

УДК 618.3–008.6–037:575.113:548.33

© Т. А. Лоскутова, 2013.

СПОСОБ ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У БЕРЕМЕННЫХ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА АНГИОТЕНЗИНОГЕНА II 235 М→Т

Т. А. Лоскутова

Кафедра акушерства и гинекологии (зав. – профессор В. А. Потапов), Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины»; 49044, Украина, г. Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9; E-mail: loskutovata@gmail.com

ASSESSMENT OF THE HYPERTENSIVE DISORDER RISKS IN PREGNANT WOMEN WITH POLYMORPHISM OF ANGIOTENSINOGEN II 235 M→T

T. A. Loskutova

SUMMARY

The author has performed genetic testing for the presence of gene polymorphisms in angiotensinogen II 235 M→T, determined the level of antiphospholipid antibodies and the state of the system of hemostasis in pregnant women with preeclampsia of different severity. Based on these data, the author has determined the dependencies that allow calculating the probability of developing preeclampsia. The method has high sensitivity and specificity and covers individual characteristics of each woman.

СПОСІБ ОЦІНКИ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ГІПЕРТЕНЗИВНИХ РОЗЛАДІВ У ВАГІТНИХ З ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА АНГІОТЕНЗИНОГЕНА II 235 М→Т

Т. О. Лоскутова

РЕЗЮМЕ

В роботі було проведено генетичне тестування на наявність поліморфізму в гені ангіотензиногену II 235 М→Т, дослідження рівня антифосфоліпідних антитіл та стану системи гемостазу у вагітних з преєклампсією різного ступеня. На підставі отриманих даних було створено залежності, що дозволяють розрахувати імовірність розвитку преєклампсії. Спосіб має високу чутливість та специфічність, враховує індивідуальні особливості кожної жінки.

Ключевые слова: беременность, гипертензивные нарушения, преэклампсия, полиморфизм генов, гемостаз, антифосфолипидные антитела, прогнозирование, степень тяжести.

Преэклампсия, являясь мультифакторным заболеванием, имеет целый ряд генов предрасположенности, которые вовлечены в сложный процесс регулирования многообразных функций эндотелия [1]. Исследование генов восприимчивости к преэклампсии является актуальным, основано на наиболее широко принятых гипотезах ее патогенеза: неполная инвазия трофобласта и генерализированная дисфункция эндотелия. В контроле уровня артериального давления важную роль играет полиморфизм в гене ангиотензиногена II 235 М→Т (AGT). Мутация детерминирует повышенный уровень экспрессии ангиотензиногена, существенно меняет взаимодействие ангиотензиногена с ренином и ангиотензинпревращающим ферментом, что может вызвать развитие преэклампсии у беременных-носителей мутации [2]. Наличие мутации в гене ангиотензиногена II увеличивает риск развития не только преэклампсии, но и таких осложнений, как отслойка плаценты [10]. Поэтому актуальным является поиск маркеров, позволяющих прогнозировать вариант течения преэклампсии, степень тяжести

преэклампсии и акушерских осложнений, что позволит провести адекватную профилактику, решить вопрос о возможности продолжения беременности или поставить вопрос о досрочном родоразрешении. Целью исследования явилась разработка способа оценки риска развития гипертензивных нарушений при беременности с учетом наличия полиморфизма в гене ангиотензиногена II 235 М→Т.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для реализации поставленной цели было проведено исследование случай-контроль 177 женщин в третьем триместре беременности. 133 женщины относились к основной группе исследования. Основная группа в зависимости от степени тяжести преэклампсии была разделена на клинические подгруппы. В подгруппу 1А вошло 64 беременные с гестационной артериальной гипертензией или преэклампсией легкой степени. В подгруппу 1В – 69 беременных с преэклампсией средней или тяжелой степени тяжести. Беременные были разделены по группам на основании величины артериального давления, уровня протеинурии, дополнительных

исследований и в соответствии с клиническим протоколом МОЗ Украины № 676 [3]. Контрольную группу сформировали 44 женщины в третьем триместре с физиологическим течением беременности.

