

На правах рукописи

ЗАРУДСКАЯ Оксана Мирославовна

ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ
ТРОМБОФИЛИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЛАЦЕНТАРНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ С СИНДРОМОМ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Белгород – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

Чурносов Михаил Иванович, доктор медицинских наук профессор

Официальные оппоненты:

Полоников Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии

Щипков Валерий Петрович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО "Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации, и.о. заведующего кафедрой биологии и общей генетики

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2013 года в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций на соискание ученой
степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук Д 212.015.13
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Плацентарная недостаточность это синдром, обусловленный морфофункциональными изменениями в плаценте, при прогрессировании которых развивается синдром задержки роста плода (СЗРП), нередко сочетающийся с гипоксией [Айламазян Э.К. и др., 2007; Zollner U. et al., 2011]. Плацентарная недостаточность (ПН) является одним из наиболее распространенных осложнений беременности: при невынашивании встречается в 50 - 77% случаев, при преэклампсии - в 32%, при сочетании беременности с экстрагенитальной патологией – в 25 - 45%, у перенесших вирусную и бактериальную инфекцию - более чем в 60% наблюдений [Савельева Г. М. и др., 2000; Айламазян Э.К. и др., 2007; Серов В.Н. и др., 2011]. Перинатальная смертность у женщин, перенесших плацентарную недостаточность, составляет среди доношенных новорожденных 10,3‰, среди недоношенных – 49‰ [Diamond F.B., 2001; Chatelain P., 2004; Айламазян Э. К. и др., 2007; Серов В.Н. и др., 2011]. В 60% случаев плацентарная недостаточность приводит к развитию СЗРП, который занимает третье место в структуре причин перинатальной заболеваемости [Айламазян Э. К. и др., 2007; Серов В.Н. и др., 2011]. В дальнейшем у детей с СЗРП отмечается отставание в физическом развитии (60%), его дисгармоничность (80%), задержка темпов психомоторного развития (42%) [Рыбкина Н.Л., 2000].

Плацентарная недостаточность имеет мультифакториальную природу [Макацария А.Д. и др., 2000; Радзинский В.Е. и др., 2001; Серов В.Н. и др., 2011; Zollner U. et al., 2011]. Одним из факторов, приводящих к развитию плацентарной недостаточности и СЗРП, является врожденная тромбофилия [Бицадзе В.О., 2003; Stella C.L. et al., 2006; Zotz R.B. et al., 2008; Facco F. et al., 2009; Nishizawa H. et al., 2011; Kosar A. et al., 2011]. Показана значимая роль генетических факторов врожденных тромбофилий (*1691G/A* фактора V, *20210G/A* протромбина, *10976G/A* проконвертина, *-455 G/A* фибриногена, *4G/5G* ингибитора активатора пламиногена, *677C/T* MTHFR и др.) в развитии таких акушерских осложнений, как привычное невынашивание беременности, преэклампсия, отслойка плаценты [Endler et al., 2003; Бицадзе В.О., 2003; Howley H.E. et al., 2005; Franchini M. et al., 2005; Stella C.L. et al., 2006; Zotz R.B. et al., 2008; Facco F. et al., 2009; Seremak-Mrozikiewicz A. Et al., 2009; Shanker J. et al., 2009; Блинецкая С.Л., 2009; Степанова А.А., 2009; Nishizawa H. et al., 2011; Kosar A. et al., 2011].

Работы, посвященные изучению вклада наследственных тромбофилий в формирование плацентарной недостаточности и СЗРП, немногочисленны и представлены исследованиями зарубежных авторов [Howley H.E. et al., 2005; Facco F. et al., 2009; Jamal A. et al., 2010; Larciprete G. et al., 2010]. В России роль врожденных тромбофилий в развитии плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода не изучена, что диктует необходимость проведения данных исследований в Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы (гос. контракт № 02.740.11.0496 "Генетические факторы мультифакториальных заболеваний человека").

Цель: изучить роль наследственных тромбофилий в формировании плацентарной недостаточности с синдромом внутриутробной задержки роста плода.

Задачи:

1. Исследовать распространенность генетических вариантов факторов коагуляции (*1691G/A FV*, *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI*) у беременных с плацентарной недостаточностью и синдромом задержки роста плода и в контрольной группе.

2. Выявить ассоциации генетических полиморфизмов факторов коагуляции с формированием плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода, степенью его выраженности, состоянием новорожденных.

3. Оценить влияние комбинаций генов-кандидатов на развитие плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода.

4. Проанализировать связи генетических вариантов факторов коагуляции с клинико-лабораторными показателями у беременных.

5. Определить предикторы развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода и разработать математическую модель прогноза развития данного осложнения беременности с учетом генетических данных.

Научная новизна. Впервые установлено важное клиническое значение генетических полиморфизмов *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI*, *1691G/A FV* при плацентарной недостаточности с синдромом внутриутробной задержки роста плода у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ.

Определены молекулярно-генетические факторы риска развития плацентарной недостаточности с синдромом внутриутробной задержки роста плода, рождения детей в асфиксии. Выявлены молекулярно-генетические маркеры плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода 2-3 ей степеней тяжести. Показаны ассоциации генетических вариант *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI* с клинико-лабораторными показателями у беременных. Разработаны математические модели прогноза развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода.

Научно-практическое значение. Результаты проведенных исследований расширяют представления о молекулярно-генетических детерминантах плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода. Генетические варианты - аллель *10976G FVII* и генотип *10976GG FVII* могут быть рекомендованы в качестве маркеров для выделения группы риска по формированию плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода и развитию выраженных степеней его тяжести (II, III), а также рождения детей в асфиксии. Генетические варианты *-455 GA FI*, *-455*

AA FI и *10976GG FVII* следует использовать в качестве предикторов развития гиперкоагуляции у беременных. Математическая модель, разработанная на основе выявленных предикторов плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода, позволяет прогнозировать развитие этого осложнения беременности при прегравидарной подготовке или на ранних сроках беременности.

