

На правах рукописи

ГУТНИКОВА
Людмила Валерьевна

**Исследование прогностических биохимических
и молекулярно-генетических маркеров
эмбриогенеза человека**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2010

Работа выполнена в
федеральном государственном автономном образовательном учреждении
высшего профессионального образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шкурат Татьяна Павловна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Водолажская Маргарита Геннадьевна;
доктор биологических наук, профессор
Асланян Марлен Мкртичович.

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Ростовский государственный
медицинский университет» Росздрава РФ.

Защита диссертации состоится _____ 2010 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 при
Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставро-
поль, ул. Пушкина, д. 1, корп. 2, комн. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского госу-
дарственного университета.

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ржепаковский И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важной проблемой понимания процессов эмбрионального развития человека являются вопросы прогностического значения. Высокая пластичность организма в раннем периоде делает эмбрион более чувствительным к различным факторам среды, с другой стороны, существует возможность воздействия на него в целях коррекции. Существующие биохимические маркеры развития плода, такие как альфа-фетопротеин, хорионический гонадотропин и свободный эстриол, достоверны в прогнозе синдрома Дауна и пороков развития нервной трубки, и малоэффективны в прогнозе врожденных пороков развития других соматических органов и наследственных заболеваний, а также в прогнозе развития гипоксии и гипотрофии плода. История разработки биохимических маркеров развития плода насчитывает более 40 лет, тем не менее, большинство современных исследований направлено на изучение узкого круга патологий – хромосомных анеуплоидий, грубых врожденных пороков развития. В то же время существует необходимость дальнейшего углубленного изучения механизмов развития ранних этапов эмбриогенеза и разработки методов прогноза течения беременности на основе индивидуальных особенностей генотипов родителей.

Успехи молекулярной генетики, достигнутые в последние годы, сделали возможным изучение генной природы и молекулярных механизмов многофакторной патологии. Например, все метаболические процессы инактивации токсичных веществ контролируются генотипом и зависят от его индивидуальных особенностей (Van Lieshout, e.a., 1998; Баранов В.С., 2007; Coto, e.a., 2010). В группу генов предрасположенности к невынашиванию беременности, относят гены системы биотрансформации ксенобиотиков – любых чужеродных токсичных веществ, поступающих в организм. Повреждающее действие ксенобиотиков может реализоваться как в ходе гаметогенеза, так и при оплодотворении, имплантации, синцитиализации, плацентации и последующих стадиях эмбриогенеза.

Дальнейшая оптимизация программы пренатальной диагностики плода может быть направлена как на поиск новых маркеров, так и на повышение чувствительности уже используемых маркеров.

Актуальность проблемы, стремление теоретически и практически обосновать применение новых маркеров для оценки состояния плода с позиций современной эмбриологии, используя новые биохимические и молекулярно – генетические подходы, обусловило выполнение настоящей работы.

Цель работы: проведение исследований по оценке эффективности существующего биохимического пренатального скрининга, разработка способов его оптимизации, поиск новых биохимических и молекулярно-генетических маркеров крови беременных женщин для оценки развития плода.

Задачи исследования.

1. Провести ретроспективный и проспективный анализ биохимического пренатального скрининга у беременных Ростовской области в период с 2006 по 2009 гг. Исследовать региональные медианы недельного развития плода по сывороточным маркерам, определяемым иммуноферментным и иммунофлуо-

ресцентным методами, с целью оптимизации существующего пренатального скрининга.

2. Исследовать прогностическую значимость биохимических показателей эмбрионспецифических белков и гормонов (АФП, ХГЧ, св. эстриола, ТБГ, прогестерона, тестостерона, кортизола, ДГЭА-С, 17-ОН-прогестерона) в сыворотке матерей, родивших детей с низкой массой тела.

3. Исследовать прогностическую значимость показателей окислительного статуса крови матерей, родивших детей с низкой массой тела.

4. Изучить вклад однонуклеотидных замен генов матери и плода системы гемостаза в процессе эмбриональных потерь.

5. Изучить вклад однонуклеотидных замен генов матери и плода системы детоксикации (первой и второй фазы) в процессе эмбриональных потерь.

Научная новизна работы. Впервые, опираясь на большой статистический материал (более 30000 беременностей и их исходов), доказана целесообразность внедрения в существующий пренатальный скрининг региональных медиан для сывороточных маркеров крови независимо от их метода исследования. Введение региональных медиан сывороточных маркеров для беременных Ростовской области увеличивает чувствительность пренатального скрининга в среднем на 10%. Впервые показано, что увеличение уровня прогестерона, тестостерона, кортизола, хорионического гонадотропина человека и снижение концентрации свободного эстриола в крови матери во втором триместре достоверно ассоциировано с рождением детей с низким весом. Впервые показано, что снижение уровня антиоксидантных ферментов во втором триместре беременности может служить прогностическим маркером рождения ребенка с низкой массой тела. Впервые показано, что сочетание материнского и эмбрионального гетерозиготного носительства полиморфного аллеля A114V гена глутатион-S-трансферазы P1 ассоциировано с увеличением риска эмбриональной гибели плода. Впервые показано, что суммарное носительство в супружеской паре более трех полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков приводит к достоверному увеличению риска эмбриональных потерь.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Введение региональных норм для медиан альфа-фетопротеина, свободного эстриола и хорионического гормона человека повышает эффективность пренатального скрининга независимо от метода определения – иммуноферментного или иммунофлуоресцентного анализа.