Определение Д-димера в плазме крови проводили на основании иммунотурбодиметрического анализа с помощью латекс-теста «Tina-quant a D-Dimer» (Roche Diagnostics, США) на системе Roche/Hitachi Cobas с 6000.

Исследование генетических полиморфизмов проводили с помощью аллельспецифической полимеразной цепной реакции, с последующей детекцией методом электрофореза в 3% агарозном геле. Использовался комплект реагентов «SNP-экспресс» производства НПФ «Литех» (Россия) для определения полиморфизмов в геноме человека: AGT 235 M→T в гене ангиотензиногена II.

Определение суммарных антител к кардиолипину проводилось с помощью иммуноферментной тест-системы производства «Гранум», г. Харьков. Определение суммарных антител классов IgM и IgG к β2 гликопротеину 1 (ГП1), протромбину и антител классов IgM и IgG к аннексину V проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке крови с помощью реагентов производства «Orgentec Diagnostica GmbH» (Германия).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере. Для вычислений использовали компьютерные программы Microsoft Excel 2010 и Graph Pad Prism 5 for Windows, методы аналитической и вариационной статистики. Правомочность вы-

двинутых положений оценивали при помощи статистических критериев. t-критерий использовали для сравнения средних значений независимых выборок. Для сравнения непараметрических параметров, частот использовали критерий χ^2 и отношение шансов. Для удобства расчетов каждому генотипу (нормальная гомозигота, гетерозигота и патологическая гомозигота) был присвоен номер 1, 2 и 3 соответственно. За значимый брали уровень достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что развитие преэклампсии сопровождается повышением уровня Д-димера, что свидетельствует о наличии внутрисосудистого тромбообразования. В 1А группе ($1,13 \pm 0,09$ мг/мл) уровень Д-димера больше в 2,35 раза ($p < 0,0001$), а в 1В – в 3,17 раза ($1,52 \pm 0,18$ мг/мл, $p < 0,0001$), чем в контроле ($0,48 \pm 0,03$ мг/мл), в 1В – в 1,35 раза больше, чем в 1А группе ($p < 0,05$). Определение повышенного уровня Д-димера прямо указывает на наличие патологически активного фибрина и существование в хронической форме синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания. Установлено, что повышенный уровень Д-димера в фертильном цикле и в I триместре беременности выявляется у 40,00% пациенток группы риска акушерских (синдром привычной потери плода, преэклампсия, преждевременная отслойка плаценты) и тромботических осложнений [4]. А среди беременных с тяжелой преэклампсией выявлено достоверное снижение количества антитромбина III, увеличение комплекса ингибитора плазмينا, Д-димера, комплексов тромбин-антитромбин [8].

Таблица 1

Анализ генных полиморфизмов у беременных с преэклампсией

Группы исследования	Генотип, %			Аллели, %	
	MM	MT	TT	M	T
ANG 235 M→T					
1А группа (n=64)	37,50	34,38	28,13*	54,69	45,31*
1В группа (n=69)	24,64*	49,28	26,09*	49,28	50,72*
Контроль (n=44)	47,73	43,18	9,09	69,32	30,68

Примечание: * – достоверное отличие с показателем контрольной группы ($p < 0,05$).

В результате проведенного исследования установлено (табл. 1), что в подгруппе с гестационной артериальной гипертензией и преэклампсией легкой степени монозиготные носители гена ангиотензиногена II T235T встречались в 3,1 раза чаще (ОШ=3,58, ДИ 1,18-10,9, $p < 0,05$), а в группе с преэклампсией средней и тяжелой степени – в 2,9 раза чаще (ОШ=3,23, ДИ 1,09-10,09, $p < 0,05$), чем в контрольной группе. Подобные результаты получены и в других исследованиях [6, 9]. Мета-анализ R. Lin et al. (2012) демонстрирует досто-

верную связь между полиморфизмом ANG M235T (31 исследование, включавшее 2555 пациентов и 6114 группы контроля) и развитием преэклампсии. T235T генотип увеличивает риск преэклампсии в сравнении с M235M генотипом (ОШ=1,61, 95,00% ДИ 1,22-2,14, $p = 0,001$) [5].