Результаты исследования используются в учебном процессе в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», в практической работе акушеров-гинекологов перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа и женской консультации городской поликлиники №2.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: третьей международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения - 2010» (Белгород, 2010), VI международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2011), итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвященной 76-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2011), всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Репродуктология: новые технологии, проблемы, перспективы» (Белгород, 2010), VII международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2012), XIII научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке», посвященной 25-летию Кировской государственной медицинской академии (Киров, 2012), 77-ой всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность» (Курск, 2012), X научно-практической конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых, посвященной 10-летию института последипломного медицинского образования (Белгород, 2012), III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), VII международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2013), VI межрегиональной научно-практической конференции с международным участием для врачей акушеров-гинекологов «Здоровье женщины – здоровье нации» (Белгород, 2013), VI международной конференции молодых ученых «Современные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии» (Москва, 2013).

Личный вклад автора. Автором лично определены цель и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения, сформированы группы исследования, проведен сбор данных анамнеза, проведено клиническое обследование беременных. Автор лично принимал участие в выполнении молекулярно-генетических исследований, проводил обработку и обобщение полученных результатов, подготовку основных

публикаций по выполненной работе, написание и оформление рукописи, апробацию результатов исследования.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 в журналах из списка ВАК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аллель *10976G FVII* и генотип *10976GG FVII* являются маркерами повышенного риска формирования плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода, его тяжелого течения и асфиксии новорожденного.

2. Комбинации генетических вариантов локусов *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455G/A FI*, *1691G/A FV* определяют подверженность к развитию плацентарной недостаточности с синдрома задержки роста плода.

3. Полиморфные варианты *-455 GA FI*, *-455 AA FI* и *10976GG FVII* ассоциированы с клинико-лабораторными показателями у беременных.

4. Генетический полиморфизм *10976G/A FVII*, отягощенный акушерский анамнез у матери пациентки, отягощенный тромботический анамнез у родственников пациентки, вес ребенка в предыдущих родах, наличие неразвившейся беременности и выкидышей в анамнезе, рост матери являются предикторами плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы. Материалы диссертации изложены на 143 страницах машинописного текста и содержат 21 таблицу и 21 рисунок. Библиографический указатель содержит 208 наименований, из которых 79 иностранных.

Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика обследованных беременных

Проведен анализ результатов наблюдений 497 беременных женщин в третьем триместре беременности. Среди них у 250 женщин беременность осложнилась развитием плацентарной недостаточности с формированием синдрома задержки внутриутробного роста плода различной степени выраженности. СЗРП легкой степени тяжести наблюдался у 133 женщин (53,20%), 2-ой степени тяжести – у 96 пациенток (38,40%), а 3-ей - у 21 беременной (8,40%). Контрольную группу составили 247 женщин, беременность которых не была осложнена СЗРП. В исследуемые выборки включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой.

Критериями исключения при формировании выборки (n=497) явились наличие патологии матки (аномалии развития внутренних половых органов, фибромиома матки), некоторые осложнения беременности (аномалии

расположения и прикрепления плаценты, изосенсибилизация по резус фактору), а также такие плодовые причины как генетические болезни, врожденные пороки развития и наличие многоплодной беременности.

Средний возраст беременных в группе с плацентарной недостаточностью и СЗРП составил $26,78 \pm 4,81$ лет (варьировал от 16 до 45 лет), в группе контроля – $26,20 \pm 5,01$ лет (варьировал от 19 до 41 лет) ($p > 0,05$). Таким образом, группа контроля не отличалась от группы женщин с плацентарной недостаточностью и СЗРП по возрасту, полу, национальности и месту рождения.

Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на базе перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий для научно-исследовательских целей.

Типирование четырех молекулярно-генетических маркеров: фактора коагуляции V (мутация *Leiden 1691G/A FV*), протромбина (*20210G/A FII*), проконвертина (*10976G/A FVII*), фибриногена (*-455 G/A FI*) осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Молекулярно-генетические методы

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 6 мл, взятая из локтевой вены беременной. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА ($pH=8.0$).

Анализ локусов *1691G/A FV*, *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI* осуществлялся методом **полимеразной цепной реакции** (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) для ПЦР в режиме real time с использованием готовых наборов реагентов производства ООО «Синтол». Генотипирование ДНК-маркеров проводилось методом дискриминации аллелей с использованием Tag Man зондов и программного обеспечения – Standart Edition Version 2,0 (Bio-Rad).

Статистические методы

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программного пакета «STATISTICA 6.0». Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [Животовский Л.А, 1995]. Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использовали критерий χ^2 [Вейр, 1995].

Ассоциации молекулярно-генетических маркеров с формированием плацентарной недостаточности с СЗРП оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 2×2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на

непрерывность и отношением шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (95%CI) [Shelesselman J., 1982]. Изучение роли комбинаций генетических вариантов факторов коагуляции *-455 G/A FI*, *1691G/A FV*, *20210G/A FII*, *10976G/A FVII* в формировании плацентарной недостаточности с СЗРП проводилось с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [Favorov A. V. et al., 2005].

При проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони, минимизирующей вероятность ложноположительных результатов (ошибки 1-го рода) [Реброва О.Ю., 2006]. При изучении связей генетических полиморфизмов с клинико-лабораторными показателями беременных оценивали характер распределения исследуемых признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. Установлено, что распределение всех анализируемых показателей отличается от нормального и поэтому для их описания применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа – критерий Манна-Уитни [Реброва О.Ю., 2006].

В работе использованы методы математического моделирования (дискриминантный анализ и регрессионный анализ) с целью прогнозирования риска развития плацентарной недостаточности с СЗРП и веса новорожденного [Боровиков В.П., 2001].

