

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА ПРИ НЕДОНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

**В.Е. РАДЗИНСКИЙ, Т.В. ГАЛИНА, В.Н. ВЕРЯСОВ, Э.Т. МАЧАРАШВИЛИ,
Л.Д. САПАРОВА, А.В. ФИНКОВСКИЙ**

Кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии

Российский университет дружбы народов

Ул. Миклухо-Маклая, 8, Медицинский факультет, 117198 Москва, Россия

Н.М. СТАРЦЕВА, Т.В. ЗЛАТОВРАТСКАЯ

Городская клиническая больница № 29

Госпитальная площадь, 2, 111020 Москва, Россия.

Разработка методов ранней диагностики задержки развития плода (ЗРП) и недонашивания является одной из важных задач современного акушерства. Целью данной работы было определение роли аллельного распределения гена гликопротеина GrpIIIa у матерей и их новорожденных в патогенезе и прогнозировании преждевременных родов, ЗРП и сочетания, а также определение изменений процессов апоптоза при осложненной беременности: ЗРП и недонашивании.

При анализе течения беременности и родов 80 женщин установлено, что одинаковые генотипы мать-ребенок A1A1-A1A1 обнаружены в группе женщин с преждевременными родами в сочетании с ЗРП. При разных генотипах мать-ребенок формируется ЗРП. Исследование апоптоза доказывает несомненную роль иммунологических механизмов в возникновении преждевременных родов. Высокие цифры аннексина-V говорят о большой готовности организма к родам, а высокие цифры CD95 - о вероятности ЗРП.

Одним из основных резервов снижения перинатальной заболеваемости и смертности является разработка и внедрение в практику информативных и надежных методов контроля за особенностями течения гестационного процесса и раннего выявления возникших осложнений, а в идеале – дородовое прогнозирование их развития.

В структуре патологии перинатального периода, заболеваемости и летальности новорожденных в настоящее время наиболее распространенным осложнением является ЗРП, недонашивание, а также их сочетание.

Недонашивание беременности – одна из главных причин перинатальной смертности. Частота ЗРП в последние годы, по данным многих авторов, колеблется от 3% до 18-22% у доношенных, от 18 до 24 % - у недоношенных, и имеет тенденцию к повышению. (В.Е. Радзинский и соавт. 1990., Ferraz et al. 1990). Недоношенность представляет серьезную социальную проблему в связи с большими трудовыми и экономическими затратами, связанными с выхаживанием этих детей, а также значительной долей их среди инвалидов детства и больных с хронической патологией.

Доклиническая диагностика недонашивания не разработана, что во многом связано с отсутствием проявлений и четкой клинической симптоматики ретардации плода на ранних сроках беременности.

Известно много факторов, которые участвуют в формировании ЗРП и недонашивании. Одни авторы отводят в черед данной патологии первостепенную роль экзогенным факторам: физическим, химическим, алиментарным, социальным, другие – эндогенным: иммунологическим, гормональным, генетическим и др. Нам представляется актуальным изучение генетических и иммунологических факторов, как основополагающих, но наименее изученных. Известно, что геном каждого человека стабилен и в течение жизни не подвержен ника-

ким изменениям. Ген GPIIb контролирует синтез клеточных рецепторов – интегринов. Интегрины – большая группа рецепторов клеточной поверхности, которые определяют адгезию клеток к клеточному матриксу путем связывания его компонентов или к поверхности других клеток путем связывания с поверхностными молекулами Ig-суперсемейства [1, 2]. Доказано влияние интегринов на материнское «распознавание» беременности, адгезию молекул и формирование «окна имплантации». Они обеспечивают полноценное развитие беременности самых ранних этапов посредством тонкого взаимодействия между эмбрионом и материнским организмом. Неоспорим тот факт, что апоптоз, увеличиваясь по мере прогрессирования беременности, играет важную роль в нормальном развитии и старении плаценты [6].

Развитие учения об апоптозе (программированной гибели клеток) [3, 4] и накопление данных иммунологических исследований, связанных с акушерской патологией, обуславливают большой научный и практический интерес для изучения взаимосвязи апоптоза с преждевременными родами. Возможно участие этого процесса в патофизиологических механизмах ЗРП, гестоза и количественная оценка апоптоза как показателя степени тяжести данного осложнения.