2. Определение повышенного уровня хорионического гонадотропина человека во втором триместре беременности в сочетании с увеличением уровня кортизола, прогестерона, тестостерона и снижением уровня свободного эстриола является прогностическим алгоритмом для оценки риска развития гипотрофии плода.

3. Снижение уровня супероксиддисмутазы в сыворотке крови женщин во втором триместре беременности более чем на 35% ассоциировано с низкой массой тела новорожденного.

4. Риск ранних эмбриональных потерь увеличивается при гетерозиготном носительстве как матерью, так и эмбрионом полиморфного аллеля A114V гена глутатион-S-трансферазы P1.

5. Риск гибели эмбриона увеличивается при наличии у него более трех полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков.

Теоретическое и практическое значение работы. В общетеоретическом плане, полученные результаты расширяют представления о патобиохимических процессах эмбрионального развития человека и открывают новые перспективы их практического применения в пренатальной диагностике плода. Выполненная работа расширяет существующие представления о прогностических биохимических и молекулярно-генетических маркерах эмбриогенеза человека.

В результате проведения комплексных исследований по поиску биохимических и молекулярно-генетических прогностических маркеров эмбриогенеза человека получены новые данные, позволяющие существенно оптимизировать существующий пренатальный скрининг, расширить спектр выявляемых нарушений развития плода и прогнозировать раннюю летальность эмбриона по генотипам родителей. Разработан алгоритм прогноза рождения детей с низким весом по уровню гормонов (хорионический гонадотропин, кортизол, прогестерон, тестостерон, свободный эстриол) и уровню антиоксидантов в крови матери во втором триместре беременности. Доказана целесообразность определения носительства аллеля глутатионтрансферазы GSTP1 Ala114Val у обоих супругов с целью прогноза эмбриональной гибели плода. Предложен и внедрен способ оптимизации существующего биохимического пренатального скрининга в Ростовской области на основе расчета региональных медиан. Полученные в работе новые экспериментальные данные используются при чтении лекций в спецкурсах «Эмбриология человека», «Медико-генетическое консультирование», «Свободные радикалы в живых системах», «Предиктивная медицина».

Работа выполнена в рамках научной тематики НИИ биологии ЮФУ «Изучение механизмов окислительного стресса», и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2012» по теме «Разработка технологии мониторинга репродуктивной функции человека и развития плода с использованием новых геномных и постгеномных маркеров», государственный контракт № 02.740.11.0501, в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2020 гг)» проект № 2.2.3.3/2370, а также в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2012» по теме «Создание и апробация нового способа FIAV для быстрой идентификации аллельных вариантов генов» № 02.740.11.5015 и ФЦП МОН РФ ЦКП научным оборудованием «Высокие технологии» № 02552.11.7072.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на научных сессиях биолого-почвенного факультета ЮФУ (2005, 2008, 2009); на междисциплинарном симпозиуме «От экспериментальной биологии к превентивной и интегральной медицине» (Судак-2006); на II международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2008); на заседании Ростовского отделения об-

щества ВОГиС (2009); на VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 11 работ, в том числе одна из них в периодическом издании из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 59 отечественных и 101 зарубежных источника, приложения. Работа содержит 23 таблицы, иллюстрирована 25 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования сывороточных маркеров АФП, ХГЧ и св. эстриола послужили образцы крови 33792 беременных, обратившихся в клинично-диагностические лаборатории города Ростова-на-Дону и Ростовской области (КДЛ «Наука» и КДЛ Ростовской областной больницы) с целью проведения пренатального скрининга, в период с 2006-2009 гг. (табл. 1).

Таблица 1 – Количество обследованных беременных (n) на разных сроках гестации в зависимости от метода определения сывороточных маркеров

Срок гестации (недели, дни)	Иммуноферментный метод 1 группа (n)	Иммунофлуоресцентный метод 2 группа (n)
14-14,6	169	965
15-15,6	928	5923
16-16,6	2088	9344
17-17,6	1518	6843
18-18,6	822	3258
19-19,6	404	1074
20-20,6	153	303
Итого:	6082	27710

Для оценки эмбрионспецифических белков и гормонов и показателей окислительного статуса было обследовано 86 беременных на сроке 15-18 недель (57 женщин составили контрольную группу и 29 женщин родивших детей с низкой массой тела).

Методом иммуноферментного анализа определяли уровень альфа-фетопротеина, хорионического гормона человека, прогестерона, тестостерона, кортизола с использованием тест-систем «Алкор Био» (СПб), свободного эстриола, 17-ОН-прогестерона с использованием тест-систем «DRG» (Германия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ALISEI QS» (Италия). Уровень трофобластический бета-гликопротеин определяли с использованием тест систем «Вектор Бест» (Новосибирск), супероксиддисмутазу – «Bender-

MedSystems» (Австрия). Иммунофлуоресцентным методом определяли АФП, β -free-ХГЧ, свободного эстриола с использованием тест-систем «Delfia» (Финляндия) на многофункциональном анализаторе «Victor». Колориметрическим методом определяли МДА (Стальная И.Д., 1977), общую концентрацию перекисей с использованием тест-системы OxyStat «Biomedica» (Вена).