Результаты исследования и их обсуждение

1. Изучение роли генетических полиморфизмов наследственных тромбофилий в формировании плацентарной недостаточности с синдромом внутриутробной задержки роста плода

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов факторов коагуляции *1691G/A FV*, *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI* среди беременных с СЗРП и контрольной группы установлены достоверные различия по распространенности генетических вариантов фактора коагуляции *10976G/A FVII*. Среди беременных с СЗРП концентрации аллеля *10976G* (88,72%) и генотипа *10976GG* (77,87%) были наибольшими, а распространенность генотипа *10976GA* (21,70%) – наименьшая по сравнению с беременными без СЗРП - 77,07% (OR=2,34; 95%CI 1,60-3,44; $\chi^2=20,53$; $p=0,0005$), 56,10% (OR=2,75; 95%CI 1,79-4,26; $\chi^2=20,00$; $p=0,0005$; $p_{\text{cor}}=0,0015$ с учетом поправки Бонферрони), 41,95% (OR=0,38; 95%CI 0,25-0,59; $\chi^2=20,00$; $p=0,0005$; $p_{\text{cor}}=0,0015$) соответственно.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены молекулярно-генетические маркеры системы гемостаза, являющиеся факторами риска или защиты развития плацентарной недостаточности и СЗРП. Фактором риска является аллель *10976G FVII* (OR=2,34) и генотип *10976GG* (OR=2,75), а протективным эффектом обладает генотип *10976GA* (OR=0,38). Согласно данным литературы наличие генетического варианта

10976GA FVII приводит к снижению концентрации VII фактора коагуляции примерно на 25%, а наличие варианта *10976AA FVII* - к снижению концентрации данного фактора коагуляции примерно на 50% по сравнению с носителями варианта *10976GG FVII* [Макацария А.Д. и др., 2007; Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2009]. Высокие концентрации VII фактора коагуляции сопровождаются значительным повышением риска развития тромботических осложнений, в том числе тромбоза спиральных артерий во время беременности, что может обуславливать нарушение плацентарной функции [Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2009; Lopaciuk S. et al., 2010].

Установлено, что в группе беременных с СЗРП 2-ой и 3-ей степени тяжести (n=107) наблюдается наиболее высокая распространенность аллеля *10976G FVII* (92,99%) по сравнению с контрольной группой – 77,07% ($\chi^2=18,90$; OR=3,45; 95%CI 1,90-6,39; p=0,001) и группой беременных с СЗРП легкой степени тяжести 85,16% ($\chi^2=6,39$; p=0,01). Также, в группе беременных с СЗРП 2-ой и 3-ей степеней тяжести, зарегистрирована максимальная частота генотипа *10976GG FVII* (85,98%) в сравнении с женщинами контрольной группы - 56,10% ($\chi^2=26,80$; OR=4,80; 95%CI 2,51-9,29; p=0,001; $p_{cor}=0,003$) и беременными с СЗРП легкой степени тяжести - 71,09% ($\chi^2=6,66$; p=0,01; $p_{cor}=0,03$) (рис. 1). Наоборот, у индивидуумов с СЗРП 2-ой и 3-ей степени отмечается низкая концентрация генотипа *10976GA FVII* (14,02%) по сравнению с показателями контрольной группы 41,95% ($\chi^2=23,80$; OR=0,23; 95%CI 0,16-0,43; p=0,001; $p_{cor}=0,003$) и беременными с СЗРП легкой степени тяжести – 28,13% ($\chi^2=6,02$; p=0,015; $p_{cor}=0,045$).

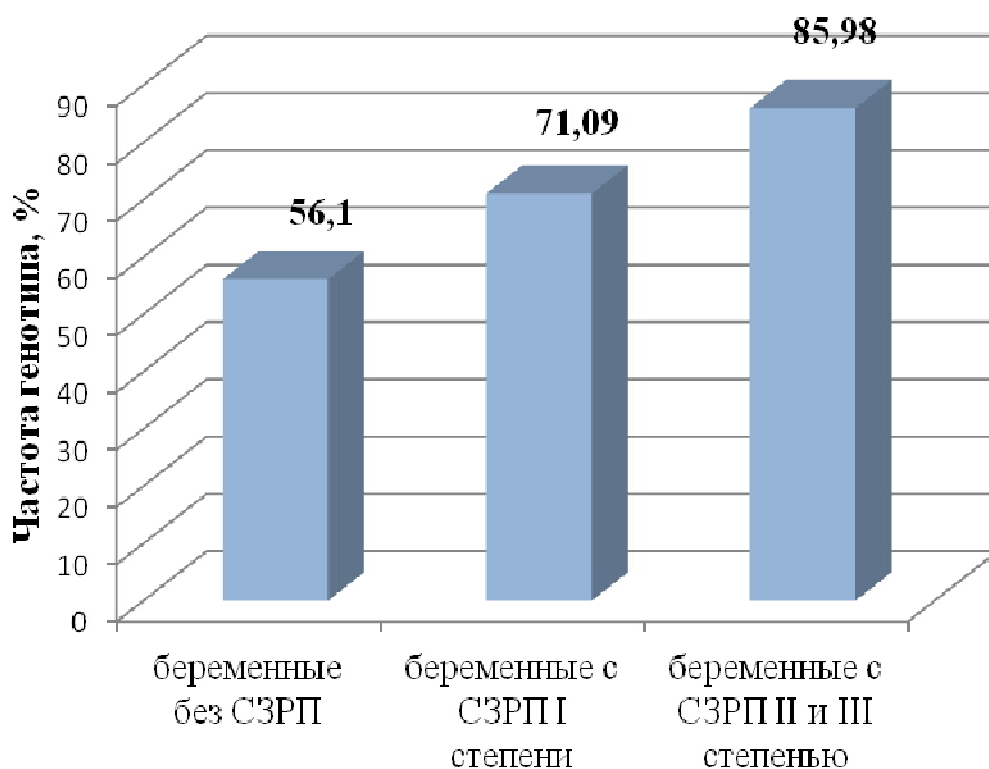


Рис. 1. Распространенность генотипа *10976GG FVII* среди беременных с СЗРП различной степени тяжести и беременных контрольной группы

Следует отметить, что с увеличением степени тяжести СЗРП происходит возрастание распространенности генетических вариантов *10976G FVII* (с 77,07% у беременных контрольной группы и 85,16% у женщин с СЗРП 1-ой степени до 92,99% у индивидуумов с СЗРП 2-3-ей степеней), *10976GG FVII* (с 56,10% у беременных контрольной группы и 71,09% у женщин с СЗРП 1-ой степени до 85,98% у индивидуумов с СЗРП 2-3-ей степеней) и снижение частоты генотипа *10976GA FVII* (с 41,95% у беременных контрольной группы и 28,13% у женщин с СЗРП 1-ой степени до 14,02% у индивидуумов с СЗРП 2-3-ей степеней).