Целью настоящего исследования было изучение генетических и иммунологических особенностей ЗРП, недонашивания и их сочетания для обоснования оптимизации профилактических и диагностических мероприятий.

Материал и методы исследования. В соответствии с поставленной целью было обследовано 80 пациенток. Из них 60 пациенток были госпитализированы в отделение патологии беременных (ОПБ) в сроке беременности от 32 до 37 недель беременности. 20 пациенток при сроке беременности 38-40 недель, которые поступили на роды. В зависимости от сроков родоразрешения были сформированы следующие группы: I группа (13 пациенток) - женщины, у которых была ЗРП и роды произошли в срок. Во II группу (15 женщин) вошли пациентки с преждевременными родами в сроки 32-37 недель. III группу (30 женщин) составили пациентки, у которых была ЗРП при преждевременных родах. IV группа (22 женщины) контрольная и она состояла из пациенток без ЗРП, у которых роды произошли в срок. Клиническое обследование включало сбор анамнеза, антропометрию беременных, клинико-лабораторное обследование, консультации специалистов, ультразвуковую фетометрию, плацентографию, оценку объема околоплодных вод, кардиотокографию, доплеровское исследование и другие общепринятые методы

Срок беременности определялся по комплексу общепринятых показателей: (по дате последней менструации, данным женской консультации, ультразвуковых исследований.).

С целью верификации диагноза ЗРП произведена оценка состояния 80 новорожденных по параметрам физического развития с использованием перцентильных таблиц, предложенных Г.М. Дементьевой и Е.В. Короткой (1981). У новорожденных определяли массу тела, длину, окружность головы, окружность груди. Производили вычисление пондералового индекса по формуле $PI = (\text{масса тела при рождении, кг} \times 100) / (\text{длина при рождении, м})^3$. Диагноз ЗРП ставился на основании отставания размеров плода ниже 10-й перцентили. У 45 детей был установлен диагноз гипотрофии плода различной степени тяжести. Гипотрофия плода I степени была у 26 ребенка, II степени - у 19 детей, гипотрофии III степени в наших наблюдениях не было.

Всем матерям и их новорожденным было проведено исследование крови на носительство аллелей PL-AI и PL-AII гена GPIIb. Проводили забор 100 мкл периферической крови в пробирку, содержащую 25 мкл 50 mM раствора нейтрального Na-ЭДТА, добавляли 125 мкл раствора 0,15 M NaCl, перемешивали и инкубировали для денатурации ДНК и получения гомо-

генного раствора. Затем проводили электрофорез в агарном геле, ПЦР с использованием амплификатора ДНК многоканального МС 2, обработку ДНК с рестрикционной мононуклеазой, электрофорез в полиакриламидном геле и окраску полиакриламидного геля серебром. Апоптоз в плацентарной ткани изучали методом двойного окрашивания клеток антителами к аннексин-V, конъюгированному с FITC и пропидием йодида, а также определения содержания CD-95 в плаценте методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител.

Результаты исследования и обсуждение. Возраст женщин во всех группах колебался от 18 до 43 лет и в среднем составил $26,5 \pm 3,4$ лет. Статистически достоверных различий выявлено между ними не было. Параметры менструальной и репродуктивной системы по группам не различались. Все женщины имели отягощенный акушерско-гинекологический анамнез: привычное невынашивание беременности, преждевременные предыдущие роды, анте-, интра- или постнатальная гибель плода в анамнезе, гестоз при предыдущих беременностях, рождение детей с задержкой развития, бесплодие, миома матки, медицинские аборт.