Материалом для исследования полиморфизма генов детоксикации и генов коагуляции служила ДНК, выделенная из тканей плода (хорион) и матери (эндометрий) стандартными методами. Было проанализировано 56 образцов полученных от женщин с неразвивающийся беременностью и самопроизвольным абортom. Полиморфизм генов определяли с использованием реагентов фирмы «Литех» методом ПЦР, детекцию продуктов амплификации проводили в агарозном геле методом горизонтального электрофореза. Анализ электрофореграмм проводили под УФ на трансиллюминаторе GelDoc «BioRad» (США).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программного пакета Excel 2007 и Statistica v.6.0. Сравнение различных данных проведено с использованием критерия Стьюдента и Пирсона (χ^2). Различия признаков считались достоверными при 95% уровне значимости ($p < 0,05$). Для определения взаимосвязи явлений применялся корреляционный анализ по Спирмену с вычислением коэффициента корреляции (r).

Результаты и обсуждения

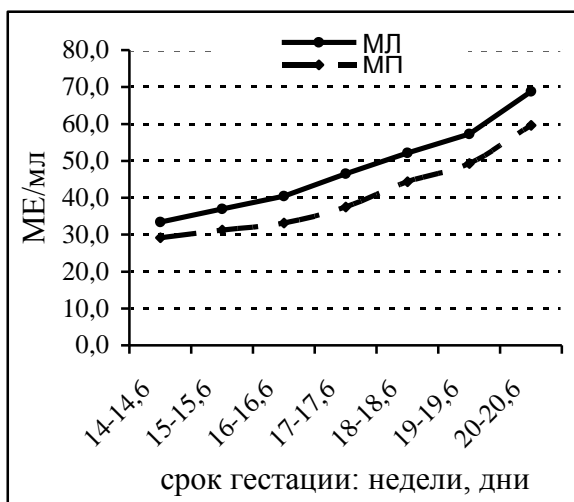
Исследование региональных медиан биохимических маркеров развития плода с целью оптимизации существующего пренатального скрининга

Пренатальная диагностики в России проводится для беременных женщин с целью профилактики наследственных и врожденных заболеваний у детей. По данным разных авторов, информативность «тройного теста», включающего определение альфа-фетопротеина (АФП), хорионического гонадотропина (ХГЧ) и св. эстриола в сыворотке крови беременной во втором триместре в выявлении синдрома Дауна у плода составляет 60-70% (Золотухина Т.В., 2006; Кащеева Т.К., 2007). Для совершенствования метода и повышения его чувствительности мы сравнили два основных метода исследования пренатального скрининга – иммуноферментный и иммунофлуоресцентный, рассчитали региональные понедельные медианы.

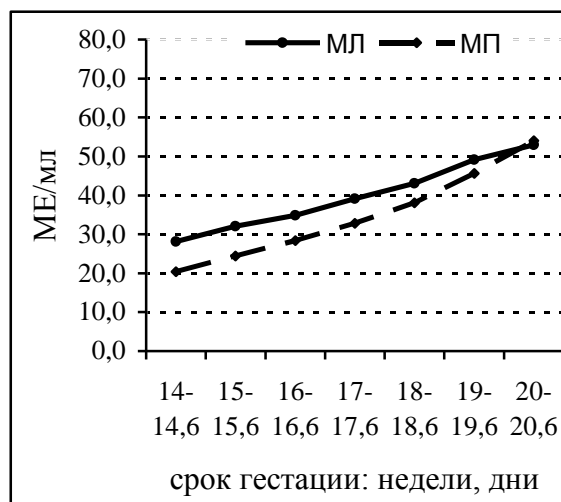
Как видно из данных представленных на рисунках 1-3 значения региональных медиан для АФП, ХГЧ и св. эстриола, независимо от метода исследования, отличались от медиан производителя на всех сроках гестации. При этом обращено внимание, что на 16 и 17 неделях беременности зарегистрированы максимальные различия. Так, значение медианы для АФП, полученное методом иммуноферментного анализа, для беременных на 16 неделе, выше на 22%, а на 17 – на 24%. Значения медиан содержания АФП, полученные с использованием иммунофлуоресцентного метода (рис. 1) также достоверно отличались от медианы производителя.

Понедельные региональные медианы ХГЧ у беременных Ростовской области, определяемые иммуноферментным анализом, ниже медиан производителей на 12-38%. Различия значений медиан β -free ХГЧ, выполненного с исполь-

зованием иммунофлуоресцентного метода (рис. 2), составили менее 10% и также смещены в сторону низких значений относительно медиан производителя. Исключение составили значения, полученные на 19-20-ой неделе, где наблюдалось повышение уровня региональной медианы до 38%.