На следующем этапе нашей работы изучены связи генов-кандидатов с состоянием новорожденных, которое оценивали в соответствии с показателями шкалы Апгар. Среди 497 обследованных пациенток у 332 (66,80%) новорожденных отсутствовали признаки асфиксии новорожденного, у 145 (29,18%) отмечалась асфиксия легкой степени тяжести, у 16 (3,22%) - асфиксия средней степени тяжести. Асфиксия различной степени тяжести достоверно чаще встречалась у новорожденных от пациенток с плацентарной недостаточностью и СЗРП (47,60%) по сравнению с новорожденными пациенток контрольной группы (17,00%) ($\chi^2=51,72$; $p=0,001$).

Установлено, что у новорожденных чьи матери имеют генотип *10976 GG FVII* в 1,5 раза чаще развивается асфиксия (36,39%) по сравнению с новорожденными, матери которых имеют генотипы *10976 GA FVII* и *10976 AA FVII* (23,94%) ($\chi^2=6,23$; $p=0,01$). Выявлено, что концентрация аллеля *10976G FVII* достоверно выше в группе родильниц с новорожденными с признаками асфиксии (87,97%), по сравнению с женщинами, имеющими новорожденных без признаков асфиксии (81,02%) ($\chi^2=5,42$; $p=0,02$).

Таким образом, аллель *10976G FVII* и генотип *10976 GG FVII* являются факторами риска рождения детей в асфиксии (OR=1,65 и OR=1,82; соответственно).

Вероятным медико-биологическим обоснованием полученных данных может быть то, что повышенное содержание VII фактора, ассоциированное с генетическим вариантом *10976GG FVII*, может приводить к гиперкоагуляции и тромботическим осложнениям [Nour M. et al., 2005; Shanker J. et al., 2009; Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2009; Lopaciuk S. et al., 2010; Lopaciuk S. et al., 2010], в том числе к развитию микротромбирования сосудов плацентарного ложа [Макацария А.Д. и др., 2007; Серов В.Н. и др., 2011], обуславливая развитие плацентарной недостаточности с СЗРП и асфиксию новорожденных.

2. Анализ вклада сочетаний генов факторов коагуляции в генетическую предрасположенность к развитию хронической плацентарной недостаточности с СЗРП

Проведенный биоинформатический анализ показал, что комбинация генотипа *10976GG FVII* и аллеля *-455G FI* является фактором риска развития

плацентарной недостаточности с СЗРП (OR=2,75, 95% CI 1,84-4,12). Данное сочетание встречается у 74,46% беременных с СЗРП по сравнению с 51,47% в контрольной группе ($p=0,00004$, $p_{cor}=0,0002$).

Сочетание таких генетических маркеров как *20210G FII*, *10976A FVII*, *-455 G FI*, которое наблюдается у 19,82% беременных с СЗРП и у 44,51% контрольной группы, является протективным фактором в отношении развития плацентарной недостаточности с СЗРП ($p=0,000009$, $p_{cor}=0,00007$, OR=0,31, 95% CI 0,20-0,48). Другим протективным фактором развития СЗРП является сочетание аллелей *20210G FII* и *10976A FVII*, которое встречается у 22,47% пациенток с СЗРП и у 47,40% беременных контрольной группы ($p=0,00001$, $p_{cor}=0,00004$, OR=0,32, 95% CI 0,21-0,50). Комбинация аллелей *-455G FI* и *10976A FVII*, зарегистрированное у 19,91% беременных с СЗРП и у 42,16% контрольной группы также является протективным фактором развития ПН с СЗРП ($p=0,00003$, $p_{cor}=0,0001$, OR=0,34, 95% CI 0,22-0,52).

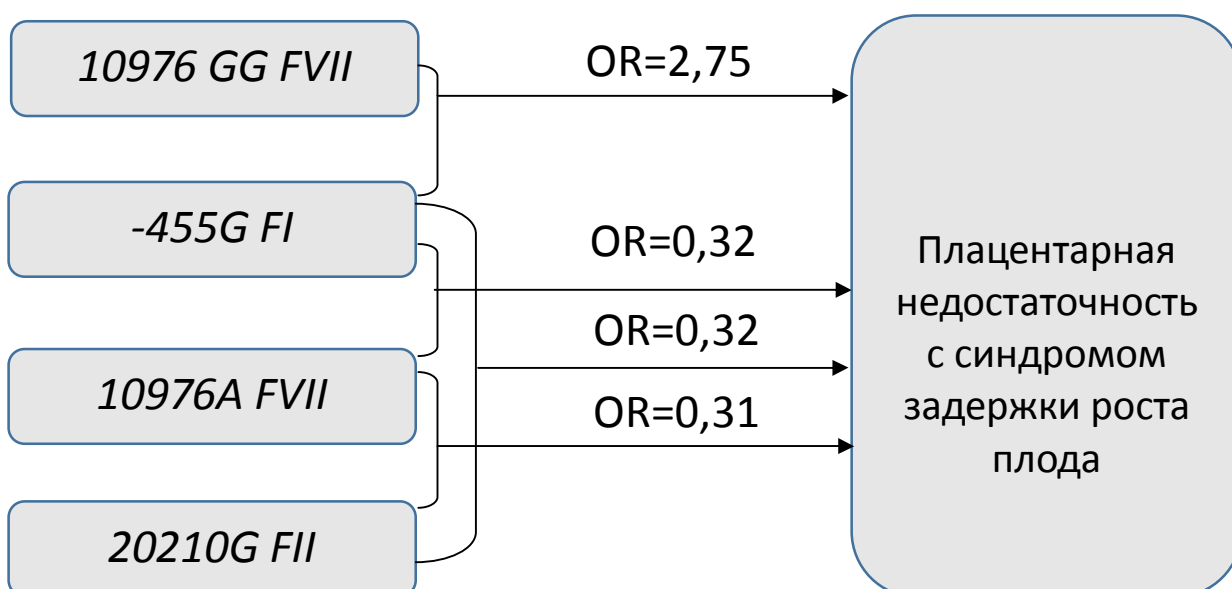


Рис. 2. Влияние сочетаний генетических вариантов факторов коагуляции на развитие плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода

Также установлен ряд протективных комбинации изучаемых генетических маркеров факторов коагуляции в отношении развития плацентарной недостаточности с СЗРП 2-3-ей степеней тяжести. Так, сочетание генотипа *20210GG FII* и аллеля *10976A FVII* среди беременных с СЗРП средней и тяжелой степеней встречается в 13,08%, а в контрольной группе частота этой комбинации генетических вариантов составила 46,82% ($p=0,0000001$, $p_{cor}=0,0000006$, OR=0,17, 95% CI 0,09-0,32). Распространенность сочетания аллелей *20210G FII*, *10976A FVII* с генотипом *1691GG FV* в группе беременных с СЗРП средней и тяжелой степеней равняется 13,21%, что существенно ниже аналогичного показателя беременных без СЗРП - 46,99% ($p=0,0000002$, $p_{cor}=0,0000024$, OR=0,17, 95% CI 0,09-0,33). Комбинация аллелей *20210G FII* и *10976A FVII* среди

пациенток с СЗРП средней и тяжелой степенью составляет 14,02% тогда как в контрольной группе этот показатель равен 47,40% ($p=0,0000003$, $p_{\text{cor}}=0,000012$, $OR=0,18$, 95% CI 0,10-0,33).

Следует отметить, что полученные с помощью биоинформатических подходов результаты согласуются с ранее полученными нами данными о важном патогенетическом значении генетического полиморфизма *10976G/A FVII* в формировании хронической плацентарной недостаточности с СЗРП.

3. Ассоциации генетических полиморфизмов факторов коагуляции с клинико-лабораторными показателями у беременных

Изучены ассоциации генетических вариантов факторов коагуляции с клинико-лабораторными показателями у беременных ($n=497$). Для описания данных количественных показателей применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75) (уровень значимости для критерия Шапиро-Уилка $p<0,05$), так как их распределение отличается от нормального.

Установлено, что, во-первых, молекулярно-генетический маркер *-455 G/A FI* ассоциирован с показателем АЧТВ: у индивидуумов с генотипами *-455 GA FI* и *-455 AA FI* (медиана – 30,76 с; нижний квартиль – 28,00 с; верхний квартиль – 33,00 с) наблюдается статистически достоверное укорочение активированного частичного тромбопластинового времени по сравнению с беременными с генотипом *-455 GG FI* (медиана – 30,93 с; нижний квартиль – 28,00 с; верхний квартиль – 33,00 с; $p=0,01$).

Во-вторых, беременные с генотипами *-455 GA FI* и *-455 AA FI* имеют более низкий показатель международного нормализованного отношения (медиана – 1,01; нижний квартиль – 1,00; верхний квартиль – 1,00) по сравнению с женщинами, имеющими генотип *-455 GG FI* (медиана – 1,02; нижний квартиль – 1,00; верхний квартиль – 1,00; $p=0,045$).

В-третьих, у беременных с генотипами *-455 GA FI* и *-455 AA FI* активность антитромбина-III составляет – 86,96 % (нижний квартиль – 80,00%; верхний квартиль – 90,00%), что статистически достоверно ниже аналогичного показателя индивидуумов с генотипом *-455 GG FI* (медиана – 87,68%; нижний квартиль – 80,00%; верхний квартиль – 90,00%; $p=0,02$).

В-четвертых, содержание РФМК у женщин с генотипом *10976GG FVII* (медиана – 22,00 мг/100мл, нижний квартиль - 20,00 мг/100мл, верхний квартиль - 26,00 мг/100мл) выше по сравнению с беременными, имеющими генотипы *10976GA FVII* и *10976AA FVII* (медиана – 20,00 мг/100мл, интерквартильный размах 10,00 – 22,00 мг/100мл; $p=0,001$) (рис.3).

В группе беременных с плацентарной недостаточностью и СЗРП, имеющих генотипы *-455 GA FI* и *-455 AA FI* наблюдается статистически достоверный более высокий уровень фибриногена (медиана – 4,7 г/л, нижний квартиль - 4,0 г/л, верхний квартиль - 5,5 г/л) по сравнению с индивидуумами с генотипом *-455 GG FI* (медиана – 4,5 г/л, интерквартильный размах - 4,0-5,1 г/л; $p=0,04$).

