

© А. В. Кобчикова, А. В. Арутюнян,
М. С. Зайнулина

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
г. Санкт-Петербург

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ГОМОЦИСТЕИНА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТРОМБОФИЛИИ У БЕРЕМЕННЫХ С ГЕСТОЗОМ

УДК: 618.3-008.6-07

■ Изучен уровень гомоцистеина, полиморфизм генов у 107 беременных с чистым и сочетанным гестозом различной степени тяжести, у 31 беременной с физиологическим течением гестационного процесса. Отмечено, что уровень гомоцистеина варьирует в зависимости от степени тяжести гестоза. Полученные данные подтверждают мнение, что гестоз является мультифакторным заболеванием с несколькими путями развития. Исследование полиморфизма генов, уровня гомоцистеина, способствует заблаговременному выявлению группы риска по развитию гестоза.

■ **Ключевые слова:** гипергомоцистеинемия; гестоз; наследственная тромбофилия.

Несмотря на большое количество исследований, направленных на изучение патогенеза гестоза, частота гестоза из года в год увеличивается и достигает 16–21 % [3].

На сегодняшний день хорошо известно, что гестоз — клиническая модель ДВС-синдрома, а в его развитии важное место занимают тромбофилические состояния.

Гипергомоцистеинемия в списке тромбофилий стоит несколько особняком. В отличие от других форм генетической тромбофилии при гипергомоцистеинемии нет исходных нарушений в системе гемостаза, они развиваются опосредованно, при сбое в работе ферментных систем, накоплении гомоцистеина в плазме крови, развитии окислительного стресса. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) при этом становится независимым фактором риска развития тромботических и акушерских осложнений (независимо от пола, возраста, диеты, наличия других генетических мутаций, предрасполагающих к тромбозам), что связано с развитием артериальных и венозных тромбозов [4, 5, 6, 2]. Ведущим патогенетическим звеном при ГГЦ, по мнению большинства исследователей, является дисфункция эндотелия. Дисфункция эндотелия при ГГЦ проявляется в угнетении его антикоагулянтных и активации прокоагулянтных свойств. Биохимической основой данного процесса является индуцируемый избытком гомоцистеина оксидантный стресс, увеличение продукции активных кислородных радикалов и нарушение способности к детоксикации перекисей [7, 9].

На сегодняшний день данные о частоте ГГЦ у беременных с гестозом, концентрации уровня гомоцистеина во время физиологической беременности, дозировки применения препаратов группы В имеют неоднозначный ответ.

С целью изучения закономерностей частоты и выраженности ГГЦ у пациенток с гестозом, а также оценки патогенетически обоснованных способов медикаментозной коррекции этого состояния выполнено обследование 143 беременных в третьем триместре.

Материалы и методы

Были сформированы 2 группы: контрольная и основная.

Контрольную группу составили беременные с физиологическим течением гестационного процесса — 31 женщина в возрасте от 20 до 37 лет, обследованные во всех трех триместрах беременности. Средний возраст пациенток в группе — $24,5 \pm 5,0$ лет. Критерием отбора явилось отсутствие хронических заболеваний, осложненного тромботического и акушерского анамнеза, а также семейного тромботического и акушерского анамнеза, кровотечений в анамнезе. Здоровые беременные женщины были обследованы при условии неосложненного течения данной беременности.

Основная группа включала беременных с подтвержденным диагнозом гестоза и составила 107 человек в возрасте от 18 до 37 лет.

Критерием включения в основную группу было наличие гестоза в III триместре.

Для получения достоверного результата в исследование основной и контрольной групп включали лишь беременных, по тем или иным причинам не принимающих фолиевую кислоту и другие витамины группы В на момент исследования, либо принимающие ее в дозах до 1 мг.

Средний возраст беременных в группе $25,4 \pm 4,7$ лет. Для оценки степени тяжести гестоза использовалась балльная оценка по шкале Виттлингера и Goucke в модификации Г. М. Савельевой (1998). В соответствии со степенью тяжести гестоза беременные основной группы были разбиты на три подгруппы. 1-я подгруппа включала 42 пациенток с гестозом легкой степени тяжести, 2-я — 35 пациенток с гестозом средней степени тяжести и 3-я подгруппа — 30 пациентки с гестозом тяжелой степени тяжести. Основная и контрольная группы были статистически однородны по возрасту, весу, сроку гестации и акушерско-гинекологическому анамнезу. Клиническое течение гестоза в основной группе проявлялось у 31 (28,9 %) в виде триады Цангемейстера, у 37 (34,6 %) — артериальной гипертензией и у 39 (36,5 %) — сочетанием артериальной гипертензии и выраженных отеков. У значительного числа пациенток отмечалось сочетание гестоза с ранее выявленной экстрагенитальной патологией: сердечно-сосудистые заболевания — у 55 (51,4 %), заболевание почек — 13 (12,1 %), нейроэндокринная патология — у 34 (31,8 %).