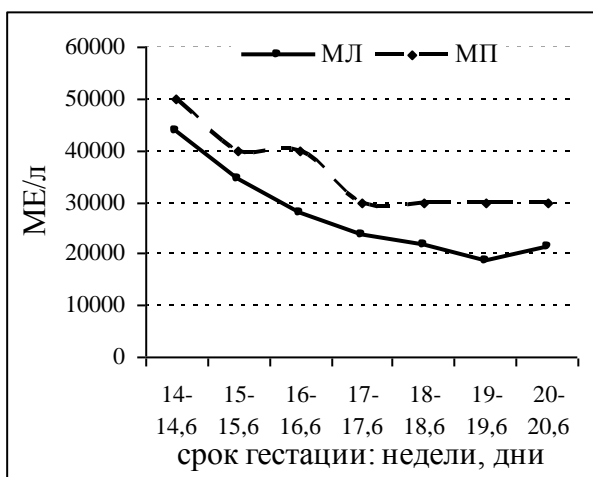


а

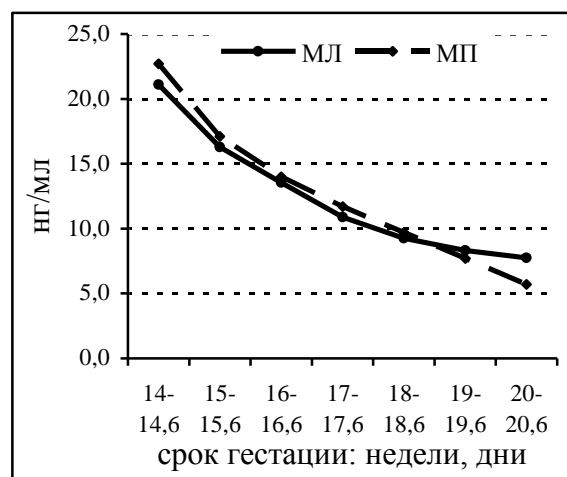


б

Рисунок 1 – Медианы уровня АФП в сыворотке беременных на разных сроках гестации: (а) иммуноферментный метод, б) иммунофлуоресцентный метод



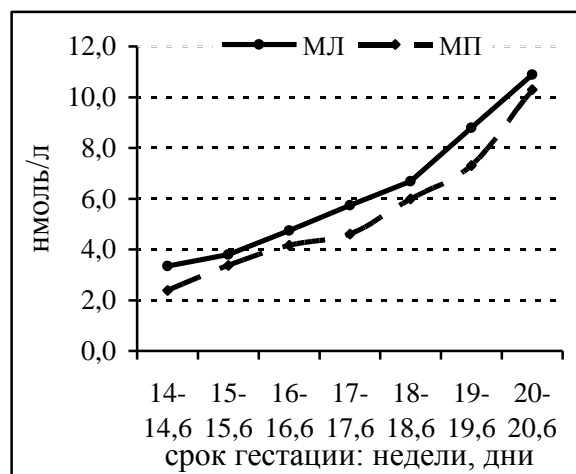
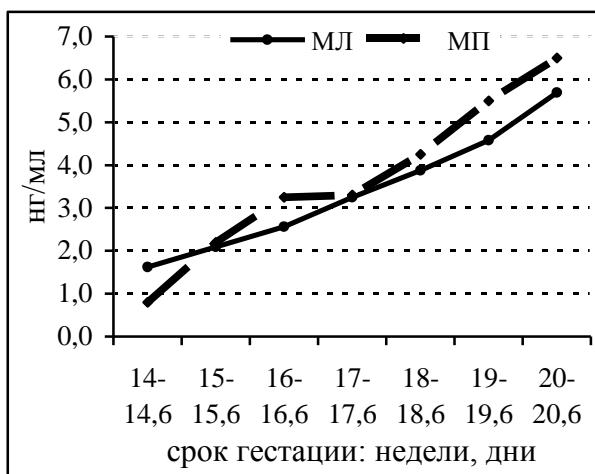
а



б

Рисунок 2 – Медианы уровня ХГЧ в сыворотке беременных на разных сроках гестации: (а) иммуноферментный метод, б) иммунофлуоресцентный метод

Определение понедельных региональных медиан св. эстриола у беременных Ростовской области, выявило различия значений на 15-20 неделях, которые были направлены в сторону снижения региональных медиан по сравнению с нормами, предлагаемыми производителями иммуноферментных тест-систем (рис. 3). Региональные медианы для св. эстриола для иммунофлуоресцентного метода, превышают значения медиан, представленных производителем на всех сроках гестации на 6-40%.



а

б

Рисунок 3 – Медианы уровня св. эстриола в сыворотке беременных на разных сроках гестации: (а) иммуноферментный метод, б) иммунофлуоресцентный метод

Проведенный анализ полученных результатов показал наиболее значимые различия региональных медиан сывороточных маркеров у беременных Ростовской области при сроке гестации 15-18 недель от представленных производителями тест-систем.

Исследование гормонов плода и плаценты как прогностических маркеров эмбриогенеза

Известно, что адаптационные механизмы, которые обеспечивают оптимальные условия для роста и развития плода, реализуются в условиях адекватной интеграции всех систем, участвующих в этом процессе. Одно из главенствующих мест в интегральной схеме занимает эндокринная система. В соответствии с изменяющимися потребностями плода в течение беременности происходят изменения гормонального гомеостаза (Савельева Г.М., 2000; Лысенков С.П. и др., 2002).

В таблице 2 представлены уровни содержания в сыворотке крови беременных женщин – гормонов и эмбрионспецифических белков: кортизола, прогестерона, тестостерона, свободного эстриола, дигидроэпиандростерона сульфат (ДГЭА-С), 17 гидроксипрогестерона (17-ОН-прогестерон), хорионического гонадотропина (ХГЧ), альфа-фетопротеина (АФП), трофобластического бета-гликопротеина (ТБГ) в случаях рождения детей с нормальной массой тела (группа 1) и с низкой массой тела (группа 2).

Во время беременности плацента, снабжаемая предшественниками гормонов, за счет работы системы мать-плацента-плод синтезирует в больших количествах стероидные гормоны, а также различные белковые и пептидные гормоны, и в свою очередь секретирует эти продукты в кровоток матери и плода. Кроме того, белковые и пептидные гормоны, продуцируемые плацентой, действуют посредством паракринного механизма, регулируя секрецию стероидных гормонов плаценты (Гриффин Дж., Охеды С., 2008). При анализе концентрации прогестерона в сыворотке крови контрольной группы и группы женщин, родивших детей с низкой массой тела были получены достоверные различия (рис. 4).

