

## ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОВЫШЕННЫМ ТРОМБООБРАЗОВАНИЕМ, У БЕРЕМЕННЫХ С СИНДРОМОМ ПОТЕРИ ПЛОДА

© А. Е. Николаева<sup>1</sup>, С. И. Капустин<sup>2</sup>, Л. П. Папаян<sup>2</sup>, Ф. Р. Кутуева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург

**Резюме.** Анализ динамики перинатальной смертности в России выявил на сегодняшний день изменения ее структуры и, прежде всего, увеличение удельного веса антенатальных потерь, что может свидетельствовать о нарушении жизнедеятельности внутриутробного плода. Репродуктивные потери, наблюдаемые в различные сроки беременности, все чаще объединяют в так называемый синдром потери плода (СПП) вне зависимости от особенностей этиопатогенеза. Наиболее широко в этом аспекте обсуждается проблема тромботических нарушений, связанных с врожденными и приобретенными тромбофилиями. Целью исследования явилась оценка роли носительства неблагоприятных аллельных вариантов генов, ассоциированных с повышенным тромбообразованием в развитии СПП. Обследовано 105 беременных, имеющих в анамнезе СПП или факторы риска его реализации, которые наблюдались в СПб ГБУЗ «Женская консультация № 22». Проведено генетическое тестирование на наличие мутаций в генах фактора V (FV Leiden), протромбина,  $\beta$ -субъединицы фактора I, ингибитора активатора плазминогена типа I, метилентетрагидрофолат редуктазы и гликопротеина IIIa. Результаты исследования выявили носительство хотя бы одного аллельного варианта, ассоциированного с повышенным риском тромбообразования, наблюдалось в группе женщин с СПП в анамнезе или имеющих факторы риска его развития в 100 % случаев. При этом в подавляющем большинстве из них имело место сочетание двух и более неблагоприятных генетических вариантов (потенциальных факторов риска СПП). Частота встречаемости Лейденской мутации и генотипа 1565CC гена *GpIIIa* в обеих группах беременных статистически значимо превышала таковую в популяции. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности выявления неблагоприятных аллельных вариантов изученных генов, наряду с классическими детерминантами наследственной тромбофилии, в широкой акушерской практике, поскольку такой анализ позволяет уточнить индивидуальные механизмы возникновения СПП и наиболее частых осложнений беременности.

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, ассоциированных с риском тромбообразования; синдром потери плода.

## SPECIFICS OF ALLELIC POLYMORPHISM OF GENES ASSOCIATED WITH INCREASED THEROMBOGENESIS IN PREGNANT WOMEN WITH FETAL LOSS SYNDROME

© A. E. Nikolaeva<sup>1</sup>, S. I. Kapustin<sup>2</sup>, L. P. Papayan<sup>2</sup>, F. R. Kutueva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

<sup>2</sup>FGBU «The Russian Scientific Research Institute of hematology and transfusiology» of FMBA of Russia, Saint Petersburg

**Abstract.** The Up-to-date research of perinatal mortality in Russia has shown change in its structure with increase of proportion of antenatal mortality in the first place, which may be declarative of disorders in fetal vital activities. Reproductive losses in different periods of pregnancy are increasingly frequently united under the term of fetal loss syndrome (FLS), regardless of ethiopathogenic factors. The mostly discussed issue is thrombotic disorders related to inherited and aquired thrombophilia. Research objective was to evaluate the role of adverse allelic variant genes carriage, associated with increased thrombogenesis, in development of FLS. 105 pregnant women with FLS or FLS risk factors in the past have been examined. The women have been affiliated with SPb GBUZ «Women's clinic N 22». The women have been tested for gene mutations in Factor V (FV Leiden), prothrombin,  $\beta$ -subunit of factor I, plasminogen activator inhibitor-I, methylenetetrahydrofolate reductase and glucoprotein IIIa. The study results have shown that 100 per cents of women in the study group with FLS or FLS risk factors in the past have been carriers of at least one allelic variant associated with increased risk of thrombogenesis. A combination of two or more adverse geetic variants (potential risk factors for FLS) have been registered in the overwhelming majority of cases. The incidence of Leiden and genotype 1565CC gene *GpIIIa* mutations in both study groups was significantly different as compared to the population. The study results demonstrate the necessity to determine adverse allelic variants of

the known genes along with the classical determinants of inherited thrombophilia in everyday obstetrical practice, as it allows to spotlight individual mechanisms of development of FLS and the most commonly seen complications of pregnancy.

