаций. У 10 (29,4%) женщин контрольной группы выявлено сочетание двух мутаций (по сравнению с основной группой $p<0,03$), у 8 (23,5%) – трех ($p>0,05$), единственным (2,9%) было сочетание четырех мутаций ($p>0,05$). Сочетания пяти мутаций в контрольной группе не наблюдалось.

Таким образом, у женщин с ПНБ значительно чаще выявляется комбинация аллельных вариантов нескольких генов и количество одновременно выявляемых мутаций. Поэтому наибольшее клиническое значение имеют мультигенные и комбинированные формы мутаций с наличием патологических гомозигот. Однако вопрос, при каких комбинациях и при каком количестве выявляемых мутаций повышается риск развития осложнений беременности, включая невынашивание, оставался нерешенным.

Поэтому параллельно генетическому исследованию было проведено интегральное исследование системы гемостаза методом ротационной тромбоэластометрии в группах небеременных и беременных с ПНБ. Всем женщинам выполнялись EXTEM и INTEM тесты метода ротационной тромбоэластометрии. Тесты EXTEM (активация рекомбинантным тканевым фактором) и INTEM (контактная активация эллаговой кислотой) являются скрининговыми тестами оценки, соответственно, внешнего и внутреннего пути свертывания крови. В каждом из этих тестов анализировались следующие параметры: время свертывания крови (СТ), время формирования сгустка (CFT), угол альфа (ALP) и максимальная плотность сгустка (MCF). Результаты скрининговых EXTEM и INTEM тестов метода ротационной тромбоэластометрии в группе небеременных с ПНБ представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Результаты EXTEM и INTEM тестов у небеременных с ПНБ

Заключение	Параметры	Количество
Норма		29
Всего гиперкоагуляции		21
• хронометрическая гиперкоагуляция	↓СТ и ↓CFT ↑ALP	1
• структурная гиперкоагуляция	↑MCF	17
• хронометрическая и структурная гиперкоагуляция	↓СТ и ↓CFT ↑ALP и ↑MCF	3
Всего обследованных:		50

Структурная и/или хронометрическая гиперкоагуляция выявлена у 21 (42%) небеременной с ПНБ. На хронометрическую гиперкоагуляцию указывает укорочение времени свертывания крови (СТ), времени формирования сгустка (CFT) и увеличение угла альфа (ALP). Время свертывания крови является важным параметром активации факторов свертывания крови, а также их баланса с соответствующими ингибиторами (антитромбин III, протеин С и др.). Параметр СТ показывает, насколько быстро начинается образование фибрина. CFT и ALP отображают кинетику образования сгустка и зависят главным образом от количества и активности тромбоцитов, уровня фибриногена и склонности его к полимеризации. На структурную гиперкоагуляцию указывает увеличение параметра максимальной плотности сгустка (MCF). Параметр MCF является основным параметром тромбозластограммы, дающим интегральную оценку «качества» сгустка. Таким образом, укорочение СТ и CFT с увеличением ALP или увеличение MCF указывает на наличие гиперкоагуляционного состояния и может быть следствием наличия у пациенток тромбофилий как причины привычного невынашивания беременности.

Результаты оценки гемостаза у беременных с ПНБ в анамнезе методом ротационной тромбозластометрии представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Результаты EXTEM и INTEM тестов ротационной тромбозластометрии у беременных с ПНБ в анамнезе

Заключение	Параметры	Количество
Норма		18
Всего гиперкоагуляции		49
• хронометрическая гиперкоагуляция	↓СТ и ↓CFT ↑ALP	1
• структурная гиперкоагуляция	↑MCF	34
• хронометрическая и структурная гиперкоагуляция	↓СТ и ↓CFT ↑ALP и ↑MCF	14
Всего:		67

Структурная и/или хронометрическая гиперкоагуляция выявлена у 49 (73,1%) беременных с ПНБ, что превысило частоту ее встречаемости в группе небеременных (42%), потому что сама беременность часто способствует манифестации генетического дефекта при тромбофилии.

Увеличение тромбогенного потенциала крови или гиперкоагуляция лежит в основе механизма развития гестационных и перинатальных осложнений, обусловленных наличием тромбофилических состояний [3]. С помощью дискриминантного анализа была построена модель для прогнозирования развития гиперкоагуляционного состояния во время беременности по результатам молекулярно генетического исследования. Группирующим признаком было выбрано наличие гиперкоагуляционного состояния, диагностированное методом ротационной тромбозластометрии (таблицы 2, 3). При использовании прямого пошагового метода получена следующая дискриминантная функция:

$$y = 0,24 * m(\text{MTHFR C677T}) - 0,18 * m(\text{MTHFR A1298C}) + 0,115 * m(\text{PAI}) + 0,63 * m(\text{F5}) + 0,56 * m(\text{F2}) - 0,05 * m(\text{F13}) + 0,37 * m(\text{FGB}) - 0,85 * m(\text{GPIbA}) - 0,17,$$

где: при диком гомозиготном варианте соответствующего гена $m=0$; гетерозиготном генотипе $m=2$; мутантном гомозиготном генотипе $m=5$.