Уровень прогестерона в группе женщин, родивших детей с низкой массой тела был увеличен в среднем на 22%, по сравнению с контрольной группой. Так, среднее значения прогестерона в группе 4 составило 232,31 нмоль/л, максимальное значение составило 358,0 нмоль/л. В контрольной группе средняя концентрация гормона составила 190,41 нмоль/л. Синтезу прогестерона принадлежит одно из важных мест в эндокринной функции плаценты (Gellersen, Fernandes, Brosens, 2009; Nil et al., 2010; Feinshtein, 2010). Прогестерон синтезируется с ранних сроков беременности. В первые три месяца основная роль в продукции этого гормона принадлежит желтому телу беременности, а затем плаценте (Савельева, 2000; Гриффин Дж., Охеды С., 2008). Увеличение концентрации прогестерона в сыворотке крови женщин с низкой массой тела может быть связано с нарушением функционирования фето-плацентарного комплекса, а также с патологическими изменениями, происходящими в плаценте.

Таблица 2 – Содержание уровня гормонов и эмбрионспецифичных белков в сыворотке крови беременных женщин, в случаях рождения ими детей с нормальной (группа 3) и низкой массой тела (группа 4)

Наименование гормонов и эмбрионспецифичных белков	Единицы измерения	Содержание аналитов в группах беременных		p (t-критерий)
		Группа 3 (n= 57) M±m	Группа 4 (n=29) M±m	
ХГЧ	МЕ/л	27502±1947	40369±6885	0,025
АФП	МЕ/мл	51,27±3,94	54,15±3,86	0,643
Эстриол свободный	нг/мл	3,47±0,18	2,18±0,18	0,000
ТБГ	нг/мл	36602±2411	36999±3310	0,923
Прогестерон	нмоль/л	190,41±8,52	232,31±11,26	0,005
Тестостерон	нмоль/л	2,95±0,14	3,81±0,22	0,001
Кортизол	нмоль/л	570,21±20,24	677,21±42,71	0,011
ДГЭА-С	мкг/мл	1,45±0,09	1,56±0,18	0,54
17-ОН-прогестерон	нг/мл	3,32±0,18	3,27±0,13	0,84

Анализ содержания кортизола в сыворотке крови выявил достоверные отличия между контрольной группой и группой женщин, родивших детей с низкой массой тела. По результатам наших исследований в группе с нормально протекающей беременностью уровень гормона колебался в пределах от 210,74 нмоль/л до 969,73 нмоль/л во втором триместре беременности. Однако уровень кортизола в сыворотке крови женщин, родивших детей с низкой массой тела, достоверно выше по отношению к контрольной группе (группа 3). В группе женщин, родивших детей с низкой массой тела уровень кортизола в крови колебался от 407,54 нмоль/л и до 1383,2 нмоль/л. Как известно глюкокортикоиды оказывают как анаболические, так и катаболические эффекты, причем катаболические преобладают. Кортизол снижает утилизацию аминокислот для белкового синтеза везде, кроме печени, т.о. избыток кортизола связан с прогрессирующей потерей белка, атрофией и слабостью мышц, утончением кожи и потерей костного матрикса и массы (Гриффин Дж., Охеды С., 2008).

Несмотря на отсутствие достоверных отличий в уровнях ДГЭА-С и 17 ОН-прогестерона уровень тестостерона в сыворотке крови женщин, родивших де-

тей с низкой массой тела достоверно отличался от контроля и превышал его концентрацию в 1,3 раза. Среднее значение в группе 4 составило 3,81 нмоль/л, в группе 3 - 2,95 нмоль/л. Уровень тестостерона у беременных повышается при заболеваниях трофобласта (Кишкун А.А., 2007), что может быть и имело место в наших исследованиях.

Известно, что во время беременности скорость продукции эстрогенов в плаценте заметно возрастает. Эстриол – представитель эстрогенов – является главным стероидным гормоном, синтезируемым плацентой. По данным литературы показано, что снижение уровня свободного эстриола может приводить к задержке роста и развития плода (Кишкун А.А., 2007). Известно также, что эстрогены повышают кровоток в матке и могут играть роль в созревании и развитии фетальных органов (Гриффин Дж., Охеды С., 2008). В наших исследованиях уровень свободного эстриола в сыворотке крови женщин, родивших детей с низкой массой тела был достоверно снижен по отношению к уровню гормона в контрольной группе. Средняя концентрация свободного эстриола во второй группе составила 2,18 нг/мл, в первой группе 3,47 нг/мл.