В соответствии с целями и задачами настоящей работы мы проводили исследование уровня гомоцистеина, генетических маркеров.

Срок гестации на момент исследования в основной группе $31,5 \pm 0,5$ недели, в контрольной группе $30,3 \pm 0,4$ недели.

Определение уровня гомоцистеина проводилось в плазме венозной крови беременных с помощью иммуноферментного метода Axis Haptocysteine EIA. У беременных с гестозом исследование на гомоцистеин проводили до начала лечения. Венозную кровь отбирали в охлажденные пробирки с ЭДТА натощак в утренние часы через 12 часов после последнего приема пищи. Это необходимо в связи с тем, что богатая белком пища приводит к повышению концентрации гомоцистеина на 15–20 %. Образцы немедленно центрифугировались, так как гомоцистеин выделяется из эритроцитов и лейкоцитов после забора крови.

Генотипирование полиморфизма С677Т в гене *MTHFR* проводили на основе амплификации

ДНК *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *MspI*.

Выявление мутации G1691A в гене коагуляционного фактора V (FV Leiden) проводили на основе амплификации ДНК *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *Mnl I*.

Выявление мутации G20210A в гене коагуляционного фактора II проводили на основе амплификации ДНК *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *Hind III*.

Генотипирование полиморфизма T1565C в гене *GpIIIa* проводили на основе амплификации ДНК *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *MspI*.

Генотипирование полиморфизма –675 4G/5G в гене *PAI-1* проводили на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *Bsc 4I*.

Генотипирование полиморфизма –455 G/A в гене β -субъединицы фактора свертывания I проводили на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8] с последующей обработкой ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции *NotI*.

Результаты и их обсуждение

Число первородящих и повторнородящих в основной группе 71 (66,4 %) и 36 (33,6 %), соответственно. В контрольной группе эти показатели составили 19 (61,3 %) и 12 (38,7 %) соответственно ($p > 0,05$).

Срок гестации на момент исследования в основной группе $31,5 \pm 0,5$ недели, в контрольной группе $30,3 \pm 0,4$ недели ($p > 0,05$).

Анализ акушерского анамнеза у беременных выявил высокую частоту таких акушерских осложнений как синдром задержки внутриутробного развития плода, самопроизвольные поздние аборт, преждевременные роды, антенатальная гибель плода (табл. 1). У беременных контрольной группы невынашивания отмечено не было.

Таким образом у беременных с гестозом процент самопроизвольных абортов, преждевременных родов, СЗРП, антенатальной гибели, мертворождения достоверно выше в сравнении с контрольной группой.

Таблица 1

Исходы предыдущих беременностей у обследованных беременных

Исходы беременностей	Основная группа n = 107	Контрольная группа n = 31
Медицинский аборт до 12 недель	45 (42 %)*	4 (12,9 %)
Самопроизвольный аборт до 12 недель	24 (22,43 %)	0
Самопроизвольный аборт от 12 до 27 недель	2 (1,9 %)	0
Преждевременные роды	6 (5,6 %)	1 (3,22 %)
Гестоз	37 (34,6 %)	0
ПОНРП	6 (5,6 %)	0
СЗРП	10 (9,3 %)	0
Антенатальная гибель плода	5 (4,67 %)	0
Мертворождения	1 (0,9 %)	0
* — различия достоверны в сравнении с контрольной группой (p < 0,01)		

Все пациентки обследованы на наличие у них гипергомоцистеинемии, других генетических и приобретенных тромбофилий. Структура выявленной патологии представлена в таблице 2.

Из приведенных данных мы видим, что суммарно гены наследственной тромбофилии того или иного генеза были выявлены у 100 % пациенток основной группы и 29 % в контрольной группе здоровых беременных (p < 0,01).

В основной группе достоверно чаще была частота гомозиготной мутации *MTFHR*, гетеро- и гомозиготной мутации А 2756G в гене метионин синтазы, гомозиготного и гетерозиготного (p < 0,005) полиморфизма гена *PAI-1*, гетерозиготных полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов *GPIIIa* (p < 0,005), *GPI* (p < 0,005), *GPIb* (p < 0,005), а также гетерозиготной мутации FV Leiden. В абсолютном большинстве случаев имела место мультигенная форма тромбофилии (88,8 %). В основной группе выявлено достоверно большее число пациенток с сочетанием полиморфизмов 3 и более (табл. 3). В контрольной группе данных пациенток выявлено не было.

