

ДЕМЧЕНКО

Надежда Сергеевна

**ОЦЕНКА РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФОЛАТНОГО
ЦИКЛА И АНГИОГЕНЕЗА ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ
БЕРЕМЕННОСТИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург-2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач России

Башмакова Надежда Васильевна

Официальные оппоненты:

Вавилова Татьяна Владимировна - доктор медицинских наук, ФГБУ "Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова" Минздрава России, профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Северо-Западного федерального округа.

Ворошила Екатерина Сергеевна - доктор медицинских наук, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__»_____2016 года в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, дом 4/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <http://www.arcerm.spb.ru>.

Автореферат разослан «__»_____2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема неразвивающейся беременности (НБ) продолжает оставаться актуальной и социально значимой в практике акушера-гинеколога. В структуре репродуктивных потерь на ранних сроках частота неразвивающейся беременности (замершей беременности, несостоявшегося выкидыша) составляет 45-88,6% (Салов И. А., 2006). Причины замершей беременности многочисленны и нередко выступают в комплексе. До настоящего времени, проведенные многочисленные исследования не сформировали единого мнения об этиологии и патогенезе неразвивающейся беременности (Радзинский В. Е. и др., 2009).

Особую роль в этиологии НБ играет хромосомный дисбаланс. Так, среди абортусов I триместра гестации около 50% имеют аномальный кариотип (Баранов В.С., 2009). Таким образом, в половине случаев, причиной остановки развития беременности в I триместре являются хромосомные аномалии, в то время как причина гибели другой половины плодов может иметь мультифакторную природу.

Одним из факторов невынашивания беременности является дефицит фолиевой кислоты и витаминов группы В, связанный с особенностями диеты и с дефектами в генах фолатного обмена, что, в свою очередь, приводит к избыточному накоплению гомоцистеина в крови матери и плода. Гомоцистеин обладает опосредованным и выраженным прямым эмбриотоксическим действием. Гомоцистеин связывает оксид азота (NO), основной фактор вазодилатации, тем самым в избыточных количествах стимулируя адгезию лимфоцитов к эндотелию, нарушая пролиферацию эндотелиоцитов (Макацария А. Д., 2011).

Гипергомоцистеинемия является фактором риска дефектов имплантации эмбриона, хронической фетоплацентарной недостаточности, развития тяжелых пороков, задержки роста или гибели плода (Назаренко М.С., 2006; Kum et al., 2011).

Фолаты необходимы для синтеза и метилирования ДНК, РНК, белков и фосфолипидов, нейротрансмиттеров; участвуют в репарации двунитевых разрывов ДНК, в противном случае запускаются механизмы апоптоза клетки. Фолаты необходимы для регуляции экспрессии генов посредством метилирования ДНК.

Другим важным фактором неразвивающейся беременности является нарушение процесса имплантации оплодотворенной яйцеклетки, вследствие нарушения формирования полноценной сосудистой системы хориона и плаценты. Необходимым фактором плацентации и инвазии трофобласта является сосудисто-эндотелиальный фактор роста А (VEGF-A, фактор ангиогенеза), который является основным индуктором ангиогенеза. Известно, что при невынашивании беременности его уровень в крови матери снижен (Kum et al., 2011). Фактор VEGF-A стимулирует пролиферацию,

миграцию, проницаемость и гомеостаз эндотелиальных клеток сосудов, стимулирует дифференцировку цитотрофобласта.

Снижение уровня VEGF-A обуславливает апоптоз эндотелия, что ведет к обструкции просвета и регрессии сосудов. Ген VEGF-A экспрессируется в децидуальной ткани и клетках вневорсинчатого цитотрофобласта. К настоящему времени в гене VEGF описано 214 однонуклеотидных полиморфизмов, некоторые из них по данным ряда авторов ассоциированы с осложнениями беременности: неразвивающаяся беременность, преэклампсия, HELLP-синдром, преждевременные роды, привычное невынашивание беременности (Беспалова О.Н., 2009; Coulam C. et al., 2008; Lee H. et al., 2009; Su M. et al., 2011; Aggarwal S. et al., 2011).

Современные исследования выявления причин нарушений репродукции проводятся на молекулярном и генетическом уровне с целью установления тонких механизмов фолликулогенеза, овуляции, оплодотворения, nidации и имплантации яйцеклетки (Радзинский В.Е. и др., 2009).

В настоящей работе представлены результаты совместного изучения полиморфных вариантов генов фолатного обмена (MTHFR, MTR, MTRR) и гена фактора ангиогенеза (VEGF-A) у матерей и плодов в случае неразвивающейся беременности в качестве фактора неспецифических морфологических изменений хориона и нарушений микроциркуляции в системе мать-плацента-плод. Предполагается, что полиморфные варианты рассмотренных генов совместно модулируют риск нарушений развития хориона и децидуальной ткани и, как следствие, нарушения процессов nidации и имплантации плодного яйца.

Результаты работы позволят на основании клиничко-лабораторных исследований выявлять на прегравидарном этапе женщин группы повышенного риска формирования фето-плацентарной дисфункции. Полученные данные могут стать основой для разработки акушерами-гинекологами комплекса целенаправленных мер профилактики нарушений формирования фето-плацентарного кровообращения, определения правильной тактики ведения будущей беременности с целью снижения перинатальных осложнений и потерь.