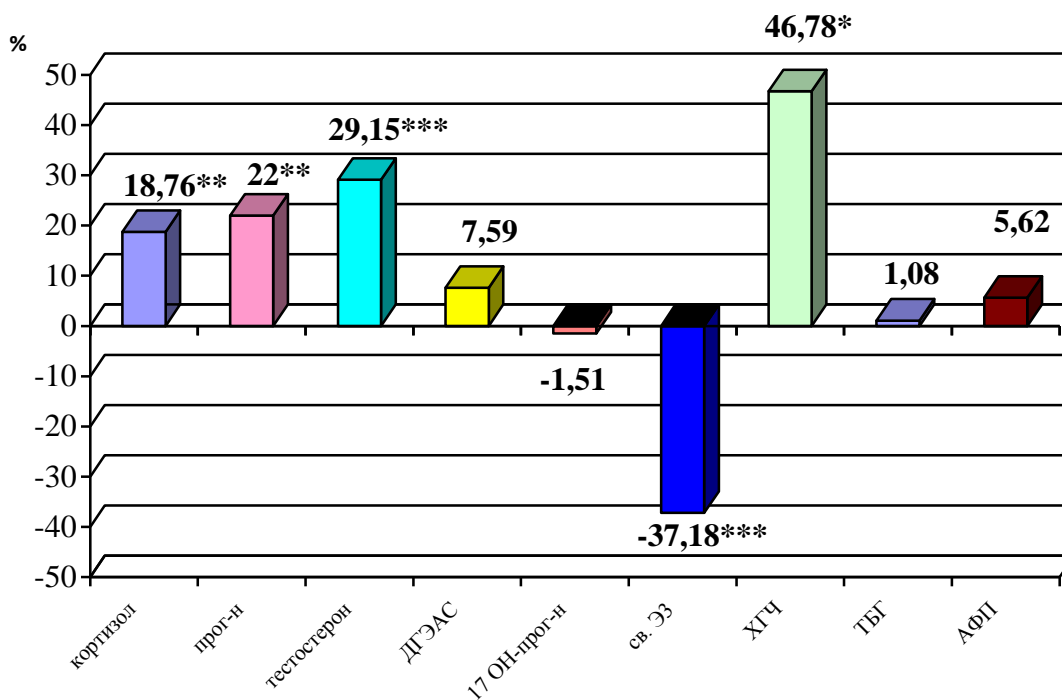


Рисунок 4 – Относительное содержание (%) уровня гормонов и эмбрионспецифических белков в сыворотке крови женщин, родивших детей с низкой массой тела по отношению к группе женщин с нормально протекающей беременностью
Примечание (здесь и далее по тексту): *** - достоверное отличие по сравнению с II триместром при $p < 0,001$; ** - достоверное отличие по сравнению с II триместром при $p < 0,01$; * - достоверное отличие по сравнению со II триместром при $p < 0,05$.

В наших исследованиях не было получено достоверных различий в уровне ТБГ в сыворотке крови женщин с нормально протекающей беременностью и женщин, родивших детей с низкой массой тела. Средняя концентрация ТБГ составила 36998 нг/мл в 4 группе и 36602 нг/мл – в третьей группе. Средняя концентрация АФП в сыворотке крови женщин, родивших детей с низкой массой

тела составила 54,14 МЕ/л, в группе женщин при нормально протекающей беременности – 51,27 МЕ/л.

Исследование уровня хорионического гонадотропина выявило достоверные отличия между двумя группами. В ходе изучения динамики уровня ХГЧ средняя концентрация гормона в сыворотке крови при нормально протекающей беременности составила 27501 МЕ/л. Средняя концентрация ХГЧ в сыворотке крови женщин, родивших детей с низкой массой тела, превышала уровень контроля почти в полтора раза и составила 40369 МЕ/л. Повышение уровня ХГЧ в сыворотке крови беременных свидетельствует о нарушении гемодинамики в функциональной системе мать – плацента – плод (Николаева Ю.А., 2007).

Таким образом, в результате наших исследований были получены достоверные изменения уровня стероидных гормонов - прогестерона, кортизола, св. эстриола, тестостерона, а также хорионического гонадотропина, что может указывать на влияние данных маркеров на рост и развитие плода.

Показатели окислительного статуса беременных, родивших детей с низкой массой тела

Результаты исследования показателей системы окислительного стресса при физиологическом течении беременности приведены в таблице 3. Как видно из данных таблицы при физиологически протекающей беременности интенсивность свободно-радикальных процессов во втором триместре достаточно высокая, что отражается в высоте быстрой вспышки хемилюминесценции. Однако активность антиоксидантной системы находится на высоком уровне, что обеспечивает контролируемый уровень интенсивности свободно-радикальных реакций и не допускает развития неконтролируемых реакций перекисного окисления липидов, приводящих к деструкции клеточных мембран. Это подтверждается низким уровнем внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ). В третьем триместре при физиологически протекающей беременности происходит статистически значимое снижение интенсивности свободно-радикальных реакций, что зафиксировано по снижению показателей хемилюминесценции. В то же время зафиксировано снижение уровня супероксиддисмутазы при одновременном повышении активности каталазы. В третьем триместре повышается и уровень мочевины. Однако, несмотря на это уровень ВЭГ в третьем триместре в 10 раз превышает этот показатель для второго триместра. Увеличение его концентрации говорит об увеличении деструкции и проницаемости мембран эритроцитов (Внуков В.В., 1989; Слюсарева И.В., 2007).

Увеличение уровня свободных радикалов в кровотоке матери в середине беременности регистрируется при любых вариантах течения беременности. При различных осложнениях и патологиях беременности повышение уровня свободных радикалов в крови матери – более значительное, чем при физиологическом течении беременности (Lash G.E. et al., 2008).

Нами были исследованы следующие показатели окислительного статуса матерей, родивших детей с низкой массой тела: общий уровень перекисей; уровень супероксиддисмутазы (СОД); уровень малонового диальдегида (МДА). У женщин, родивших детей с нормальной массой тела, уровень СОД в сыворотке

крови на 16-18 неделях беременности соответствует показателям для физиологически протекающей беременности. Суммарное содержание перекисей в 2 раза выше по сравнению с нормой для небеременных, что согласуется с данными о повышении интенсивности свободно-радикальных реакций во втором триместре нормально протекающей беременности. Уровень промежуточного продукта ПОЛ малонового диальдегида не превышает показатели для небеременных (табл. 3, табл. 4).