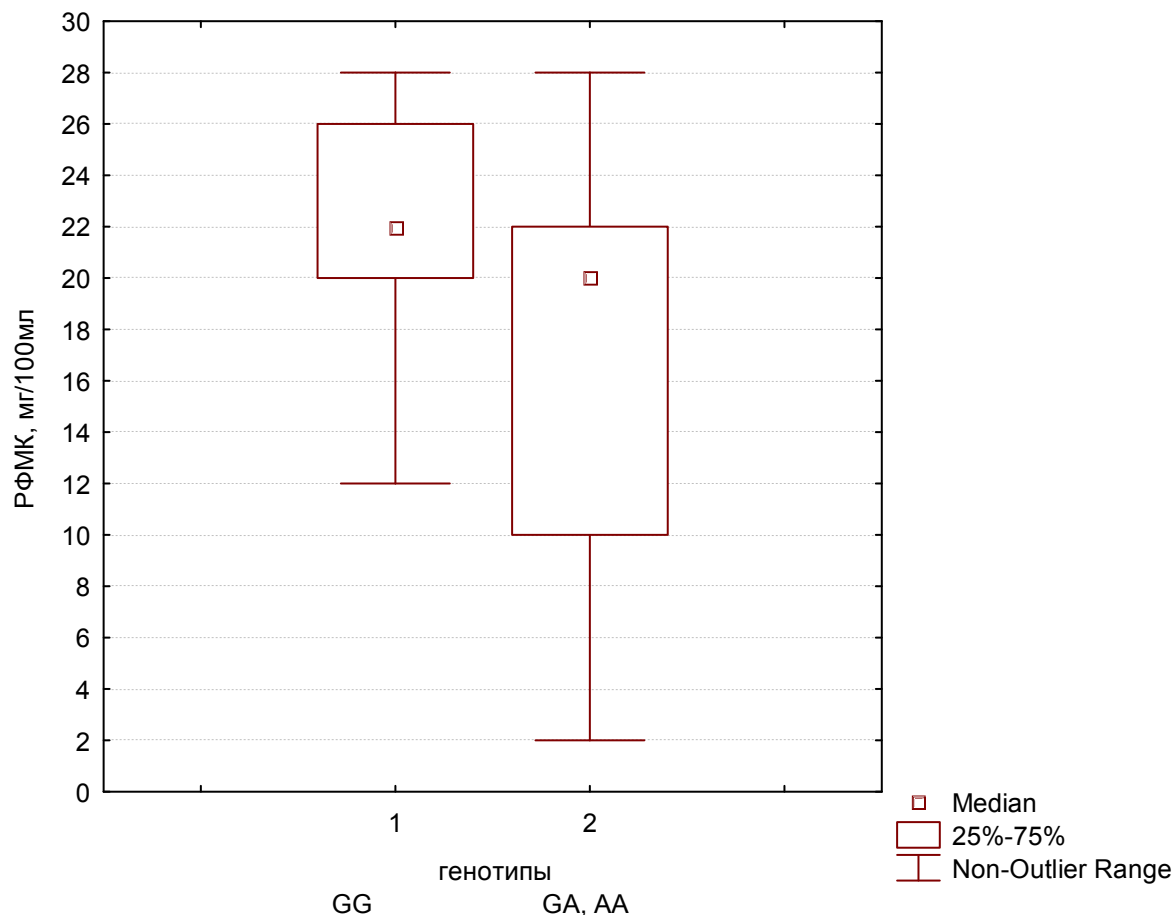


Рис. 3. Ассоциации генетического полиморфизма *10976G/A FVII* с содержанием растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) у беременных

В основе выявленных ассоциаций полиморфных локусов *-455 G/A FI* и *10976G/A FVII* с отдельными клинико-лабораторными характеристиками у беременных могут лежать следующие медико-биологические механизмы. Из литературных данных известно, что полиморфизм *-455 G/A FI* ассоциирован с повышенным уровнем фибриногена [Макацария А.Д. и др., 2007], а гиперфибриногемия отмечается при гиперкоагуляции [Окороков А.Н., 2003]. Образование растворимых фибрин-мономерных комплексов (комплексы, образованные фибрин-мономерами и олигомерами и продуктами деградации фибрина) также является следствием внутрисосудистого свертывания крови [Окороков А.Н., 2003]. Проконвертин (VII фактор коагуляции) является одним из ключевых факторов в каскаде свертывания крови [Окороков А.Н., 2003] и у гетерозиготных индивидуумов по локусу *10976G/A FVII* наблюдается снижение концентрации фактора VII в крови примерно на 25%, а при гомозиготном варианте *10976AA FVII* - снижение концентрации фактора примерно на 50% по сравнению с носителями варианта *10976GG FVII* [Макацария А.Д. и др., 2007; Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2009]. Повышенное содержание данного фактора может приводить к гиперкоагуляции и тромботическим осложнениям [Nour

M. et al., 2005; Shanker J. et al., 2009; Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2009; Lopaciuk S. et al., 2010; Lopaciuk S. et al., 2010].

4. Разработка модели прогнозирования риска развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода

Разработка способов прогнозирования плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода при прегравидарной подготовке или на ранних сроках беременности является актуальной задачей ввиду особой медико-социальной значимости данных осложнений беременности [Серов В.Н. и др., 2011]. Нами с помощью методов математического моделирования (дискриминантный анализ) [Реброва О.Ю., 2006] разработана модель прогноза риска развития плацентарной недостаточности с СЗРП.

Для исследуемых групп беременных (с плацентарной недостаточностью и синдромом задержки роста плода и без плацентарной недостаточности и СЗРП) были получены две статистически значимые дискриминантные функции, включающие следующие предикторы: генетический вариант по локусу *10976G/A FVII* ($p=0,006$), наличие отягощенного акушерского анамнеза у матери пациентки ($p=0,023$), отягощенного тромботического анамнеза у родственников пациентки ($p=0,022$), вес ребенка в предыдущих родах ($p=0,00001$), наличие неразвившейся беременности и выкидышей в анамнезе ($p=0,003$), рост матери ($p=0,0002$). Точность распознавания индивидуумов относящихся к группе больных с плацентарной недостаточностью и СЗРП составляет 77,48%, а без плацентарной недостаточности и СЗРП – 74,42%. В среднем процент правильных дискриминаций в группы пациенток с плацентарной недостаточностью и СЗРП и без нее составляет 76,14%.

С помощью полученных коэффициентов дискриминантных функций, на основе данных о предикторах формирования плацентарной недостаточности с СЗРП у конкретной женщины можно определить ее вероятную принадлежать к группе пациенток с плацентарной недостаточностью и СЗРП или индивидуумов без плацентарной недостаточности и СЗРП.