Степень разработанности темы

Исследования по изучению влияния полиморфных вариантов генов обмена фолатов на плодном материале были проведены узким кругом авторов. Более ранние исследования (Isotalo et al., 2000; Zetterberg et al., 2002), были проведены на тотальной выборке спонтанно погибших плодов после 16 недель гестации, недифференцированной по кариотипу и в клиничко-морфологическом отношении. Группой сравнения были женщины без случаев невынашивания беременности в анамнезе. В более поздних работах (Назаренко М.С., 2005; Kim S. Y. et al., 2011) полиморфизм генов фолатного цикла изучали у плодов с нормальным кариотипом, погибших на ранних этапах развития, сравнение проводилось с группой эмбрионов с нормальным

внутриутробным развитием. Такая методология более эффективна с точки зрения изучения биологии развития человека. В целом результаты исследований довольно противоречивы. Часть работ выявили риск привычного спонтанного аборта при наличии в генотипе женщин или плодов ряда полиморфных аллелей генов фолатного цикла. В работах других авторов таких ассоциаций выявить не удалось.

По изучению полиморфизма гена сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF-A) проведено большое количество исследований, в которых установлена связь между различными осложнениями беременности (преэклампсия, HELLP-синдром, привычное невынашивание беременности, преждевременные роды) и некоторыми аллельными вариантами гена VEGF-A (Papazoglou D. et al., 2005; Lee H.H. et al., 2010; Aggarwal S. et al., 2011). На материале плодов ранних сроков развития таких исследований не проводилось.

Таким образом, в настоящей работе предстоит проанализировать селективную роль полиморфных вариантов генов фолатного обмена и гена сосудисто-эндотелиального фактора в этиологии неразвивающейся беременности на модели абортусов I триместра.

Цель исследования

Установить роль полиморфных вариантов генов метаболизма фолатов (MTHFR, MTRR, MTR) и гена фактора ангиогенеза (VEGF-A) в нарушении формирования сосудов плаценты для усовершенствования тактики лабораторной диагностики причин неразвивающейся беременности.

Задачи исследования

1. Изучить распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов фолатного обмена и гена фактора ангиогенеза у матерей и плодов основной и контрольной группы.
2. Провести анализ ассоциации выявленных у матерей и плодов сочетаний аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов фолатного обмена и гена фактора ангиогенеза с неразвивающейся беременностью.
3. Провести анализ ассоциаций аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена фактора ангиогенеза (VEGF-A) с различными патоморфологическими нарушениями формирования сосудов плаценты при неразвивающейся беременности.
4. Разработать алгоритм лабораторного обследования для определения генетического риска неразвивающейся беременности.

Научная новизна исследования

Впервые совместно исследованы полиморфизмы генов обмена фолатов и гена фактора ангиогенеза у женщин с неразвивающейся беременностью I триместра и их плодов, что позволило получить прямые доказательства роли изучаемых вариантов генов на ранних, критических этапах онтогенеза человека.

Выявлена ассоциация полиморфизма 936 C>T гена VEGF-A с неразвивающейся беременностью первого триместра при генотипе матери и/или плода 936CT или 936TT. Определена ассоциация полиморфизма -634 G>C гена VEGF-A с формированием гиповаскуляризации или аваскуляризации ворсин хориона при генотипе матери -634GC или -634CC. Представлены данные о низком риске повторного случая неразвивающейся беременности или самопроизвольного выкидыша первого триместра гестации при наличии у женщины генотипов 66 AG и 66GG полиморфизма гена метионин-синтазы редуктазы MTRR 66 A>G.

Доказано, что для выявления женщин группы повышенного риска формирования сосудистой фетоплацентарной дисфункции эффективно применение модели прогноза риска неразвивающейся беременности, включающей генотипы матери (MTRR 66AG) и плода (MTR 2756GG, VEGF-A 936TT) по полиморфным вариантам генов фолатного цикла и гена фактора ангиогенеза, морфологические признаки развития и дифференцировки хориона и данные акушерско-гинекологического анамнеза.

Теоретическая и практическая значимость

Впервые совместно исследованы полиморфизмы генов обмена фолатов и гена фактора ангиогенеза у женщин с неразвивающейся беременностью I триместра и их плодов, что позволило получить прямые доказательства роли изучаемых вариантов генов на ранних, критических этапах онтогенеза человека.

Разработан алгоритм молекулярно-генетического тестирования полиморфных вариантов генов фолатного обмена и гена фактора ангиогенеза для определения генетического риска неразвивающейся беременности.

Для женщин, без случаев невынашивания беременности в анамнезе, на этапе прегравидарной подготовки, эффективно генотипирование по полиморфизму -634G>C гена VEGF-A для диагностики индивидуального риска развития гиповаскуляризации или аваскуляризации ворсин хориона и, как следствие, формирование неразвивающейся беременности.

Для женщин, имеющих в анамнезе случай неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации с нормальным кариотипом плода, клинически информативно прогнозирование индивидуального риска повторного случая неразвивающейся беременности по предложенной модели, включающей генотипы матери и плода по полиморфным вариантам генов фолатного цикла и гена фактора ангиогенеза, результаты гистологического исследования абортного материала предыдущего случая неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации и данные акушерско-гинекологического анамнеза.

Методология и методы исследования

Для реализации цели исследования и обоснования основных положений были использованы анализ литературы, молекулярно-генетические,

цитогенетические и морфологические методы и статистическая обработка данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлена ассоциация полиморфизма 936C>T гена VEGF-A с неразвивающейся беременностью. Риск формирования неразвивающейся беременности первого триместра при генотипе матери и\или плода 936СТ или 936ТТ достоверно выше, чем при альтернативном генотипе 936 СС.

2. Формирование сосудов хориона ассоциировано с полиморфизмом -634 G>C гена VEGF-A. Риск формирования гиповаскуляризации или аваскуляризации ворсин хориона достоверно выше при генотипе матери -634GC или -634СС, чем при альтернативном генотипе -634GG.