Таблица 3 – Показатели окислительного статуса при физиологическом течении беременности

Показатель	Физиологически протекающая беременность	
	II триместр	III триместр
Быстрая вспышка ХЛ, о.е. ¹	434,1±72,2	167,1±14,61***
Светосумма ХЛ, о.е. ¹	128,1±15,53	65,0±7,10***
Каталаза, у.е. ²	53,1±3,99	68,3±3,17**
СОД, нг/мл	91,4±7,59	66,4±5,65*
Мочевина, мг/100 мл	17,4±1,25	21,0±0,95*
Церулоплазмин, у.е. ²	13,6±1,19	15,3±0,53
ВЭГ, г/л	0,2±0,07	2,2±0,58***

Таблица 4 – Показатели окислительного статуса крови матерей (16-18 недели беременности), родивших детей с низкой (группа 3) и нормальной массой тела (группа 4)

Показатель окислительного статуса	Группа 3 X±m (n=57)	Группа 4 X±m (n=29)	p (t-критерий)
СОД (нг/мл)	89,35±9,19	54,8±3,87	0,007**
Суммарные перекиси (мкмоль/л)	1142±33,0	1235±48,0	0,10
МДА (нмоль/л)	6,1±0,14	6,63±0,18	0,02*

У женщин, родивших детей с низкой массой тела, в сыворотке крови во втором триместре беременности суммарное содержание перекисей не отличается от третьей группы (табл. 4) В то же время уровень МДА несколько выше по сравнению с группой контроля, а уровень СОД практически на 40% ниже. Таким образом, при изучении показателей окислительного статуса матери во втором триместре беременности выявлен дисбаланс в системе оксиданты – антиоксиданты у женщин, родивших детей с низкой массой тела.

Исследование частот полиморфных аллелей генов свертывающей системы крови ассоциированных с эмбриональными потерями

Одной из ведущих причин невынашивания беременности, особенно на ранних сроках, являются генетические факторы. В настоящее время установлено, что синдром потери плода обуславливается не только хромосомными аномалиями, но и генными мутациями, а также наличием полиморфных аллелей генов, активно функционирующих в период гестации.

Нами был проведен анализ частот полиморфных аллелей некоторых генов факторов свертывающей системы крови (β3-субъединицы тромбоцитарного рецептора фибриногена – ITGB3 Leu33Pro, α2-субъединицы тромбоцитарного рецептора фибриногена – ITGA2 C807T, ингибитора тканевого активатора плаз-

миногена тип 1 – PAI 1-675 5G/4G, фактора VII – F VII-323 ins10bp, фибриногена – FGB-455G-A) у женщин из двух групп: контрольной и группы женщин с синдромом потери плода. Носительство полиморфных аллелей генов фибринолитической системы может сопровождаться гиперкоагуляцией, тромбообразованием в ранних сосудах плаценты, приводить к нарушению жизнедеятельности имплантировавшегося плодного яйца.

Проведенный анализ частот полиморфных аллелей по каждому отдельному гену показал, что распределение частот аллелей у эмбрионов сходно с таковым у матерей. Количество полиморфных аллелей в группе женщин с синдромом потери плода выше по сравнению с контрольной, однако выявленные различия не являются статистически достоверными.

При сочетанном анализе носительства полиморфных аллелей установлено, что как среди матерей, так и среди эмбрионов в контрольной группе преобладают носители 1-3 полиморфных аллелей пяти исследуемых генов (рис. 5). При невынашивании беременности как среди женщин, так и среди эмбрионов снижается доля носителей одного полиморфного аллеля. Среди женщин 28,6% составляют носители 4 полиморфных аллелей. Среди погибших эмбрионов 21,4% были носителями 4 полиморфных аллелей генов свертывающей системы крови.

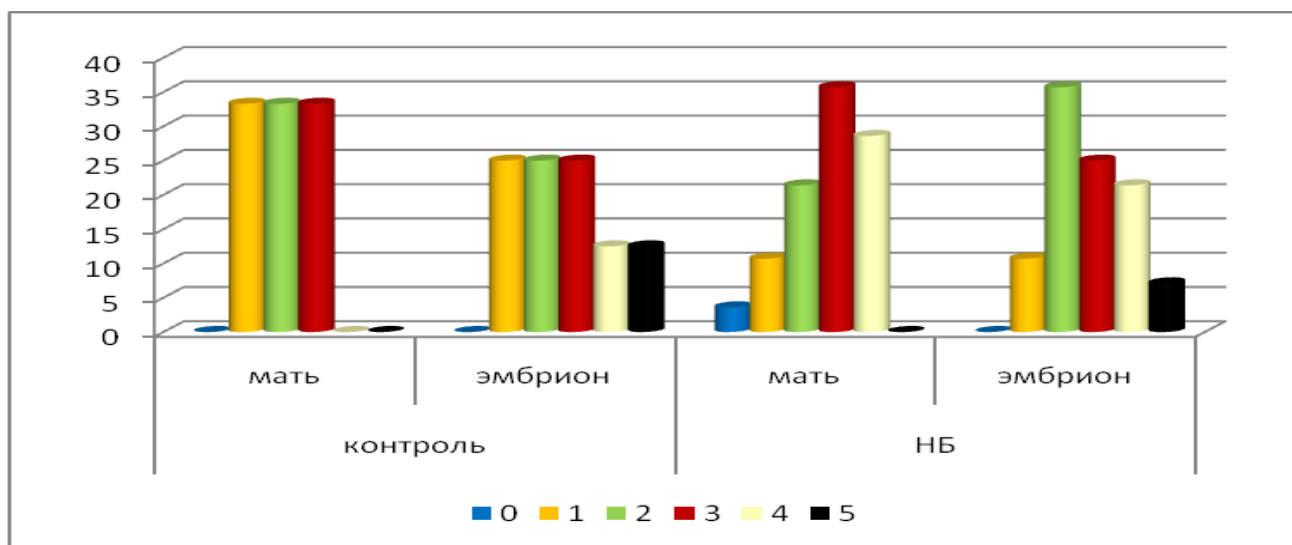


Рисунок 5 – Частота распределения (%) по количеству исследуемых полиморфных аллелей в генотипе женщин и эмбрионов