Полученные нами уравнения линейных дискриминантных функции (ЛДФ) имеют следующий вид:

- для отнесения в группу пациенток с плацентарной недостаточностью и СЗРП

$$y = -394,167 + 15,060x_1 - 0,002x_2 + 4,653x_3 + 6,489x_4 + 6,144x_5 - 1,345x_6 + 4,673x_7$$

- для отнесения в контрольную группу (без плацентарной недостаточности и СЗРП)

$$y = -382,114 + 16,138x_1 - 0,001x_2 + 4,543x_3 + 5,384x_4 + 4,321x_5 - 1,033x_6 + 4,543x_7,$$

где x_1 – генетический вариант по локусу *10976G/A FVII* (1 – генотип *10976 GG FVII*, 2 – генотипы *10976 GA* и *10976 AA FVII*), x_2 – вес ребенка в предыдущих родах (в граммах), x_3 – рост женщины (в сантиметрах), x_4 – отягощенный тромботический анамнез среди родственников пациентки (1 – наличие, 0 – отсутствие), x_5 – отягощенный акушерско-гинекологический

анамнез у матери пациентки (1- наличие, 0 - отсутствие), x_6 – наличие неразвивающейся беременности в анамнезе (1- наличие, 0 - отсутствие), x_7 – выкидыши в анамнезе (1- наличие, 0 – отсутствие).

В вышеуказанные уравнения ЛДФ подставляются значения соответствующих показателей у конкретной женщины и рассчитываются новые признаки – y . Индивидуума следует отнести в ту группу беременных (с СЗРП или без СЗРП), для которой новый признак y является максимальным [Боровиков В.П., 2001].

Например, у беременной женщины А. по данным молекулярно-генетического обследования выявлен генотип *10976GG FVII* (1), отсутствовали неразвивающаяся беременность и выкидыши в анамнезе (0) и наблюдались отягощенные тромботический и акушерско-гинекологический анамнезы (1), рост женщины 152 см, вес ребенка в предыдущих родах 2200. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак y .

$$y \text{ (для беременных с СЗРП)} = -394,167+15,060x_1-0,002x_2+4,653x_3+6,489x_4+6,144x_5-1,345x_6+4,673x_7 = -394,167+15,060*1-0,002*2200+4,653*152+6,489*1+6,144*1-1,345*0+4,673*0 = 345,182$$

$$y \text{ (для пациенток с физиологической беременностью)} = -382,114+16,138x_1-0,001x_2+4,543x_3+5,384x_4+4,321x_5-1,033x_6+4,543x_7 = -382,114+16,138*1-0,001*2200+4,543*152+5,384*1+4,321*1-1,033*0+4,543*0 = 336,465$$

Максимальное значение нового признака y для данной пациентки выявлено при расчётах в уравнении ЛДФ для индивидуумов с плацентарной недостаточностью и СЗРП, что позволяет отнести эту беременную в группу женщин с плацентарной недостаточностью и СЗРП. Дальнейшее детальное клиничко – лабораторное обследование данной пациентки подтвердило наш прогноз - у пациентки А. имела место плацентарная недостаточность с СЗРП, роды произошли на сроке 38 недель, плодом весом 2630 грамм.

Другой пример, у беременной женщины В. по данным молекулярно-генетического обследования выявлен генотип *10976GA FVII* (2), имелась неразвивающаяся беременность в анамнезе (1), отсутствовали выкидыши в анамнезе (0) и не наблюдались отягощенные тромботический и акушерско-гинекологический анамнезы (0), рост женщины 167 см, вес ребенка в предыдущих родах 3700. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак y .

$$y \text{ (для беременных с СЗРП)} = -394,167+15,060x_1-0,002x_2+4,653x_3+6,489x_4+6,144x_5-1,345x_6+4,673x_7 = -394,167+15,060*2-0,002*3700+4,653*165+6,489*0+6,144*0-1,345*1+4,673*0 = 394,950$$

$$y \text{ (для пациенток с физиологической беременностью)} = -382,114+16,138x_1-0,001x_2+4,543x_3+5,384x_4+4,321x_5-1,033x_6+4,543x_7 = -382,114+16,138*2-0,001*3700+4,543*165+5,384*0+4,321*0-1,033*1+4,543*0 = 395,024$$

Максимальное значение нового признака у для данной пациентки выявлено при расчётах в уравнении ЛДФ для индивидуумов с физиологическим течением беременности, что позволяет отнести эту беременную в группу женщин без СЗРП. Дальнейшее детальное клиничко – лабораторное обследование данной пациентки подтвердило наш прогноз - у пациентки В. беременность не осложнилась развитием плацентарной недостаточности с СЗРП и роды произошли на сроке 40 недель плодом, массой 3650 грамм.

Разработанная нами модель даёт возможность раннего прогнозирования развития плацентарной недостаточности и СЗРП, что позволит улучшить качество прегравидарной подготовки женщин и будет способствовать эффективной реализации своевременных лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению плацентарной недостаточности и СЗРП.

Выводы

1. Генетические маркеры наследственных тромбофилий *1691G/A FV*, *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI* ассоциированы с развитием хронической плацентарной недостаточности с СЗРП, ее степенью тяжести, клиничко-лабораторным статусом беременных и состоянием новорожденных.

2. Генетическими факторами повышенного риска развития плацентарной недостаточности с СЗРП и рождения детей в асфиксии являются аллель *10976G FVII* (OR=2,34 и OR=1,65 соответственно) и генотип *10976GG FVII* (OR=2,75 и OR=1,82 соответственно), а протективное значение имеет генотип *10976GA FVII* (OR=0,38). У беременных с плацентарной недостаточностью с СЗРП средней и тяжелой степенями тяжести концентрации генетических вариантов *10976G FVII* (92,99%) и *10976GG FVII* (85,98%) наибольшие.

3. Комбинация генотипа *10976GG FVII* с аллелем *-455G FI* является фактором риска развития плацентарной недостаточности с СЗРП (OR=2,75). Протективным эффектом в отношении развития плацентарной недостаточности с СЗРП обладают сочетания аллелей *20210G FII*, *10976A FVII*, *-455G FI* (OR=0,31), *20210G FII* и *10976A FVII* (OR=0,32), *-455G FI* и *10976A FVII* (OR=0,32). Риск развития СЗРП средней и тяжелой степеней тяжести у беременных с комбинациями генетических вариантов *20210GG FII* и *10976A FVII* (OR=0,17), *20210G FII*, *10976A FVII*, *1691GG FV* (OR=0,17), *20210G FII* и *10976A FVII* (OR=0,18) наименьший.