3. Для выявления супружеских пар группы повышенного риска формирования сосудистой фетоплацентарной дисфункции, достоверно эффективно применение модели прогноза риска неразвивающейся беременности, включающей генотипы матери и плода по полиморфным вариантам генов фолатного цикла и гена ангиогенеза, морфологические признаки развития и дифференцировки хориона и данные акушерско-гинекологического анамнеза.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным объемом и структурой клинических групп, методическим подходом, основанным на применении современных высокотехнологичных молекулярно-генетических методов в сочетании с классическим цитогенетическим и морфологическим анализом, продуманный и логичный дизайн исследования, включающий в себя не только изучение материнских полиморфизмов, но и исследование генетических факторов плодов.

Материалы диссертации представлены на следующих научно-практических конференциях:

1. IV Региональный Научный Форум «Мать и дитя», 28-30 июня 2010 г., Екатеринбург.

2. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010», ноябрь 2010 г., Москва.

3. Итоговая научная сессия кафедры акушерства и гинекологии ФПК ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава» и ФГУ НИИ ОММ Минздравсоцразвития РФ, 7-8 декабря 2010 г., Екатеринбург.

4. I Международная научно-практическая конференция «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий», 31 марта 2011 г., Екатеринбург.

5. XII Всероссийский Научный Форум «Мать и дитя», 27-30 сентября 2011 г., Москва.
6. Научно-практическая конференция «Инновационные технологии в охране здоровья матери и ребенка», 5-6 декабря 2012 г., Екатеринбург.
7. V съезд акушеров гинекологов России и XIV Всероссийский научный форум «Мать и дитя», 24-27 сен.2013, г. Москва.
8. III Конгресс акушеров-гинекологов Уральского федерального округа и V Российско-Германский конгресс по гинекологии и акушерству «Репродуктивное здоровье в центре внимания медицинского общества», 14-16 октября 2013г., Екатеринбург.
9. Конференция "Молекулярная диагностика 2014" , 18-20 марта 2014 г, Москва.
10. Конференция «Консолидация науки и практики в лабораторной медицине», 25-27 марта 2014 г., Москва.
11. Научно-практическая конференция с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства и гинекологии», посвященная 100-летию со дня рождения Малышевой Р.А., 14-15 октября 2014 г., Екатеринбург.

Внедрение результатов исследования. Для внедрения в клиническую практику разработан алгоритм клинико-лабораторного обследования для определения генетического риска повторного случая неразвивающейся беременности. Подана заявка № 2013146731\15 на патент «Способ прогноза риска регресса беременности в первом триместре» (Тема № 012012561, МПК – У01М).

Результаты диссертационного исследования используются в практической работе ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», ГБУЗ СО «ОДКБ №1», МБУ «ДГБ №10», г. Екатеринбург.

Личный вклад автора. Диссертант непосредственно участвовал на всех этапах процесса создания диссертации: в разработке темы и дизайна работы, в получении исходных данных, в обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Публикации результатов исследования. По материалам опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в журналах, реферируемых ВАК, и 9 тезисов в сборниках материалов научно-практических конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация содержит 160 страниц машинописного текста, 54 таблицы, 2 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методик, глав собственных исследований и их анализа, алгоритма прогнозирования риска неразвивающейся беременности, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиография включает 131 литературных источников (42 отечественных, 89 зарубежных публикаций).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Настоящая работа представляет собой ретроспективное сравнительное когортное исследование. Материалом исследования послужили данные молекулярно-генетического исследования полиморфных вариантов генов обмена фолатов (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298 A>C, MTRR 66 A>G, MTR 2756 A>G) и гена фактора ангиогенеза (VEGFA 936 C>T, VEGFA -634 G>C) ДНК беременных I триместра и абортированных эмбрионов\плодов, а также результаты цитогенетического и патоморфологического исследования abortного материала.

Основную группу составили 116 беременных I триместра. По тяжести нарушения эмбрионального развития 103 случая были с клиническим диагнозом неразвивающейся беременности по типу гибели эмбриона\плода. В 13 случаях зарегистрирована неразвивающаяся беременность по типу анэмбрионии, характеризующаяся отсутствием эмбриональных структур в полости плодного мешка. В данной группе в 101 случае беременность наступила естественным путем, в 15 случаях в результате вспомогательных репродуктивных технологий.

Критерии включения в основную группу:

- неразвивающаяся беременность I триместра;
- естественное зачатие или ВРТ в естественном цикле;
- один и более спонтанных выкидышей в анамнезе.

Критерии исключения из основной группы:

- многоплодная беременность;
- ВРТ в стимулированном цикле;
- анатомические аномалии матки (удвоение, двурогая, однорогая матка, частичная или полная внутриматочная перегородка, внутриматочные синехии - синдром Ашермана);
- тяжелые эндокринные нарушения у женщины (некомпенсированный гипо- и гипертиреоз, некомпенсированный сахарный диабет, органические поражения гипофиза);
- аномалии конститутивного кариотипа супругов.

Контрольную группу составили 116 беременных I триместра, принявших решение о проведении искусственного аборта. У женщин данной группы не выявлены случаи невынашивания беременности в анамнезе и есть один и более здоровый ребенок.

Критерии включения в контрольную группу:

- физиологически протекающая беременность I триместра;
- нормальный кариотип плода настоящей беременности;
- один и более здоровый ребенок в семье.

Критерий исключения из контрольной группы:

- случаи невынашивания беременности в анамнезе.

Средний возраст женщин основной группы составил $32,5 \pm 0,5$ года (21-44 лет), в контрольной группе – $28,6 \pm 0,6$ лет (18-28 лет).