Гетерозиготное состояние M235T достоверно по группам не отличалось и составляло 34,38% в 1А группе, 49,28% – в 1В группе и 43,18% – в контрольной группе. Наши исследования согласуются с работами других авторов, где указывается, что у

гетерозигот риск развития преэклампсии не достигает статистической значимости [11].

Особую важность представляет наличие и выявление антифосфолипидных антител при преэклампсии, так как они играют важную роль в повреждении сосудистой стенки, что лежит в основе патогенеза преэклампсии. Анализ уровня аутоантител у беременных с преэклампсией в сравнении с контролем представлен в таблице 2. Установлен достоверно более высокий уровень суммарных антител классов IgM, IgG к β_2 -гликопротеину 1 (β_2 -ГП 1), антител к аннексину V класса IgG. Антифосфолипидные антитела подавляют синтез простаглицлина клетками сосудистого эндотелия, стимулируют синтез

фактора Виллебранда, индуцируют активность тканевого фактора эндотелиальными клетками, стимулируют прокоагулянтную активность, ингибируют гепаринзависимую активацию антитромбина III и гепарин опосредованное образование антитромбин-3-тромбинового комплекса. β_2 -гликопротеин 1-зависимое связывание антифосфолипидных антител и эпителиальных клеток приводит к активации эндотелия, индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток, что увеличивает прокоагулянтную активность эндотелия. Все вышеперечисленное приводит к тотальному повреждению сосудистой стенки, гиперкоагуляции и проявлениям, свойственным преэклампсии [7, 12].

Таблица 2

Анализ уровня аутоантител у беременных с преэклампсией

Вид аутоантител	1А группа	1В группа	Контрольная группа
Суммарные антитела к β_2 ГП-1, Ед/мл	5,25±0,31*	6,52±0,46*	4,02±0,24
Кардиолипид, инд. реакции	0,76±0,09	0,86±0,16	0,99±0,24
Суммарные антитела к протромбину, Ед/мл	5,05±0,39	6,16±1,6	4,09±0,43
Аннексин V IgM, Ед/мл	2,12±0,23	2,29±0,19	2,76±0,5
Аннексин V IgG, Ед/мл	1,93±0,28	3,09±0,66*	1,79±0,21

Примечание: $p < 0,05$, * – достоверное отличие с показателями контрольной группы.

Проанализированные выше показатели легли в основу предлагаемого способа оценки развития гипертензивных нарушений при беременности. Для женщин с набором изучаемых параметров X_1, X_2, \dots, X_k в результате проведенного многофакторного анализа рассчитывали функцию риска по формуле $y = K + K_1 X_1 + K_2 X_2 + \dots + K_k X_k$, где коэффициенты K_1, K_2, \dots, K_k указывают на влияние того или иного фактора на вероятность развития преэклампсии у беременных. Оценка вероятности (P) развития заболевания для каждой конкретной женщины рассчитывали по формуле: $P(y) = 1 / (1 + e^{-y})$; где P – вероятность развития заболевания, y – полученное на предыдущем этапе значение функции риска, e – число Эйлера, равное 2,72.

На основании вышеуказанной методики проводили расчет вероятности развития преэклампсии легкой степени, преэклампсии средней или тяжелой степени и в общем преэклампсии. Результаты проведенных ранее клинических и лабораторных исследований свидетельствуют о том, что вклад проанализированных показателей, а также генетических маркеров в риск развития преэклампсии разный, отличается у гомо- и гетерозиготных носителей, зависит от особенностей сочетания, а для некоторых сочетаний риск вообще отсутствует.

В результате удалось получить следующие функции риска:

1. Для развития преэклампсии легкой степени:
 $y = -6,52 + 6,34 X_{\text{д-димер}} + 0,29 X_{\text{ANG}} + 0,48 X_{\text{At } \beta_2 \text{ ГП}}$ (1);

2. Для развития преэклампсии тяжелой степени:
 $y = -6,79 + 5,0 X_{\text{д-димер}} + 0,40 X_{\text{ANG}} + 0,45 X_{\text{At } \beta_2 \text{ ГП}} + 0,17 X_{\text{At аннексин V}}$ (2).