Из данной таблицы следует, что сочетание 4 и более полиморфизмов или наличие мутации в факторе V или гене протромбина в сочетании с другими полиморфизмами встречается только при гестозе. В контрольной группе данных изменений выявлено не было.

При гестозе тяжелой степени тяжести в большем проценте случаев сочетается 4 и более по-

Таблица 2

Частота врожденных дефектов системы гемостаза женщин с гестозом

Показатель	Основная группа, n = 107 (%)	Контроль, n = 31 (%)
Мутация С677 → Т в гене <i>MTFHR</i>		
гомозиготная	18 (16,8 %)	0
гетерозиготная	47 (44%)*	4 (12,9 %)
Мутация А 2756G в гене метионин синтазы <i>MTR</i>		
гомозиготная	26 (24,2 %)	0
гетерозиготная	20 (18,7 %)	0
Мутация фактора V Leiden		
гомозиготная	2 (1,87 %)	0
гетерозиготная	12 (11 %)	0
Мутация G/A-455 в гене фибриногена		
гомозиготная	2 (1,87 %)	0
гетерозиготная	15 (14,0 %)	0
Мутация G20210 → А в гене протромбина		
гомозиготная	0	0
гетерозиготная	2 (1,87 %)	0
Полиморфизм 4G/5G в гене <i>PAI-1</i>		
гомозиготный	19 (17,8 %)	0
гетерозиготный	22 (20,6 %)*	1 (3,2 %)
Полиморфизм P1 A1/A2 в гене <i>GpIIIa</i>		
гомозиготный	10 (9,3 %)	0
гетерозиготный	19 (17,8 %)*	1 (3,2 %)
Полиморфизм С807Т в гене интегрин альфа-2 <i>GPIa</i>		
гомозиготный	8 (7,5%)	0
гетерозиготный	40 (37,4 %)*	2 (6,4 %)
Полиморфизм A1/A2 в гене <i>GPIb</i>		
гомозиготный	0	0
гетерозиготный	37 (34,6 %)*	1 (3,2 %)
Мультигенная форма тромбофилии	95 (88,8 %)	0
Тромбофилии (всего)	107 (100 %)*	9 (29 %)

лиморфизма. Присутствие мутации в факторе V и мутация в гене протромбина в сочетании с другими полиморфизмами являются высоким фактором развития гестоза.

При измерении уровня гомоцистеина в контрольной группе в течение беременности нами отмечено, что происходит достоверное снижение уровня гомоцистеина во втором и третьем триместрах. В I триместре концентрация гомо-

Таблица 3

Тромбофилические полиморфизмы у обследованных

Гены	Основная группа		Контрольная группа	
	Абс.	%	Абс.	%
Сочетание 3 полиморфизмов	39	36,5	0	0
Сочетание 4 полиморфизмов	32	29,9	0	
Сочетание 5 полиморфизмов	6	5,6	0	
Сочетание 6 полиморфизмов	8	7,5	0	
Фактор V + 2 полиморфизма	1	0,9	0	
Протромбин + 3 полиморфизма	4	3,8	0	