Эмбриональные ткани получали из полости матки методом вакуум-аспирации или методом кюретажа. Гестационный срок беременности в основной группе составил 8-11,5 недель (10 недель \pm 4 дня), в контрольной группе – 5-12 недель (9 недель \pm 4 дня), $p > 0,05$. Гестационный возраст гибели плодов основной группы составил 4-11,5 недель (8 недель \pm 3 дня). В контрольной группе возраст плодов соответствовал сроку беременности.

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК женщин, выделенные с использованием коммерческих комплектов реагентов «Цитолизин», и образцы ДНК плодов, полученные из ворсин хориона с применением коммерческих наборов реагентов «Сорб С» и протоколов для выделения ДНК фирмы ООО «ИнтерЛабСервис», Россия. Анализ генетических полиморфизмов осуществляли коммерческими наборами реагентов методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «режиме реального времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации. Анализ результатов ПЦР проводили в автоматическом режиме программного обеспечения детектирующего амплификатора ДТ-96 (НПО «ДНК-Технология», Россия).

Материалом для цитогенетического исследования послужил материал абортированных плодов женщин основной ($n=116$) и контрольной ($n=116$) групп для определения кариотипа. Образцы биологического материала получали в ходе вакуум аспирации или инструментального удаления продуктов зачатия беременности. На биологическом материале продуктов зачатия было выполнено стандартное цитогенетическое исследование, позволяющее выявлять числовые и структурные аномалии хромосом.

При морфологическом исследовании соскобов эндометрия неразвивающейся беременности проводили углубленное микроскопическое исследование децидуальной ткани маточно-плацентарной области и ворсин незрелой плаценты (хориона).

Для описания данных морфологического исследования биологического материала была разработана и применена схема анализа морфологических признаков, характеризующих состояние эндометрия и ворсин хориона с учетом степени выраженности наиболее информативных признаков. Схема анализа была разработана на основе усовершенствованной медицинской технологии «Морфологические параметры дифференциальной диагностики эндометриальной и плацентарной недостаточности при ранних самопроизвольных абортах» Кузнецовой Р.А. и соавторов, 2009 г.

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 7.0 и SPSS 13.0. Результаты параметрических переменных с нормальным распределением представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка ($M \pm m$). Различия между параметрическими переменными с нормальным распределением устанавливались при помощи

t-критерия Стьюдента. Сравнение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов отдельных генов между анализируемыми группами

проводилось при помощи χ^2 Пирсона (Person) и χ^2 Йетса (Yates) для числа наблюдений менее 10.

Силу ассоциации аллелей и генотипов с предрасположенностью к заболеванию оценивали по показателю отношения шансов (odds ratio, OR) с 95% доверительным интервалом (95%CL). Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$. Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга в группах проводили с помощью критерия χ^2 с использованием программы Hardy-Weinberg equilibrium.

Для оценки роли межгенных взаимодействий в патогенезе формирования риска неразвивающейся беременности использовали многофакторные методы статистического анализа: логистический регрессионный анализ и общий дискриминантный анализ.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитогенетические исследования

В результате цитогенетического исследования 116 образцов биологического материала продуктов зачатия неразвивающейся беременности в 54 случаях (46%) выявлен нормальный кариотип и в 62 случаях (54%) аномальный кариотип плодов. Среди аномальных кариотипов 19% представлены в мозаичной форме (12 случаев).

Доля аномальных кариотипов (54%) и частота встречаемости наиболее распространенных трисомий (хромосом 16, 22, 21, 13, половых), моносомии X, триплоидии, структурных перестроек хромосом согласуется с результатами, полученными на выборках из других популяций.

Самой распространенной трисомией определена трисомия 16 хромосомы, 15% случаев. Следующими по частоте встречаемости регистрировались трисомии хромосом 21 и 22 (по 8% случаев). Достаточно часто встречалась моносомия X хромосомы, 13% случаев. Структурные перестройки хромосом в кариотипе плодов были выявлены в двух случаях и представлены делецией длинного плеча хромосомы 16 (46,XX,del(16)(q12)) и нерцепрокной транслокацией хромосом 3 и 5 (46,XY,t(3;5)(q25;q35)). В проведенном исследовании полиплоидия была представлена только в варианте триплоидии с частотой 16% (10 случаев). В работе были обследованы 6 случаев анэмбрионии. Аномальный кариотип зарегистрирован у двух эмбрионов и представлен трисомией хромосомы 1.

Особенностью полученных результатов является высокая частота мозаичных форм хромосомных нарушений, которые составили 19 % (12 случаев) от числа аномальных кариотипов. Это на порядок выше частоты мозаицизма ограниченного плацентой (1-2%) по данным пренатальной диагностики на материале ворсин хориона при физиологически развивающейся беременности.

Таким образом, частота хромосомных аномалий среди плодов 8-11,5 недель (10 недель \pm 4 дня) гестации при неразвивающейся составила 54%.

Значительная часть аномальных кариотипов абортусов представлена мозаичными вариантами (19%).

Морфологические исследования

При морфологическом исследовании биологического материала случаев неразвивающейся беременности прицельно проводили анализ двух компонентов: децидуальной ткани маточно-плацентарной области и ворсин незрелой плаценты (хориона). Срок беременностей составил 8-11,5 недель (10 недель+4 дня).

Известно, что результатом гравидарной трансформации эндометрия и инвазии трофобласта является формирование плодово-плацентарного кровообращения, что является критическим фактором для дальнейшего роста эмбриона. В нашем исследовании плодово-плацентарное кровообращение было сформировано адекватно сроку беременности только в 21% случаев.

В проведенном исследовании было определено, что у плодов с аномальным кариотипом достоверно чаще (72% случаев) наблюдалось полное отсутствие васкуляризации ворсин хориона ($p=0,05$, $OR=2,72$, $95\%CL:1-7,36$) в сравнении с плодами без хромосомных аномалий. Однако, статистически не отличалась частота встречаемости полного отсутствия васкуляризации ворсин хориона (48%) или недостаточная их васкуляризация (39%). Следовательно, формирование сосудов хориона зависит от многих факторов ангиогенеза и определяется не только аномалиями кариотипа плода (таблица 1).