Если $y \leq 0$, прогнозируют низкую вероятность гиперкоагуляционного состояния при наступлении беременности, а при значении $y > 0$ – высокую.

Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 75,0%, специфичность – 85,7%. Прогностическая значимость положительного результата – 95,5%. Прогностическая значимость отрицательного результата – 46,2%. Общая прогностическая значимость 77,1%. Низкая прогностическая значимость отрицательного результата, вероятно, обусловлена тем, что гиперкоагуляционное состояние может быть следствием не только наследственных, но и приобретенных тромбофилий.

Выводы

1. Предложенная модель позволяет с чувствительностью 75,0%, специфичностью 85,7% прогнозировать возникновение гиперкоагуляционного состояния во время беременности путем анализа генетического статуса женщин с привычным невынашиванием беременности.

2. Использование данной модели даст возможность формировать группу женщин высокого риска по развитию тромбогенных гестационных осложнений для своевременной диагностики и коррекции выявленных нарушений во время беременности.

Литература

1. Гриневич, Т. Н. Ротационная тромбэластометрия (ROTEM) / Т. Н. Гриневич, А. В. Наумов, С. В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2010. – №1. – С. 7-9.
2. Макацария, А. Д. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе. – М.: Триада-Х, 2003. – 904 с.
3. Тромбофилии в практике врача акушера-гинеколога / В. Н. Серов [и др.]. – Новосибирск, 2007. – 88 с.
4. Сидельникова, В. М. Привычная потеря беременности / В. М. Сидельникова. – М: Триада-Х, 2000. – 304 с.
5. Thromboprophylaxis implementation during pregnancy in women with recurrent fetal losses and thrombophilia / G. Mitić, A. Novakov Mikić, L. Povazan, A. Mitreski, V. Kopitovic, T. Vejnovic // Medicinski pregled. – 2011. – Vol. 64 – P. 471-475.
6. NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Guideline — fourth edition // NCCLS Document H3-A4. Wayne, PA: NCCLS. – 1998. – Vol. 18, №7. – P. 1-28.

Literatura

1. Grinevich, T. N. Rotary thromboelastometry (ROTEM) / T. N. Grinevich, A. Naumov, S. V. Lelevich // Journal of the Grodno State Medical University. – 2010. – №1. – P. 7-9.
2. Makatsaria, A. D. Thrombophilia and antithrombotic therapy in obstetric practice / A. D. Makatsaria, V. O. Bitsadze. – M.: Triad-X, 2003. - 904 p.
3. Thrombophilia in practice obstetrician-gynecologist / V. N. Serov [et al.]. – Novosibirsk, 2007. – 88 p.
4. Sidelnikov, V. M. The usual pregnancy loss / V. M. Sidelnikov. – M: Triada-X 2000. – 304 p.
5. Thromboprophylaxis implementation during pregnancy in women with recurrent fetal losses and thrombophilia / G. Mitić, A. Novakov Mikić, L. Povazan, A. Mitreski, V. Kopitovic, T. Vejnovic // Medicinski pregled. – 2011. – Vol. 64 – P. 471-475.
6. NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Guideline — fourth edition // NCCLS Document H3-A4. Wayne, PA: NCCLS. – 1998. – Vol. 18, №7. – P. 1-28.

PREDICTION OF HYPERCOAGULABLE STATES DURING PREGNANCY BY ANALYZING GENETIC STATUS OF WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

Grinevich T. N., Lyalikov S. A., Stepuro T. L.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Hereditary thrombophilia is associated with a high risk of pregnancy complications as well as recurrent miscarriage. Most types of thrombophilia are characterized by hypercoagulable state, which is the basic mechanism of developing thrombogenic gestational complications.

The aim of the study was to develop a method of predicting the probability of a hypercoagulable state during pregnancy in women with recurrent miscarriage by analyzing genetic status of women.

Material and methods. We examined 117 women to determine the polymorphisms associated with miscarriage. Integral evaluation of hemostasis was performed using rotational thromboelastometry.

Results Genetic markers of thrombophilia are found with the same frequency in women with recurrent miscarriage and women with physiological reproductive function. So, we have developed a model for predicting the development of a hypercoagulable state during pregnancy to assess the combination of genes and the number of mutations detected at the same time by means of discriminative analysis.

Conclusions

1. The proposed model enables to predict hypercoagulable state during pregnancy with a sensitivity 75.0% and specificity 85.7%.

2. The use of this model will enable to form a group of women with high risk of gestational thrombogenic complications for prompt diagnosis and correction of disorders revealed during pregnancy.

Keywords: *recurrent miscarriage, thrombophilia, hypercoagulability.*

Поступила: 23.05.2016

Отрецензирована: 27.05.2016