Обследование женщин контрольной группы показало, что беременность, как на ранних сроках, так и во втором-третьем триместрах протекала без осложнений. Внутриутробное состояние плодов в течение всей беременности было удовлетворительным, клинические анализы, показатели АД - в пределах нормы. У 17 женщин роды произошли в срок, срочные самопроизвольные. Трех беременным было произведено кесарево сечение по следующим показаниям: 1 - по поводу миопии высокой степени; 2 - из-за наличия рубца на матке после предыдущего кесарева сечения. Средняя масса тела новорожденных составила от 3280 до 3340 г., средняя длина от 50 до 52,6 см. Оценка по шкале Апгар - 8,6 баллов на первой и 9 баллов на пятой минуте рождения. Ранний неонатальный период протекал без осложнений. Дети были выписаны домой на 4-5-е сутки после родов. При исследовании генотипов матери и ребенка выявлено, что детей и матерей с генотипом A1A1-A1A1 в данной группе не было. Дети с генотипом A1A2 и матери A1A1 были в 6 случаях. В 7 случаях встречались матери с генотипом A1A2, дети с генотипом A1A1 - 7. У 9 установлен генотип A1A2. Показатели апоптоза в контрольной группе были следующими: CD95 - $25,6 \pm 7,8\%$, аннексин-V - $18,3 \pm 5,3\%$

У пациенток I группы в большинстве случаев беременность в I триместре протекала с осложнениями: у 6 женщин была угроза прерывания беременности I и во II триместрах, у 3 беременность протекала с явлениями нефропатии, у 2 женщин - обострение хронического пиелонефрита; 2 - перенесли хламидийную инфекцию во II триместре. В III триместре беременности развились такие осложнения, как гестоз и ЗРП (8 беременных), ХПН (у 4 беременных) и у 5 женщин ЗРП. Все они были госпитализированы в отделение патологии беременных (ОПБ), получали соответствующее лечение.

После проведенной терапии гестоза, нефропатии, ХПН и ЗРП у 8 женщин беременность закончилась самопроизвольными родами. Пяти беременным было произведено кесарево сечение по поводу ухудшения состояния плода. Во время родов оценивали количество и цвет околоплодных вод. Было выявлено, что у 9 женщин было многоводие, и наблюдалась хроническая гипоксия плода; у 6 женщин вод было в норме. При макроскопическом исследовании плацента была с петрификатами у 9, гипоплазия плаценты - у 4 женщин.

Все дети родились доношенными, средняя масса тела составило 2680 - 2570 г., средняя длина детей в этой группе составил от 49,7 до 48,3 см. Оценка по шкале Апгар 8-8,5 баллов была у 9 детей с ЗРП I степени и у 4 с ЗРП II степени. Ранний неонатальный период у 9 детей протекал без осложнений, у 4 детей с ЗРП II степени отмечалась патологическая потеря

и поздняя прибавка массы тела. Новорожденные выписаны домой в удовлетворительном состоянии на 5-7-е сутки после рождения.

Соответственно поставленной цели мы провели исследование крови на носительство аллеля PL-AI, PL-AII гена GPIIIa. В зависимости от генотипа матерей все женщины были подразделены на две когорты: I включала в себя матерей с генотипом A1A1, II группа включала в себя матерей с генотипом A1A2- A2A2 (носительницы аллеля PL-AII гена GPIIIa). После определения генотипа у новорожденных был проведен анализ частоты ЗРП и недонашивания. При наличии генотипа A1A2 у новорожденных ЗРП наблюдалась в 2 случаях, ЗРП в сочетании с недонашиванием была в 2 случаях. При совпадении генотипа мать-ребенок (A1A1-A1A1) ЗРП была в 5 случаях. Разные генотипы мать-ребенок (A1A2-A1A1) в 4 случаях привели к ЗРП. Генотипы (A1A2-A1A2) – к ЗРП в 2 случаях (табл. 1). Исследования апоптоза CD95 составил $32,4 \pm 3,2$, а аннексина-V $25,3 \pm 5,1\%$, данные показатели ниже, чем II и в III группах, но выше показателей в контрольной группе. По-видимому, это свидетельствует о нарушениях иммунологических механизмов в организме женщины.

Таблица 1

Генотип новорожденных в группе матерей с генотипом A1A1

Группы	Генотип A1A1	Генотип A1A2
I	5	2
II	12	2
III	21	2
IV	0	6
Всего	38	12

Вторую группу составили 15 женщин с преждевременными родами. Обследование женщин данной группы показало, что как на ранних сроках, так и во втором и третьем триместрах отмечалась угроза прерывания беременности. 4 пациентки на ранних сроках перенесли респираторно-вирусные инфекции. У одной женщины была нефропатия II степени. Изучая акушерский анамнез женщин, мы обнаружили, что у 9 женщин предыдущие роды произошли также раньше срока в 34-36 недель беременности. Внутриутробное состояние плодов в течение беременности было удовлетворительным у 7 женщин, в 3-х случаях была хроническая гипоксия плода. При УЗИ у 4 наблюдались признаки преждевременного старения плаценты в 36 недель.