Таблица 1

Васкуляризация ворсин хориона в зависимости от кариотипа плода при неразвивающейся беременности

Васкуляризация	Частота, %		p	OR(95%CL)
	нормальный кариотип эмбриона	хромосомная аномалия эмбриона		
1. отсутствует	48	72	p=0,07	
2. недостаточная	39	15		
3. адекватная сроку гестации	13	13		
1. отсутствует	48	72	p=0,046	2,72(1-7,36) 0,37 (1,0-0,14)
2. недостаточная или адекватная сроку гестации	52	28		

Таким образом, риск полного отсутствия васкуляризации ворсин хориона на фоне хромосомной аномалии у плода в 2,7 раза выше, чем при нормальном кариотипе плода при неразвивающейся беременности ($p=0,046$, $OR=2,72$, $95\%CL:1-7,36$).

Молекулярно-генетические исследования полиморфизмов генов обмена фолиевой кислоты

Полиморфные варианты генов фолатного обмена могут приводить к нарушениям обмена гомоцистеина в крови матери и плода. Гомоцистеин обладает опосредованным и выраженным, прямым эмбриотоксическим действием, способствует образованию микротромбозов в спиральных артериях.

По результатам комплексного анализа частоты распространения вариантных аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов обмена фолиевой кислоты MTHFR 677C>T, 1298 A>C, MTRR 66 A>G, MTR 2756 A>G у женщин и плодов при неразвивающейся беременности и в контрольной группе получены следующие результаты. У женщин с неразвивающейся беременностью выявлена ассоциация генотипа MTRR 66AA полиморфизма MTRR 66 A>G с повторными случаями потери беременности ($p=0,035$, $OR=2,44$, $95\%CL:1,06-5,64$), таблица 2.

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма MTRR 66 A>G в группе женщин с привычным невынашиванием беременности и женщин контрольной группы

Ген (полиморфизм)	генотип/ аллель	Женщины с ПН, абс.(%)	Женщины контрольной гр., абс.(%)	p	OR(CL95%)
MTRR 66A>G	AA	12(30,8)	18(15,4)	0,086	
	AG	16(41)	66(56,4)		
	GG	11(28,2)	33(28,2)		
	A	40(51,3)	156(42,2)	0,24	
	G	38(48,7)	214(57,8)		
	AA	12(30,8)	25(13,5)	0,035*	2,44(1,06-5,64)
	AG+GG	23(69,2)	160(86,5)		0,41(0,94-0,18)
	GG	11(28)	33(28)	-	
AA+AG	28(72)	84(72)			

*Доминантная модель наследования.

В проведенном исследовании выявлена ассоциация аллеля MTR 1256G полиморфизма MTR 2756 A>G женщин с хромосомным дисбалансом у плода при неразвивающейся беременности ($p=0,047$, $OR=2,02$, $95\%CL:1,0-4,04$), таблица 3.

Таблица 3

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма MTR 2756 A>G у женщин с неразвивающейся беременностью с нормальным и аномальным кариотипом плода.

Ген (полиморфизм)	генотип/ аллель	Женщины с аномальным кариотипом плода, абс.(%)	Женщины с нормальным кариотипом плода, абс.(%)	p	OR(CL95%)
MTR 2756A>G	AA	28(60,9)	47(74,6)	0,13	
	AG	14(30,4)	15(23,8)		
	GG	4(8,7)	1(1,6)		
	A	70(76,1)	109(86,5)	0,047	0,5(1,0-0,25)
	G	22(23,9)	17(13,5)		2,02(1,0-4,04)
	AA	28(60,9)	47(74,6)	0,13	
	AG+GG	18(39,1)	16(25,4)		
	GG	4(8,7)	1(1,6)	0,08	
AA+AG	42(91,3)	62(98,4)			

Молекулярно-генетические исследования полиморфизмов гена фактора ангиогенеза VEGF-A

Сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF-A отвечает за эндометриальный ангиогенез, гравидарное ремоделирование сосудов и формирование трофобласта. Полиморфизм гена VEGF-A может способствовать нарушению формирования плацентарного комплекса при неразвивающейся беременности, так как аллельные варианты гена VEGF-A могут влиять на уровень синтеза сосудисто-эндотелиальный фактор роста в тканях беременной и плода.

По результатам комплексного анализа частоты распространения вариантных аллелей и генотипов полиморфных вариантов 936 C>T и -634 G>C гена фактора ангиогенеза VEGF-A у женщин и плодов случаев неразвивающейся беременности и в контрольной группе получены следующие результаты. У женщин при неразвивающейся беременности и разной степени нарушения васкуляризации хориона наблюдается более высокая частота генотипов -634 CC и GC полиморфизма VEGF-A -634 G>C, чем в контрольной группе (p=0,04, OR=1,87, 95%CL: 1,02-3,44), таблица 4.

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 634 G>C гена VEGF-A у женщин при неразвивающейся беременности с гипо- и аваскуляризацией хориона и контрольной группе женщин.