Если сравнить коэффициенты, то следует сделать вывод, что нет четкой дифференциации между группами с преэклампсией легкой и с преэклампсией тяжелой степени, что свидетельствует о том, что вне зависимости от степени тяжести преэклампсии в ее генезе лежат одинаковые причинные факторы. Поэтому были получены зависимости для определения риска развития преэклампсии вне зависимости от степени тяжести.

3. Для развития преэклампсии:

$y = -5,57 + 6,0 X_{\text{д-димер}} + 0,33 X_{\text{ANG}} + 0,42 X_{\text{At } \beta_2 \text{ ГП}} + 0,09 X_{\text{At аннексин V}}$ (3);

$y = -5,29 + 6,0 X_{\text{д-димер}} + 0,32 X_{\text{ANG}} + 0,41 X_{\text{At } \beta_2 \text{ ГП}}$ (4), где: $X_{\text{д-димер}}$ – уровень Д-димера, мг/мл, $X_{\text{At } \beta_2 \text{ ГП}}$ – количество антител к β_2 ГП, Ед/мл, $X_{\text{At аннексин V}}$ – количество антител IgG к аннексину V, Ед/мл; X_{ANG} – результаты генетического тестирования полиморфизмов в гене AGT II 235M→T, при котором нормальная гомозигота обозначается как 1, гетерозигота – 2, патологическая гомозигота – 3.

Подставив рассчитанное значение y в формулу $P(y) = 1 / (1 + 2,72^{-y})$, рассчитывается вероятность развития заболевания для конкретной пациентки.

При R более 0,8 риск развития преэклампсии является высоким.

Для каждой функции риска определяли чувстви-

тельность (sensitive – Se), специфичность (specific – Sp), прогностическую ценность (среднее чувствительности и специфичности) (табл. 3).

Таблица 3

Чувствительность, специфичность и прогностическая ценность выявленных зависимостей

Функции риска	Показатель, %		
	Se	Sp	Прогностическая ценность
Для развития преэклампсии легкой степени			
$y = -6,52 + 6,34X_{\text{Д-димер}} + 0,29X_{\text{ANG}} + 0,48X_{\text{At } \beta 2\text{ГП}}$	64,06%	97,73%	80,89%
Для развития преэклампсии тяжелой степени:			
$y = -6,79 + 5,0X_{\text{Д-димер}} + 0,40X_{\text{ANG}} + 0,45X_{\text{At } \beta 2\text{ГП}} + 0,17X_{\text{At аннексинуV}}$	68,12%	100,00%	84,06%
Для развития преэклампсии:			
$y = -5,57 + 6,0X_{\text{Д-димер}} + 0,33X_{\text{ANG}} + 0,42X_{\text{At } \beta 2\text{ГП}} + 0,09X_{\text{At аннексинуV}}$	78,20%	90,91%	84,55%
$y = -5,29 + 6,0X_{\text{Д-димер}} + 0,32X_{\text{ANG}} + 0,41X_{\text{At } \beta 2\text{ГП}}$	75,94%	97,73%	86,83%

Из полученных данных видно, что наибольшей чувствительностью (78,20%), то есть способностью определять положительный результат в группе больных, обладает функция риска для развития преэклампсии вне зависимости от степени тяжести, в которой учитывается уровень Д-димера, полиморфизм в гене AGT II 235 М→Т и уровень антифосфолипидных антител. Функция для прогнозирования преэклампсии тяжелой степени обладает наибольшей специфичностью (100,00%), то есть вероятностью того, что у здорового лица результат отрицательный. Все функции обладают высокой специфичностью и прогностической ценностью. Так как прогностическая ценность всех функций риска составляет более 80,00%, то они все являются отличными классификаторами.