У 9 из 15 женщин роды были самопроизвольными преждевременными. Шестерым беременным было произведено кесарево сечение по поводу: отслойки низко расположенной и нормально расположенной плаценты в 3 случаях; 2 случая - по поводу острой гипоксии плода и в 1 случае из-за отсутствия родовой деятельности при дородовом излитии вод, нефропатии I степени. У 5 женщин было маловодие и у 3 – многоводие. Макроскопические изменения плаценты отмечались у 8 женщин.

Все дети в этой группе родились недоношенными, средняя масса тела составила от 2360 до 2250 г., длина 48-46 см, с оценкой по шкале Апгар 7,6 и 8,4 на первой и пятой минутах, соответственно. Ранний неонатальный период протекал без осложнений, и 8 детей были выписаны домой на 7-8-е сутки, а 7 новорожденных были переведены в больницы на второй этап выхаживания.

Было выявлено, что при совпадении генотипов мать-ребенок преждевременные роды были у 12 женщин, а при разных генотипах (A1A1-A1A2) преждевременные роды произошли у

2 пациенток. При генотипе A1A2 у матери и A1A1 у ребенка преждевременные роды были в одном случае, а одинаковые генотипы мать-ребенок (A1A2-A1A2) не приводили к преждевременным родам (табл. 1). Показатель CD95 был $34,2 \pm 8,1\%$, а аннексина-V составил $31,6 \pm 4,6\%$.

Третью группу составили 30 пациенток с ЗРП и недонашиванием. Из них у 9 беременных с 32 недель, развилась водянка с признаками ЗРП по УЗИ, у 8 - нефропатия первой и второй степени в сочетании с ЗРП, и у 13 женщин - ХПН в сочетании с ЗРП. В 14 случаях роды произошли самопроизвольно, а в 16 случаях было произведено кесарево сечение. Основными показаниями к оперативному родоразрешению явились: ухудшение степени тяжести гестоза и состояния плода, хроническая плацентарная недостаточность и ЗРП, нефропатия не поддающаяся лечению. Патология околоплодной среды наблюдалась в 11 случаях, макроскопические изменения в плаценте - в 17 случаях. Средняя масса тела новорожденных составила от 2180 до 1920 г., длина 46,3 до 45,7 см., оценка по шкале Апгар 7,3 - на первой минуте и 8,3 - на пятой минуте. Ранний неонатальный период протекал без осложнений у 16 детей с ЗРП I степени. Дети выписаны домой в удовлетворительном состоянии 8-9-е сутки после рождения. 14 детей были переведены на второй этап выхаживания, из них 6 детей - после кесарева сечения, а 8 детей - после самопроизвольных родов (у двоих детей были признаки внутриутробного инфицирования).

Обнаружено, что при совпадении генотипов A1A1 и A1A1 у 21 женщины при преждевременных родах была ЗРП, а при разных генотипах мать-ребенок (A1A1-A1A2) всего у 2. Генотип A1A2 - у матери и A1A1 - у ребенка приводил в 4 случаях к ЗРП в сочетании с недонашиванием. Генотип A1A2-A1A2 ЗРП - недонашиванию в 3 случаях (табл. 2).

Таблица 2

Апоптоз клеток плаценты и количественное соотношение генотипов матери и плода

Группы	CD95 %	Аннексин-V %	Одинаковый генотип мать-ребенок	Разный генотип мать-ребенок
I	$32,4 \pm 3,2$	$25,3 \pm 5,1$	7	6
II	$34,2 \pm 8,1$	$31,6 \pm 4,6$	12	3
III	$38,2 \pm 4,8$	$33,2 \pm 5,2$	24	6
IV	$25,6 \pm 7,8$	$18,3 \pm 5,3$	11	11

Примечание: достоверные различия с контрольной группой ($P < 0,05$).