Ген (полиморфизм)	генотип/ аллель	Женщины с гипо- и аваскуляризацией хориона, абс.(%)	Женщины контрольной гр., абс.(%)	p	OR(95%CL)
VEGF-A -634 G>C	GG	27(39,7)	64(55,2)	0,1	
	GC	34(50)	41(35,3)		
	CC	7(10,3)	11(9,5)		
	G	88(64,7)	169(72,8)	0,1	
	C	48(35,3)	63(27,2)		
	GG	27(39,7)	64(55,2)	0,04	0,54(0,98-0,29)
	GC+CC	41(60,3)	52(44,8)		1,87(1,02-3,44)
	CC	7(10,3)	11(9,5)	0,9	
GC+GG	61(89,7)	105(90,5)			

Формирование системы мать-плацента-плод представляет собой гравидарную трансформацию децидуальной ткани под влиянием хориона. Степень активной инвазии трофобласта определяет гравидарную трансформацию децидуальной ткани и ее сосудов. Поэтому для анализа возможной ассоциации аллельных вариантов 936 C>T и -634 G>C гена VEGF-A с риском неразвивающейся беременности были объединены образцы ДНК женщин и плодов в основной и контрольной группе. В результате, в подгруппе мать-плод при неразвивающейся беременности наблюдается достоверно более высокая частота генотипов 936CT и 936TT полиморфизма VEGF-A 936 C>T, чем в подгруппе мать-плод при физиологически протекающей беременности (OR=1,51, 95%CL:1-2,27, p=0,048), таблица 5.

Распределение частот аллелей и генотипов
 полиморфизма 936 С>Т гена VEGF-A
 в подгруппах женщина-плод при неразвивающейся (НБ) и контрольной
 группе

Ген (полиморфизм)	генотип/ аллель	Женщины и плоды НБ, абс.(%)	Женщины и плоды котр.гр., абс.(%)	p	OR(95%CL)
VEGF-A 936 С>Т	СС	126(63,6)	169(72,5)	0,1	
	СТ	67(33,8)	57(24,5)		
	ТТ	5(2,5)	7(3)		
	С	319(80,6)	395(84,8)	0,1	
	Т	77(19,4)	71(15,2)		
	СС	126(63,6)	169(72,5)	0,048	0,66(1-0,44)
	СТ+ТТ	72(36,4)	64(27,5)		1,51(1-2,27)
	ТТ	5(2,5)	7(3)	0,8	
СТ+СС	193(97,5)	226(97)			

Таким образом, по результатам исследования полиморфных вариантов 936 С>Т и -634 G>C гена VEGF-A у женщин с неразвивающейся беременностью выявлена ассоциация генотипов VEGF-A -634 СС и GC с риском гипо- или аваскуляризации хориона (p=0,04). И для совокупной подгруппы женщин и плодов выявлена ассоциация генотипов VEGF-A 936 СТ и 936 ТТ с риском неразвивающейся беременности (p=0,048).

Алгоритм прогнозирования риска неразвивающейся беременности

Сформирована модель прогноза риска неразвивающейся беременности с нормальным кариотипом плода, путем вычисления прогностического индекса R по формуле:

$$R = \sum k_i \times X_i + B$$

$$R = -0,7 \times X_1 + 5,1 \times X_2 + 1,7 \times X_3 + 9,8 \times X_4 + 8,6 \times X_5 - 15,2 \times X_6 + 32,2 \times X_7 + 43,7 \times X_8 - 2,3 \times X_9 + 6,3 \times X_{10} + 6,0 \times X_{11} + 7,6$$

Где R – прогностический индекс;

k_i - коэффициенты дискриминантной функции для каждого признака уравнения прогноза;

X_i - признаки прогноза сформированной модели;

B – константа уравнения дискриминантной функции.

X_1 – количество беременностей у матери в анамнезе;

X_2 – два и более случаев самопроизвольного выкидыша или неразвивающаяся беременность в анамнезе. Наличие данного признака принимают за 1, отсутствие за 0;

X_3 – количество внематочных беременностей в анамнезе матери;

X₄– отсутствие васкуляризации ворсин при неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации. Наличие признака принимают за 1, отсутствие за 0;
X₅ – гиповаскуляризация ворсин хориона неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации. Наличие признака принимают за 1, отсутствие за 0;
X₆ – выраженная пролиферация эпителия и инвазия трофобласта при неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации. Наличие признака принимают за 1, отсутствие признака – 0;
X₇ – умеренная пролиферация эпителия и инвазия трофобласта при неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации. Наличие признака принимают за 1, отсутствие признака – 0;
X₈ – слабая пролиферация эпителия и инвазия трофобласта при неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации. Наличие признака принимают за 1, отсутствие признака – 0;
X₉– генотип женщины MTRR 66AG. Наличие генотипа MTRR 66AG у женщины принимают за 1, наличие других генотипов по данному полиморфизму принимают за 0;
X₁₀ – генотип плода MTR 2756GG. Вероятность появления у плода генотипа MTR 2756GG принимают за 1, вероятность появления других генотипов по данному полиморфизму принимают за 0;
X₁₁ – генотип плода VEGF-A 936TT. Вероятность появления у плода генотипа VEGF-A 936TT принимают за 1, вероятность появления других генотипов по данному полиморфизму принимают за 0.

При значении прогностического индекса $R > 0$, прогнозируют высокий риск неразвивающейся беременности. При $R \leq 0$ судят о низком риске неразвивающейся беременности.

Эффективность полученной модели прогноза в целом составила 98%, чувствительность 95%, специфичность 100% ($p < 0,05$).

Полученный метод прогнозирования неразвивающейся беременности рекомендуется применять на этапе планирования беременности супружеской парой. По результатам расчетов величины прогностического индекса R женщина может быть отнесена в группу низкого или высокого риска неразвивающейся беременности. Женщинам группы высокого риска может быть рекомендована необходимая терапия, направленная на стимуляцию маточно-плацентарного кровообращения для профилактики явлений оксидативного стресса в фето-плацентарной системе.