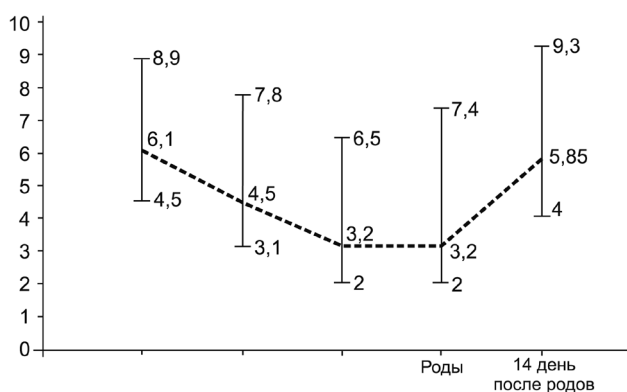


Рис. 1. Изменение концентрации гомоцистеина на протяжении беременности

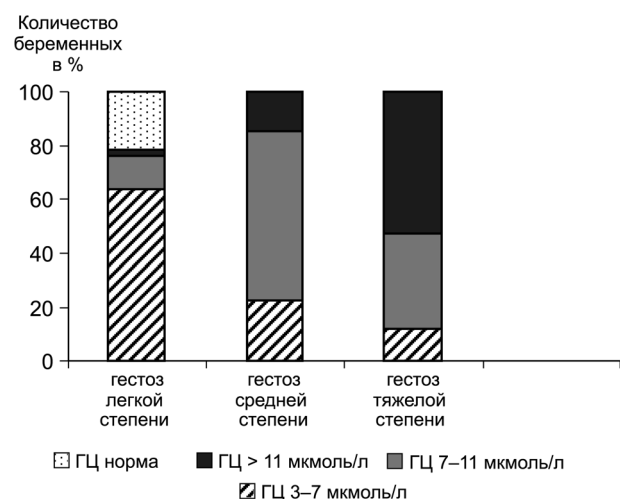


Рис. 2. Количество беременных основной группы с разным уровнем гомоцистеина

цистеина (рис. 1) составила $6,1 \pm 0,5$ мкмоль/л ($4,5 \div 8,9$ мкмоль/л). В группе второго триместра средняя концентрация гомоцистеина составила $4,5 \pm 0,6$ мкмоль/л ($3,1 \div 7,8$ мкмоль/л). В третьем триместре концентрация гомоцистеина составила $3,2 \pm 0,5$ мкмоль/л ($2,0 \div 6,5$ мкмоль/л).

Таким образом, оценка концентрации гомоцистеина у беременных должна проводиться с учетом норм концентрации гомоцистеина в различные сроки беременности.

Скорее всего, причиной такого значительного снижения концентрации гомоцистеина во время беременности является гемодилюция, повышение концентрации стероидов в крови беременной и утилизация больших количеств метионина и гомоцистеина организмом плода. Все эти процессы активизируются в полной мере именно к началу второго триместра [1].

Концентрация гомоцистеина при гестозе достоверно превышала средние показатели в контрольной группе здоровых беременных ($p < 0,05$), причем повышение его содержания соответствовало степени тяжести заболевания.

У 21,8 % беременных при гестозе легкой степени (рис. 2) показатели гомоцистеина оставались в пределах нормы.

Необходимо отметить, что хотя мутации в гене *MTFHR* и в гене метионин синтазы преобладали, но они встречались не в 100 % случаев. А при гестозе легкой и тяжелой степени тяжести уровень гомоцистеина повышался в 100 % случаев, при этом увеличение показателей происходило с увеличением тяжести гестоза. Возможно это было связано с выраженным дефицитом фолиевой кислоты и других витаминов группы В, о чем косвенно может свидетельствовать наличие у этих пациенток анемии III степени.

Как видно из приведенных данных (табл. 4) концентрация гомоцистеина и % беременных с более высокими цифрами гомоцистеина в плазме крови достоверно увеличивались по мере утяжеления течения гестоза ($p < 0,05$).

Уровень гомоцистеина у здоровых беременных был достоверно ниже, чем у беременных с гестозом и составил $3,2 \pm 0,4$ мкмоль/л ($p < 0,01$).

Среди осложнений беременности у пациенток встречались хроническая плацентарная недостаточность, врожденная задержка развития плода (ВЗРП), угроза прерывания беременности, многоводие, маловодие, анемический синдром (табл. 5).

Таким образом, мы видим, что у беременных с наследственной тромбофилией и повышенным уровнем гомоцистеина, связанным как с наследственными факторами, так и с приобретенными, развивается гестоз. Гестоз сопровождается

Таблица 4

Уровень гомоцистеина в зависимости от степени тяжести гестоза

Показатель	Беременные с гестозом легкой степени (n = 42)	Беременные с гестозом средней степени (n = 35)	Беременные с гестозом тяжелой степени (n = 30)	Контрольная группа (n = 31)
	М ± m%	М ± m%	М ± m%	
Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л (min-max)	5,78 ± 1,6* 3,0 ÷ 11,2	8,9 ± 4,5* 5,3 ÷ 16,9	14,5 ± 1,25* 6,9 ÷ 21,4	3,2 ± 0,4 2,0 ÷ 6,5

* — p < 0,005 по сравнению с контрольной группой

в достоверно большем проценте случаев такими осложнениями беременности, как внутриутробная задержка развития плода, нарушениями кровотока в системе мать-плацента-плод, анемией по сравнению с контролем (p < 0,01).

Выводы

Из проведенного исследования следует, что уровень гомоцистеина у 78,2 % пациенток с гестозом был достоверно выше, чем в контрольной группе $3,2 \pm 0,5$ мкмоль/л (p < 0,05).

Концентрация гомоцистеина в плазме крови достоверно увеличивается по мере нарастания степени тяжести гестоза (p < 0,05), так при легкой, средней, тяжелой степени тяжести и преэклампсии концентрация гомоцистеина составляет соответственно $5,78 \pm 1,6$; $8,9 \pm 4,5$; $14,5 \pm 1,25$ мкмоль/л.