Показатель CD 95 был $38,2 \pm 4,8\%$, а аннексина-V $33,2 \pm 5,2\%$, что значительно выше показателей в контрольной группы и вероятнее всего говорит о высоком апоптозе клеток.

Совпадение генотипа мать-новорожденный в группах обследованных наблюдается в 24% из 30. В остальных 6 случаях генотип по аллельным формам гена GPIIIa был различным. Таким образом, у 80% обследованных аллельная принадлежность по гену GPIIIa мать-новорожденный была одинаковой, а в 20% - различной.

В группе контроля одинаковый генотип у матери и новорожденного диагностировали в 9 случаях из 22, а несовпадение генотипа отмечено у 13 обследованных. т.е. различная аллельная принадлежность по гену GPIIIa выявлена в 59,1% случаев.

В возникновении преждевременных родов играют роль как генетические, так и иммунологические механизмы, поэтому мы определяли нарушения процессов апоптоза у 40 пациенток при неосложненной и осложненной беременности, при недонашивании и ЗРП. С целью

определения процессов апоптоза в плаценте нами было проведено исследование экспрессии рецептора семейства фактора некроза опухоли CD95 и количество аннексин-V связывающих клеток, как клеточных маркеров процессов апоптоза.

Исследования позволяют предположить вовлечение механизмов апоптоза в индукцию родовой деятельности. Так, статистически достоверное повышение аннексина-V отмечалось во II и III группах, при преждевременных родах и преждевременных родах с ЗРП, соответственно.

Предварительные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Одинаковая аллельная принадлежность по гену GPIIIa матери и плода обуславливает вероятность развития ЗРП и преждевременного прерывания беременности в 3 раза чаще, чем различная аллельная принадлежность.

2. Абсолютными предикторами развития ЗРП и недонашивания CD95 и аннексин-V не являются, однако, дают возможность судить о тяжести и длительности данных осложнений. Можно предположить развитие данных осложнений при увеличении этих показателей (по сравнению с группой контроля).

3. Вероятно генетически детерминированная предрасположенность к формированию плацентарной недостаточности и недонашивания опосредуется, в том числе, через системы апоптоза.

Литература

1. Хотайт Г.Я., Галина Т.В., Радзинский В.Е. Носительство аллеля PL-AII гена GPIIIa и его связь с задержкой роста плода и гестозом // Вестник РУДН, сер. «Медицина 2001.- №1. – С. 27-30.
2. Рамнадарат Ш., Галина Т.В., Радзинский В.Е., Оразмурадов А.А., Хахва Н.Т. Влияние генотипа матери и ребенка на течение беременности и исход родов // Вестник РУДН, сер. «Медицина», 2002.- № 1.- С. 26-31.
3. Сухих Г.Т., Дементьева М.М., Серов В.Н. и соавт. Апоптоз в гормонально зависимых тканях репродуктивной системы // Акушерство и гинекология 1991.- № 5.- С. 12-16.
4. Утищев Д.Б., Сергеев А. В. Апоптоз: фармакологические аспекты // Экспериментальная клиническая фармакология.- 1998. - № 4. - С. 57-65.
5. Jerzak M, Kasprzycka M et al. Apoptosis of T cells in the first trimester human decidua // Am. Reprod Immunol. 1998.- V.40 (3).-P 303-311.

GENETICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS FETAL GROWTH RETARDATION AND PRETERM

V.E. RADZINSKY, T.V. GALINA, V.N. VERYASOV,
E.T. MACHARASHVILI, L.D. SAPAROVA, A.V. FINKOVSKY
Department of Obstetrics and Gynaecology with course of Perinatology
Peoples' Friendship University of Russia
8, Miklukho-Maklaya st., Medical Faculty, 117198 Moscow, Russia

N.V. STARTSEVA, T.V. ZLATOVSRATSKAYA
Clinical hospital №29
Gospitalnaya sq., 2, 111020 Moscow, Russia

The development of methods of diagnostic of an fetal growth retardation and preterm labor is an impotent of a modern obstetrics. The idea of this investigation is to detect the role of ffilels of gens GPIIIa in mother and their newborns in the genesis and prognosis of preterm labor and intrauterine growth retardation. We also revealed the changes of apoptosis in case of mentioned complication of pregnancy