Способ прогноза неразвивающейся беременности по разработанной модели осуществляют следующим образом:

1. При анализе анамнеза выделяют:
 - количество беременностей;
 - количество внематочных беременностей;
 - привычное невынашивание беременности (два и более случаев спонтанного выкидыша или неразвивающейся беременности до 12 недель гестации).

2. Проводят анализ гистологическое исследование абортного материала предыдущего случая неразвивающейся беременности 8-12 недель и выявляют следующие морфологические признаки:

- степень развития сосудов в ворсинах хориона: адекватная сроку гестации васкуляризация, гиповаскуляризация или аваскуляризация ворсин хориона;

- степень пролиферации эпителия трофобласта: выраженная пролиферация эпителия и инвазия трофобласта, умеренная или слабая.

3. Для расчетов по формуле прогноза необходимы генотипы матери и вероятные генотипы плода по полиморфным вариантам генов фолатного цикла и гена фактора ангиогенеза. Поэтому, проводят генотипирование супругов по полиморфизмам VEGF-A 936 C>T и MTRR 2756A>G. Для женщины дополнительно проводят генотипирование полиморфизма MTRR 66A>G. По результатам генотипирования родителей производят теоретический расчет возможных генотипов у плода, согласно менделевским правилам наследования, по полиморфизмам VEGF-A 936C>T и MTRR 2756A>G

4. По предложенной формуле рассчитывают прогностический индекс – R.

ВЫВОДЫ

1. В подгруппе, объединяющей женщин и плоды случаев неразвивающейся беременности, достоверно чаще встречаются генотипы 936CT и 936TT полиморфизма VEGF-A 936C>T, $p=0,048$. Относительный риск формирования неразвивающейся беременности первого триместра при наличии у женщины и/или плода генотипа 936CT или 936TT гена VEGF-A составляет 1,51 (OR=1,51, 95%CL: 1-2,27, $p=0,048$).

2. У женщин при неразвивающейся беременности с гиповаскуляризацией или аваскуляризацией ворсин хориона наблюдается достоверно более высокая частота генотипов -634GC и -634CC полиморфизма VEGF-A -634G>C, $p=0,04$. Относительный риск формирования гиповаскуляризации или аваскуляризации ворсин хориона в случае неразвивающейся беременности составляет 1,87 при наличие у женщины генотипа -634CC или -634GC гена VEGF-A (OR=1,87, 95%CL: 1,02-3,44, $p=0,04$).

3. Выявлена ассоциация полиморфизма 66 A>G гена MTRR с повторными случаями неразвивающейся беременности и/или самопроизвольного выкидыша первого триместра гестации. Относительный риск повторного случая ранней потери беременности I триместра при наличии у женщины генотипа MTRR 66 AA составляет 2,44 (OR=2,44, 95%CL:1,06-5,64, $p=0,035$).

4. В подгруппе женщин с неразвивающейся беременностью и хромосомной аномалией у плода достоверно чаще встречается аллель 2756G

полиморфизма MTR 2756A>G ($p=0,047$). Относительный риск формирования хромосомной аномалии у плода при неразвивающейся беременности в присутствии в генотипе женщины аллеля 2756G полиморфизма MTR 2756A>G составляет 2,02 (OR=2,02, 95% CL:1,0-4,04, $p=0,047$).

5. Разработана модель прогноза риска повторного случая неразвивающейся беременности по результатам генотипирования матери и плода по полиморфным вариантам генов фолатного цикла и гена фактора ангиогенеза и гистологического исследования abortного материала случая неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации, данным акушерско-гинекологического анамнеза. Эффективность модели прогноза в целом составила 98%, чувствительность - 95%, специфичность - 100% ($p<0,05$).

6. Разработан алгоритм лабораторного обследования на прегравидарном этапе по полиморфным вариантам генов фолатного обмена и гена фактора ангиогенеза для определения генетического риска неразвивающейся беременности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Практические рекомендации разработаны для врачей клинической лабораторной диагностики и лабораторной генетики, акушеров – гинекологов для применения в практике акушерско-гинекологических стационаров и женских консультаций.

1. Для женщин без случаев невынашивания беременности в анамнезе для определения риска неразвивающейся беременности на этапе прегравидарной подготовки рекомендуем генотипирование по полиморфизму -634G>C гена VEGF-A. Относительный риск развития недостаточной васкуляризации или аваскуляризации ворсин хориона и, как следствие, формирование неразвивающейся беременности составляет 1,87 при наличии у женщины генотипа -634 CC или -634GC гена VEGF-A (OR=1,87, CL95% 1,02-3,44, $p=0,04$), схема 1.

2. Для женщин, имеющих в анамнезе случай неразвивающейся беременности 8-12 недель гестации без хромосомной патологии плода, для определения риска неразвивающейся беременности на этапе прегравидарной подготовки рекомендуем применение разработанного алгоритма обследования для прогноза риска повторного случая неразвивающейся беременности. Данный алгоритм включает анализ результатов генотипирования полиморфных вариантов генов фолатного цикла и гена фактора ангиогенеза и результатов гистологического исследования abortного материала предыдущего случая неразвивающейся беременности, данных акушерско-гинекологического анамнеза.

Использование правила прогноза позволит определить женщину в группу повышенного риска формирования фето-плацентарной дисфункции и разработать комплекс целенаправленных мер профилактики нарушений формирования фето-плацентарного кровообращения, сформировать

правильную тактику ведения будущей беременности с целью снижения перинатальных осложнений и потерь, схема 1.