Наличие 4 и более полиморфизмов или наличие мутации фактора V и мутации в гене протромбина хотя бы с одним другим полиморфизмом является высоким фактором риска развития гестоза.

Генетическая предрасположенность к развитию гипергомоцистеинемии встречается у 82,3 % беременных с гестозом.

Литература

1. Белобородова Е. В. Клиническое значение выявления генетической и приобретенной форм гипергомоцистеинемии при ведении беременности высокого риска: автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 2005. — 25 с.
2. Гипергомоцистеинемия и осложнения беременности / Макацария А. Д. [и др.]. — М.: Триада-Х, 2005. — 216 с.
3. Неотложная помощь при экстремальных состояниях в акушерской практике / Айламазян Э. К. [и др.]. — 3-е изд. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2002. — 432 с.
4. For the homocysteine lowering trialists collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-

Таблица 5

Структура осложнений беременности

Осложнение беременности	Основная группа		Контрольная группа	
	n = 107	M ± m%	n = 31	M ± m%
Угроза прерывания беременности	19	17,8 ± 3,7	0	0
ВЗРП	43	40,2 ± 4,7	0	0
Нарушение кровотока в системе мать-плацента-плод	47	43,9 ± 4,8	0	0
Многоводие	15	14 ± 3,4*	1	3,23
Маловодие	9	8,4 ± 2,3	0	0
Анемия	75	70 ± 4,3*	1	3,23

* — различия достоверны в сравнении с контрольной группой (p < 0,01)

analysis of randomized trials / Clark R. [et al.] // Br. Med. J. — 1998. — Vol. 316. — P. 894–898.

5. D'Angelo A., Selhab J. Homocysteine and thrombotic disease // Blood. — 1997. — Vol. 9. — P. 1–11.
6. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis / Den Heijer M. [et al.] // Thromb. Haemost. — 1998. — Vol. 80. — P. 874–877.
7. Medina M., Urdiales J., Amores-Sanchez M. Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions // Eur. J. Biochem. — 2001. — Vol. 268. — P. 3871–3882.
8. Muls K. B., Faloona F. A. Specific synthesis of DNA via a polymerase-catalysed chain reaction // Methods Enzymol. — 1987. — Vol. 155. — P. 335–350.
9. Welch G., Loscalo J. Homocysteine and atherothrombosis // The New England J. Medicine. — 1998. — Vol. 338. — P. 1042–1050.

Статья представлена Е. В. Мозговой
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

STUDY OF HEMOSTASIS FACTORS AT HYPERHOMOCYSTEINEMIA BY PREGNANT WOMEN WITH GESTOSIS

Arutjunyan A. V., Zainulina M. S., Kobchikova A. V.

■ **Summary:** Homocystein level, gen polymorphism of 107 pregnant women with pure and combined gestosis of different severity, of 31 pregnant women with physiologic course of gestational process, have been studied. It has been noted,

that hyperhomocystein level varies depending of gestosis severity. The finding proves the consideration, that gestosis is a multifactorial disease with several development ways. Study of gen polymorphism and of homocystein level enables early detection of a risk group for gestosis development.

■ **Key words:** hyperhomocysteinemia; gestosis; gen polymorphism.

■ **Адреса авторов для переписки**

Арутjunян Александр Вартанович — д. б. н., проф., рук. лаборатории биохимии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.
E-mail: arutjunyan@aa3703.spb.edu.

Зайнулина Марина Сабировна — д. м. н., проф., зам. директора ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН по лечебной и научной работе. 199034, Менделеевская линия, д. 3. Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: zainulina@yandex.ru.

Кобчикова Анастасия Валентиновна — ассистент кафедры акушерства и гинекологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6–8.
E-mail: Nastjakob@mail.ru.

Arutjunyan Alexandr Vartanovich — Dr. Sci., Head of the Department of Biochemistry. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, Russia, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3.
E-mail: arutjunyan@aa3703.spb.edu.

Zainulina Marina Sabirovna — professor, deputy director of medical and scientific work, D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS 3, Mendeleyevskaya Line. 199034, St. Petersburg, Russia. **E-mail:** zainulina@yandex.ru.

Kobchikova Anastasia Valentinovna — Assistant Professor. St.-Petersburg State Medical University named by Acad. I. P. Pavlov, No6/8, Lev Tolstoy street., St.Petersburg, 197022, Russia.
E-mail: Nastjakob@mail.ru.