**Key words:** fetal loss syndrome (FLS); variant genes carriage, associated with increased thrombogenesis.

Анализ динамики перинатальной смертности в России выявил на сегодняшний день изменения ее структуры и, прежде всего, увеличение удельного веса антенатальных потерь, что может свидетельствовать о нарушении жизнедеятельности внутриутробного плода. В 2013 году в Санкт-Петербурге перинатальная смертность составляла 7,04‰, из которых 5,02‰ представлены антенатальными потерями плода. В литературных источниках последних лет репродуктивные потери, наблюдаемые в различные сроки беременности, все чаще объединяют в так называемый синдром потери плода (СПП) вне зависимости от особенностей этиопатогенеза [1]. Наиболее широко в этом аспекте обсуждается проблема тромботических нарушений, связанных с врожденными и приобретенными тромбофилиями [2, 3, 4].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка роли носительства неблагоприятных аллельных вариантов генов, ассоциированных с повышенным тромбообразованием в развитии СПП.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 105 беременных, имеющих в анамнезе СПП или факторы риска его реализации, которые наблюдались в СПб ГБУЗ «Женская консультация № 22». Проведено генетическое тестирование на наличие мутаций в генах фактора V (FV Leiden), протромбина (20210 G/A),  $\beta$ -субъединицы фактора I (–455 G/A), ингибитора активатора плазминогена типа I (PAI-1 –675 4G/5G), метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR, 677 C/T) и гликопротеина IIIa (*GpIIIa* 1565 T/C). Контрольную группу — группу популяционного распределения (ГПР) составили 228 не беременных женщин, соответствующих по возрасту исследуемому контингенту больных, не имеющих в анамнезе тромботических эпизодов и проживающих в Северо-Западном регионе России (исследования д. б. н. С. И. Капустина).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наиболее значимые различия, по сравнению с ГПР, наблюдались у беременных с СПП или имеющих факторы риска его развития в распределении аллелей и/или генотипов генов фактора V, гликопротеина IIIa и ингибитора активатора плаз-

миногена 1-го типа. В общей группе беременных наблюдалось статистически значимое увеличение доли гетерозигот по мутации FV Leiden (11,8 % против 4,4 % в контроле, OR = 2,9, 95 %CI: 1,2–7,0,  $p = 0,017$ ). Это отличие было характерно не только для женщин с СПП в анамнезе, но и для беременных, имевших факторы риска по его реализации (13,9 % против 4,4 % в контроле, OR = 3,5, 95 %CI: 1,1–11,0,  $p = 0,039$ ). Особенно высокая частота носительства Лейденской мутации (13,89 %) была обнаружена у женщин с ретрохориальной гематомой.

У 11 беременных аномалия FV Leiden сочеталась с наличием неблагоприятных аллельных вариантов других генов. Как правило, это было одновременное носительство мутаций в 2 или 3 генах, чаще всего, в гене *PAI-1*, *MTHFR* или фактора I. Количество потерь плода и течение беременности у этих женщин не зависели от количества генных мутаций и были связаны с тем, на каком этапе наблюдения за беременной ей было предложено генетическое обследование с профилактикой гиперкоагуляционных осложнений. Лейденская мутация обнаруживалась с высокой частотой (66,7 %) у женщин, перенесших до беременности венозные тромбозы на фоне приема КОК. Эта аномалия была также ассоциирована с развитием в ходе текущей беременности гипертензии, СЗРП и маловодия.