Схема 1

Алгоритм лабораторного обследования на прегравидарном этапе для определения риска неразвивающейся беременности



ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее изучение темы является перспективным научным направлением в профилактике привычного невынашивания беременности на ранних сроках гестации. В качестве перспектив дальнейшей разработки темы можно рассматривать:

- определение уровня сосудисто-эндотелиального фактора роста А в крови женщин с неразвивающейся беременностью I триместра на фоне различных генотипов по полиморфизмам -634G>C и 936C>T гена VEGF-A.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

1. Третьякова, Т.Б. Ассоциация полиморфных маркеров генов метаболизма фолатов с ранним регрессом беременности / Т.Б. Третьякова, Н.В. Башмакова, **Н.С. Демченко** // Уральский медицинский журнал. – 2011. – №12. – С. 35-38.

2. Третьякова, Т.Б. Генетические предикторы акушерских осложнений: межгенные ассоциации / Т.Б. Третьякова, Н.В. Башмакова, **Н.С. Демченко** // Российский вестник акушера – гинеколога. – 2012. – №6. – С.18-20.

3. **Демченко, Н.С.** Патогенез невынашивания беременности: роль сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF-A) (Обзор литературы) / Н.С. Демченко, Н.В. Башмакова, Т.Б. Третьякова // Уральский медицинский журнал. – 2012. – № 11. – С. 26-29.

4. Третьякова, Т.Б. Взаимодействие генов подверженности заболеваниям человека как фактор риска акушерских осложнений / Т.Б. Третьякова, Н.В. Башмакова, **Н.С. Демченко** // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 12. – С. 41-45.

5. Башмакова, Н.В. Цитогенетические нарушения у эмбриона при неразвивающейся беременности / Н.В. Башмакова, Т.Б. Третьякова, **Н.С. Демченко** // Российский вестник акушера–гинеколога. – 2013. – № 4. – С. 18-21.

6. **Демченко, Н.С.** Морфологические и цитогенетические аспекты неразвивающейся беременности / Н.С. Демченко, Т.Б. Третьякова, Н.В. Башмакова, Н.Р. Шабунина-Басок, А.Е. Каюкова // Проблемы репродукции. – 2014. – Т 20, № 6. – С. 76-82.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

7. Демченко, Н.С. Цитогенетические исследования в клинической практике врача акушера-гинеколога / Т.Б. Третьякова, Н.С. Демченко // IV Региональный Научный Форум «Мать и дитя», Екатеринбург, 28-30 июня 2010 г. – Екатеринбург, 2010. – С. 273-274.

8. Демченко, Н.С. Полиморфизм генов метаболизма фолиевой кислоты и витамина В₁₂ при невынашивании беременности / Т.Б. Третьякова, Н.С. Демченко // VII Всероссийская научно-практической конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010», Москва, ноябрь 2010 г., – М., 2010. –С. 127-128.

9. Демченко, Н.С. Генетический фактор неразвивающейся беременности: полиморфизм генов фолатного цикла у женщин и в материале абортированных эмбрионов / Н.С. Демченко, Т.Б. Третьякова // I Международная научно-практическая конференция «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы

современной медицинской науки, генетики и биотехнологий», Екатеринбург, 31 марта 2011 г. – Екатеринбург, 2011. – С. 97-98.

10. Демченко, Н.С. Генетический фактор неразвивающейся беременности: полиморфизм генов фоллатного цикла у женщин и в материале абортированных эмбрионов / Т.Б. Третьякова, Н.С. Демченко, Н.Е. Рукосуев // XII Всероссийский Научный Форум «Мать и дитя», Москва, 27-30 сентября 2011 г. – М., 2011. – С. 212-213.

11. Демченко, Н.С. Молекулярная диагностика предикторов инвазии и имплантации трофобласта при регрессирующей беременности: полиморфизм гена VEGF-A / Н.С. Демченко, Т.Б. Третьякова, А.Е. Каюкова // Конференция "Молекулярная диагностика 2014", Москва, 18-20 марта 2014 г. – М., 2014. – Т2. – С. 174-175.

12. Демченко, Н.С. Молекулярная диагностика предикторов регрессирующей беременности: полиморфизм гена VEGF-A / Демченко Н.С., Третьякова Т.Б., Каюкова А.Е. // Конференция «Консолидация науки и практики в лабораторной медицине», Москва, 25-27 марта 2014 г. – М., 2014. – Лаборатория. – № 1. – С. 5-8.

13. Демченко, Н.С. Роль полиморфных вариантов гена сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF-A) в генезе неразвивающейся беременности / Т.Б. Третьякова, Н.С. Демченко, Н.В. Башмакова, Н.Р. Шабунина-Басок, А.Е. Каюкова // Научно-практическая конференция с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства и гинекологии», посвященная 100-летию со дня рождения Малышевой Р.А., Екатеринбург, 14-15 октября 2014 г. – Екатеринбург, 2014. – С.84-86.

14. Демченко, Н.С. Совместное воздействие генетической предрасположенности и влияние факторов внешней среды на нарушения течения беременности / Т.Б. Третьякова, Н.Е. Рукосуев, Н.С. Демченко // Научно-практическая конференция с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства и гинекологии», посвященная 100-летию со дня рождения Малышевой Р.А., Екатеринбург, 14-15 октября 2014 г. – Екатеринбург, 2014. – С.82-83.

15. Демченко, Н.С. Морфологические и цитогенетические аспекты неразвивающейся беременности / Ю.И. Моторнюк, Т.Б. Третьякова, Н.С. Демченко // Научно-практическая конференция с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства и гинекологии», посвященная 100-летию со дня рождения Малышевой Р.А., Екатеринбург, 14-15 октября 2014 г. – Екатеринбург, 2014. – С.61-63.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НБ	неразвивающаяся беременность
MTHFR	метилентетрогидрофолатредуктаза
MTR	метионин-синтаза
MTRR	метионин-синтаза редуктаза
VEGF	сосудисто-эндотелиальный фактор роста
VEGF-A	сосудисто-эндотелиальный фактор роста А (фактор ангиогенеза)