Пример использования предложенного способа прогнозирования: беременная Т, результаты обследования: Д-димер = 1,14 мг/мл, антитела суммарные к β_2 ГП – 1=6,5 Ед/мл, антитела IgG к аннексину V=1,5 Ед/мл; результаты генетического тестирования – полиморфизм в гене AGT II M235T – гетерозигота (2). $y = -6,79 + 5,0X_{\text{Д-димер}} + 0,40X_{\text{ANG}} + 0,45X_{\text{At } \beta 2\text{ГП}} + 0,17X_{\text{At аннексинуV}}$; $y = -6,79 + 5,0 * 1,14 + 0,4 * 2 + 0,45 * 6,5 + 0,17 * 1,5 = 2,89$. Подставив рассчитанное значение y , в формулу $P(y) = 1 / (1 + 2,72^{-2,89})$ получаем значение 0,95. Таким образом, вероятность развития заболевания составляет 0,95, то есть риск развития преэклампсии является очень высоким.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного исследования установлено, что монозиготные носители гена ангиотензиногена II T235T имеют повышенный риск развития гипертензивных нарушений при беременности.

2. Существование полиморфизма генов «сосудистой системы» при одновременном суще-

ствовании антифосфолипидных антител может объяснять индивидуальные различия в течении преэклампсии.

3. Предложенный способ оценки риска развития гипертензивных нарушений при беременности позволяет оценить уровень генетической предрасположенности, степень повреждения эндотелия и гиперкоагуляции, индивидуальные различия для выявления пациенток группы риска, проведения у них профилактических мероприятий и своевременного пересмотра акушерской тактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макацария А. Д. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе. – М. : Триада X, 2003. – 904 с.

2. Охупкин М. Б. Преэклампсия: гемодинамический адаптационный синдром / М. Б. Охупкин, В. Н. Серов, В. О. Лопухин // Медицина неотложных состояний. – 2007. – № 3. – С. 79–83.

3. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги : Наказ МОЗ України №676 від 31.12.2004 р. – К., 2004.

4. Самбунова Н. В. Клиническое значение контроля маркеров активации свертывания крови при проведении противотромботической терапии у беременных, рожениц и родильниц с тромбофилией : автореф. дис. ... мед. наук : 14.00.01 / Самбунова Н. В. ; ГОУ ВПО «Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова» Росздрава. – М., 2008. – 26 с.

5. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms and susceptibility of pre-eclampsia: a meta-analysis. / R. Lin, Y. Lei, Z. Yuan [et al.] // Ann. Hum. Genet. – 2012. – Vol. 76, № 5. – P. 377–386.

6. Angiotensinogen gene M235T variant and pre-eclampsia in Romanian pregnant women / L. Procopciuc,

G. Jebeleanu, I. Surcel [et al.] // *Jornal of cellular and molecular medicine*. – 2002. – Vol. 6. – P. 383–388.

7. Anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I antibodies / I. Marai, A. Tincani, G. Balestrieri [et al.] // *Autoimmunity*. – 2005. – Vol. 38 (1). – P. 33–38.

8. Coagulation/fibrinolysis disorder in patients with severe preeclampsia / T. Kobayashi, N. Tokunaga, M. Sugimura [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* – 1999. – Vol. 25, № 5 – P. 451–454.

9. Medica I. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis / I. Medica, A. Kastrin, B. Peterlin // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2007. – Vol. 131 – P. 115–126.

10. Placental Abruption Is More Frequent in Women with the Angiotensinogen Thr235 Mutation / X. Q. Zhang, C. Croven, L. Nelson [et al.] // *Placenta*. – 2007. – Vol. 28 – P. 616–619.

11. The M235T variant of the angiotensinogen gene is related to development of self-reported hypertension during pregnancy: the Prospect-EPIC cohort study / M. H. Zafarmand, A. Franx, S. Sabour [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2008. – Vol. 31, № 7. – P. 1299–1305.

12. Yasuda S. Pathogenic roles of anti-beta2-GPI antibody in patients with antiphospholipid syndrome / S. Yasuda // *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. – 2004. – Vol. 27 (6). – P. 373–378.