В группе женщин с СПП в анамнезе или имеющих факторы риска его развития наблюдалось 5-кратное увеличение доли лиц с гомозиготным генотипом 1565 CC гликопротеина IIIa (4,9 % против 0,9 % в ГПР, OR = 5,8, 95 %CI: 1,1–30,6,  $p = 0,031$ ). Наиболее высокой частота встречаемости данного варианта оказалась среди беременных, имеющих факторы риска по реализации СПП (8,3 % против 0,9 % в ГПР, OR = 10,3, 95 %CI: 1,7–63,8,  $p = 0,019$ ). В обеих исследуемых группах носительство аллеля *GpIIIa* 1565 C, как правило, встречалось в сочетании с мутациями 4 других генов ( $p = 0,0001$ , сила связи = 0,01), причем с обязательным присутствием неблагоприятного варианта гена фактора I (–455A) ( $p = 0,04$ , сила связи = 0,05). Кроме того, в общей группе женщин была выявлена ассоциативная связь между присутствием в генотипе аллеля *GpIIIa* 1565 C и наличием в семейном анамнезе родственников с ранними инсультами ( $p = 0,009$ , сила связи = 0,05). Кроме того, у самих беременных от-

мечены эпизоды кровотечения после самопроизвольных выкидышей и выскабливаний полости матки. Таким образом, генотипирование полиморфизма *GpIIIa 1565 T/C* имеет большое значение при установлении «мультигенной» формы тромбофилии и оценке риска развития СПП и/или послеродовых кровотечений.

Максимальный уровень статистической значимости отличия группы беременных с СПП или имеющих факторы риска его развития от контроля был обнаружен при анализе полиморфизма гена *PAI-1*. В частности, доля женщин с генотипом 5G/5G оказалась почти в 2 раза выше в общей группе беременных, чем в ГПР (34,3 % против 17,6 % соответственно, OR=2,5, 95 %CI: 1,4–4,2,  $p=0,001$ ). В то же время гетерозиготы по гену *PAI-1* среди беременных с СПП в анамнезе или имеющих факторы риска его развития встречались значительно реже (29,4 % против 46,9 % в ГПР, OR=0,5, 95 %CI: 0,3–0,8,  $p=0,004$ ). Данные различия были наиболее характерны для группы женщин с СПП. Так, частота встречаемости генотипа 5G/5G по гену *PAI-1* составила в этой группе 39,4 %, что существенно превышало таковую в ГПР (OR=3,1, 95 %CI: 1,7–5,6,  $p=0,0004$ ). Напротив, гетерозиготы по гену *PAI-1* обнаруживались среди женщин с СПП значительно реже, чем в здоровой популяции (22,7 % против 46,9 %, соответственно, OR=0,3, 95 %CI: 0,2–0,6,  $p=0,0004$ ). Для группы беременных, имеющих факторы риска развития СПП, отличия в распределении генотипов *PAI-1* от контроля были менее выражены и не достигали пределов статистической значимости. Кроме того, в общей группе беременных была выявлена ассоциативная связь между полиморфизмом гена *PAI-1* и наличием полиморфизма в 3 других генах и риском возникновения кровотечения во время беременности. При этом мутация гомозиготного гена *PAI-1* чаще сочеталась с мутацией гена *MTHFR*, FV Leiden и с полиморфизмом гена *GpIIIa*. Менее значимые различия ( $p<0,2$ ) между изученными группами беременных и ГПР были выявлены при анализе полиморфизма генов *MTHFR*, протромбина и b-субъединицы фактора I (фибриногена). Так, доля гомозигот по аллелю 677 T гена *MTHFR* в группах женщин, с СПП в анамнезе и имеющих факторы риска его развития, составила соответственно 15,2 и 19,4 %, по сравнению с 10,1 % в здоровой популяции. При этом носительство любого варианта *MTHFR* 677 T было ассоциировано с ранней угрозой выкидыша с образованием ретрохориальной гематомы ( $p<0,02$ ), а также с синдромом задержки развития плода ( $p<0,04$ ). Кроме того, в группе беременных с СПП мутация в гене *MTHFR* сочеталась с выявленной

хронической анемией ( $p<0,04$ ), а в группе сравнения — с развитием поздней угрозы выкидыша ( $p<0,05$ ). Стоит также отметить почти 3-кратное увеличение доли женщин с мутацией в гене протромбина в группе беременных с СПП в анамнезе (6,1 % против 2,2 % в ГПР, OR=2,9, 95 %CI: 0,7–11,0,  $p=0,12$ ). Это были беременные, имеющие в анамнезе 2 и более потерь плода, в 2 случаях страдающие варикозной болезнью нижних конечностей и в 3 случаях имеющих заболевание щитовидной железы и неблагоприятную наследственность по СД. Раннее течение беременности у 2 женщин осложнилось образованием ретрохориальной гематомы. В 3 случаях наблюдалось сочетание мутации в гене протромбина с носительством неблагоприятных аллелей двух других генов — *PAI-1* и *MTHFR*.