4. Генетические варианты *-455 GA* и *-455 AA FI* ассоциированы с укорочением активированного частичного тромбопластинового времени, снижением международного нормализованного показателя, низкой активностью антитромбина-III, а генотип *10976GG FVII* связан с повышенным содержанием растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови у беременных. У женщин с плацентарной недостаточностью и

СЗРП повышенный уровень фибриногена маркируется генотипами *-455 GA* и *-455 AA FI*.

5. Предикторами развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода являются генетические варианты по локусу *10976G/A FVII*, отягощенный акушерский анамнез у матери пациентки, отягощенный тромботический анамнез у родственников пациентки, вес детей в предыдущих родах, рост пациентки, наличие неразвившейся беременности и выкидышей в анамнезе.

Практические рекомендации

1. С целью формирования на прегравидарном этапе и ранних сроках беременности групп высокого риска по развитию плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода проводить молекулярно-генетическое тестирование факторов коагуляции *20210G/A FII*, *10976G/A FVII*, *-455 G/A FI*, *1691G/A FV*.

2. Для индивидуального прогнозирования риска развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода использовать уравнения линейных дискриминантных функции, включающие в себя следующие предикторы плацентарной недостаточности и СЗРП: генетический вариант по локусу *10976G/A FVII*, отягощенный акушерский анамнез у матери пациентки, отягощенный тромботический анамнез у родственников пациентки, вес ребенка в предыдущих родах, наличие неразвившейся беременности и выкидышей в анамнезе, рост матери.

3. При обследовании беременных в качестве маркеров повышенного риска развития гиперкоагуляции использовать генетические варианты *-455 GA* и *-455 AA FI*, *10976GG FVII*.

Список сокращений

F I - фактор коагуляции I

F II - фактор коагуляции II

F VII - фактор коагуляции VII

F V - фактор коагуляции V

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПН – плацентарная недостаточность

СЗРП – синдром задержки роста плода

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

ЛДФ –линейная дискриминантная функция

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Зарудская, О.М.** Роль наследственных и средовых факторов в развитии синдрома задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И. Чурносов // Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. – 2010. - №2. – С. 87-88. – (Материалы третьей международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения – 2010», Белгород, 11-12 ноября 2010 г.).
2. **Зарудская, О.М.** Клинико-генетические аспекты хронической плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И.Чурносов // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Репродуктология: новые технологии, проблемы перспективы» - Белгород, 2010. – С. 142-145.
3. **Зарудская, О.М.** Распространенность, клинические особенности синдрома задержки роста плода. Роль наследственных факторов / О.М. Зарудская, М.И.Чурносов // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвященной 76-летию Курского государственного медицинского университета – Курск, 2011. – Т.1. – С. 234-238.
4. **Зарудская, О.М.** Клинические особенности и роль наследственных факторов в развитии синдрома задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И.Чурносов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2011. - Специальный выпуск №1. – С. 26-27.
5. **Зарудская, О.М.** Клинические особенности течения и исходы беременности у женщин с плацентарной недостаточностью и синдромом задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И. Чурносов // Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2012. - Специальный выпуск № 1. – С. 51.
6. **Зарудская, О.М.** Клинические, патоморфологические и генетические особенности хронической плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода у женщин Центрального черноземья / О.М. Зарудская, М.И. Чурносов // Молодежь и медицинская наука в XXI веке: сборник трудов XIII-ой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 25-летию Кировской государственной медицинской академии. – Киров, 2012.–С. 37-38.
7. Кокорина, О.С. Изучение биохимических показателей крови у женщин с хронической плацентарной недостаточностью с синдромом задержки роста плода / О.С. Кокорина, **О.М. Зарудская** // Молодежная наука и современность: материалы 77-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Курск, 2012. – Ч.2. – С. 85.
8. **Зарудская, О.М.** Роль наследственной тромбофилии в развитии хронической фето-плацентарной недостаточности и синдрома внутриутробной задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И. Чурносов //

Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. – 2012. – № 10 (129), вып. 18. – С.132-136.

9. **Зарудская, О.М.** Клинико-генетическая характеристика женщин с плацентарной недостаточностью и синдромом внутриутробной задержки роста плода. Роль полиморфизма *10976G/A FVII* / О.М. Зарудская, О.С. Кокорина, М.И. Чурносков // Актуальные вопросы современной клинической и экспериментальной медицины: сборник трудов X научно-практической конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых, посвященной 10-летию Института последипломного медицинского образования. - Белгород, 2012. – С. 60.

10. Чурносков, М.И. Ассоциация полиморфизма *10976G/A FVII* фактора коагуляции с плацентарной недостаточностью и синдромом задержки роста плода / М.И. Чурносков, **О.М. Зарудская**, О.С. Кокорина // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: материалы III международной научно-практической конференции. - Казань, 2012. – С.320-321.

11. **Зарудская, О.М.** Ассоциация полиморфизма *1691 G/A FV* с развитием синдрома задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И. Чурносков // Вестник Российского государственного медицинского университета. –2013. - Специальный выпуск № 2. – С. 188-189.

12. **Зарудская, О.М.** Ассоциация полиморфизма *-455 G/A FI* с развитием синдрома задержки роста плода / О.М. Зарудская, М.И. Чурносков // Здоровье женщины – здоровье нации: материалы VI межрегиональной научно-практической конференции с международным участием для врачей акушеров-гинекологов. – Белгород, 2013. – С. 11-12.

13. **Зарудская, О.М.** Ассоциация полиморфизма *10976G/A FVII* (rs 6046) с развитием плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода / О.М. Зарудская //Материалы VII международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, 2013. – С. 137-138.

14. **Зарудская, О.М.** Роль наследственной тромбофилии в генезе осложненного течения беременности / О.М. Зарудская, М.И. Чурносков // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 7. - С. 4-7.