Гомозиготный генотип –455 AA b-субъединицы фактора I был выявлен у 10,8 % беременных, что лишь незначительно превысило соответствующий показатель в общей популяции (7,9 %). Максимальная частота встречаемости этого варианта наблюдалась у женщин с СПП — 12,1 %, тогда как в группе сравнения она составила 8,3 % и практически не отличалась от нормы. Гомозиготное носительство аллеля –455 A было ассоциировано с наличием у беременных заболеваний почек ( $p<0,04$ ) и аномалий развития полового аппарата (двурукая матка) ( $p<0,01$ ). Гетерозиготы по гену b-фибриногена чаще встречались среди женщин с ранними потерями беременности (в сроке 7–12 недель) и тех, родственники которых страдали гипертонической болезнью. В исследуемой группе мутация гена –455 A/A и 455G/A, как правило, сочеталась с полиморфизмом еще 4 генов и не встречалась в единственном числе.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, носительство хотя бы одного аллельного варианта, ассоциированного с повышенным риском тромбообразования, наблюдалось в группе женщин с СПП в анамнезе или имеющих факторы риска его развития в 100 % случаев. При этом в подавляющем большинстве из них имело место сочетание двух и более неблагоприятных генетических вариантов (потенциальных факторов риска СПП). Частота встречаемости Лейденской мутации и генотипа 1565 CC гена *GpIIIa* в обеих группах беременных статистически значимо превышала таковую в популяции. Кроме того, среди женщин с СПП в анамнезе или факторами риска его развития отмечалось существенное увеличение доли лиц с мутацией G20210A в гене протромбина и/или генотипом *MTHFR* 677TT, также имеющими немаловажное значение в индивидуальной

предрасположенности к тромбозу. При изучении семейного анамнеза обследованных женщин были выявлены ассоциативные связи между носительством определенных неблагоприятных вариантов и наличием у родственников таких заболеваний, как ишемический инсульт, сахарный диабет, гипертоническая болезнь. У самих беременных прослеживалась определенная зависимость между полиморфизмом отдельных генов и наличием аномалий развития мочеполовой системы, кровотечениями при предыдущих беременностях, заболеваниями щитовидной железы, а также осложнениями во время текущей беременности, такими как ретрохориальная гематома, СЗРП, токсикоз II половины беременности.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности выявления неблагоприятных аллельных вариантов изученных генов, наряду с классическими детерминантами наследственной тромбофилии, в широкой акушерской практике, поскольку такой анализ позволяет уточнить индивидуальные механизмы возникновения СПП и наиболее частых осложнений беременности. На необходимость внедрения генодиагностики и расширения спектра анализируемых генов системы гемостаза указывает и тот факт, что у большинства обследованных беременных с СПП в анамнезе или имеющих факторы риска его реализации наблюдалась так называемая «мультигенная тромбофилия», не имеющая, в отличие от ряда иных форм этой патологии, специфичных фенотипических проявлений. В свою очередь, оценка значимости тех или иных форм тромбофилии поможет определить практикующему акушеру тактику ведения беременности. Наконец, важным аргументом в пользу включения лабораторного анализа на генетические маркеры наследственной тромбофилии в алгоритм обследования женщин, планирующих беременность и входящих в группу высокого риска, можно считать сделанное нами наблюдение, что количество предыдущих потерь беременности напрямую зависит от того, на каком этапе была проведена генодиагностика и какие

профилактические мероприятия при подготовке к беременности были выполнены в условиях амбулаторного звена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бицадзе В.О., Макацария А.Д., Хизроева Д.Х. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности. Практическая мед. 2012; 60: 22–9.
2. Капустин С.И., Шмелева В.М., Сидорова Ж.Ю. Молекулярные детерминанты наследственной тромбофилии: современное состояние и перспективы генодиагностики. Вестник гематологии. 2010; VII (4): 84–92.
3. Николаева А.Е., Кутуева Ф.Р., Папаян Л.П. Наследственная тромбофилия (фактор V Лейден) и привычное невынашивание беременности (случай из практики). Тромбоз, гемостаз и реология. 2010; 2 (42): 72–76.
4. Agorastos T., Karavida A., Lambropoulos A., Matern J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in pregnancies with adverse outcome: Fetal Neonatal Med. 2002; 12(4): 267–73.

#### REFERENCES

1. Bitsadze V.O., Makatsariya A.D., Khizroeva D.Kh. Trombophiliya kak vazhneyshee zveno patogeneza oslozhneniy beremennosti [Thrombophilia as a key element in the pathogenesis of complications of pregnancy]. Prakticheskaya med. 2012; 60: 22–9.
2. Kapustin S.I., Shmeleva V.M., Sidorova Zh.Yu. Molekulyarnye determinanty nasledstvennoy trombofilii: sovremennoe sostoyanie i perspektivy genodiagnostiki [Molecular determinants of hereditary thrombophilia: modern state and prospects of gene diagnostics]. Vestnik gematologii. 2010; VII (4): 84–92.
3. Nikolaeva A.E., Kutueva F.R., Papayan L.P. Nasledstvennaya trombofiliya (faktor V Leyden) i privychnoe nevynashivanie beremennosti (sluchay iz praktiki) [Hereditary thrombophilia (factor V Leiden) and habitual miscarriage (case study)]. Tromboz, gemostaz i reologiya. 2010; 2 (42): 72–76.
4. Agorastos T., Karavida A., Lambropoulos A., Matern J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in pregnancies with adverse outcome: Fetal Neonatal Med. 2002; 12(4): 267–73.

#### ◆ Информация об авторах

*Николаева Алла Ехильевна* — канд. мед. наук, ассистент кафедры детской гинекологии и женской репродуктологии ФП и ДПО. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России; заместитель главного врача по медицинской части СПб ГБУЗ «женская консультация № 22». 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: alla-nikolaeva2007@yandex.ru.

*Капустин Сергей Игоревич* — д-р биол. наук, руководитель лаборатории биохимии. ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ. 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16. E-mail: kapustin.sergey@mail.ru.

*Nikolaeva Alla Ekhl'yevna* — MD, PhD, Research Assistant, Department of Pediatric Gynecology and women's reproductology FP and DPO. Saint Petersburg State Pediatric Medical University; Deputy chief physician for medicine, SPb GBUZ «Women's Clinic N 22». 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: alla-nikolaeva2007@yandex.ru.

*Kapustin Sergey Igorevich* — Doctor of Biological Sciences, Chief of Biochemistry Lab. FGBU «The Russian Scientific Research Institute of hematology and transfusiology» of FMBA of Russia. 16, 2-ya, Sovetskaya St., St. Petersburg, 191024, Russia. E-mail: kapustin.sergey@mail.ru.

*Папаян Людмила Петровна* — д-р мед. наук, руководитель лаборатории свертывания крови. ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ. 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16. E-mail: papayan@mail.ru.

*Papayan Lyudmila Petrovna* — MD, PhD, Chief of Lab. of Blood Coagulation. FGBU "The Russian Scientific Research Institute of hematology and transfusiology" of FMBA of Russia. 16, 2-ya, Sovetskaya St., St. Petersburg, 191024, Russia. E-mail: papayan@mail.ru.

*Кутуева Флора Рафхатовна* — ассистент кафедры детской гинекологии и женской репродуктологии ФП и ДПО. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: Flora-kutueva@mail.ru.

*Kutueva Flora Rafkhatovna* — MD, PhD, Research Assistant, Department of Pediatric Gynecology and women's reproductology FP and DPO. Saint Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: Flora-kutueva@mail.ru.