Можно предположить, что в данном случае происходит чрезмерное тромбообразование, нарушение имплантации и кровоснабжения формирующейся плаценты.

Исследование частот полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков ассоциированных с эмбриональными потерями

Нами были исследованы частоты полиморфных аллелей ряда генов первой фазы (цитохрома P-450 CYP1A1, цитохрома CYP2E1, алкогольдегидрогеназы ADH1B, альдегиддегидрогеназы ALDH2) и второй фазы системы детоксикации ксенобиотиков (ацетилтрансферазы 2 NAT2 и глутатион-S-трансферазы GSTP1) у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе и в контрольной группе.

Анализ сочетанного носительства полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков матери и эмбриона выявил, что достоверно чаще по сравнению с контролем при невынашивании беременности выявляется сочетание материнского и эмбрионального гетерозиготного носительства полиморфного аллеля A114V гена глутатион-S-трансферазы.

Полиморфные аллели исследуемых генов в гомозиготном состоянии не выявлены в обеих группах женщин. Большая часть женщин, как в контрольной группе, так и с невынашиванием беременности являются гомозиготами по нормальному аллелю генов первой фазы системы детоксикации ксенобиотиков.

Степень увеличения риска зависит от количества полиморфных аллелей в генотипе. В контрольной группе, как женщин, так и эмбрионов более чем в 83% случаев в генотипе присутствует не более двух полиморфных аллелей из 9 исследуемых мутаций. Среди женщин с невынашиванием беременности в единичных случаях выявлено по одному полиморфному аллелю генов N-ацетилтрансферазы 2 и глутатион-S-трансферазы. Значительно снижается по сравнению с контрольной группой доля лиц с двумя полиморфными аллелями; в то же время количество носительниц трех полиморфных аллелей увеличивается более чем в 2 раза; 17,9% приходится на женщин, имеющих сразу 4 однонуклеотидных полиморфизма в исследуемых генах. Среди погибших эмбрионов 86% являются носителями трёх и более полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков, тогда как среди эмбрионов, развивавшихся при физиологически протекающей беременности, доля носителей трёх и более полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков составляет 25% (табл. 5).

Таблица 5 – Частота распределения (%) по количеству исследуемых полиморфных аллелей генов первой и второй фазы биотрансформации ксенобиотиков в генотипе женщин и эмбрионов

Кол-во полиморфных аллелей	Мать		Эмбрион	
	контроль	НБ	контроль	НБ
0	0	0	0	0
1	0	0	12,5 ± 11,69	3,4 ± 3,36
2	33,6 ± 19,2	25,0 ± 5,68	62,5 ± 17,1	10,3 ± 5,64 **
3	33,4 ± 19,2	35,7 ± 9,0	12,5 ± 11,69	34,5 ± 8,8
4	33,0 ± 19,2	17,9 ± 7,2	12,5 ± 11,69	37,9 ± 9,0 *
5	0	14,3 ± 6,6	0	6,9 ± 4,71
6	0	7,1 ± 4,85	0	6,9 ± 4,71

Снижение активности ферментов второй фазы системы детоксикации ксенобиотиков нарушает метаболизм эндогенных и экзогенных химических соединений, способствует длительному сохранению в клетках промежуточных токсических веществ, в том числе и продуктов перекисного окисления липидов, что может провоцировать активацию свободно-радикальных реакций и развитие патологического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ранняя оценка отдаленных эмбриональных нарушений проводится с помощью биохимического скрининга беременных в первом и втором триместре, и включает выявление лишь узкого круга патологий, таких как синдром Дауна, синдром Эдвардса, дефекты зарощения нервной трубки (ДЗНТ), на долю которых приходится менее 1% от всех врожденных пороков развития, регистрируемых в популяции. При этом эффективность выявления данных патологий составляет около 70% (от общего числа детей с синдромом Дауна и ВПР), а ложноположительные результаты (когда риск рассчитан, как высокий- а ребенок рождается здоровым) встречаются в 5% случаев от общего числа обследованных (Золотухина Т.В., 2003; Кащеева Т.К., 2009). При введении, рассчитанных нами, региональных медиан для сывороточных белков крови женщин Ростовской области во втором триместре беременности, снизилось количество ложноположительных результатов по риску рождения ребенка с синдромом Эдвардса и ДЗНТ, при этом не было выявлено ложноотрицательных результатов для этих патологий. Можно сказать, что эффективность скрининга на синдром Эдвардса и ДЗНТ при переходе на региональные медианы повысилась, однако, что касается скрининга на синдром Дауна – это не так: с одной стороны повысилась чувствительность скрининга на синдром Дауна, с другой – увеличилось количество ложноположительных результатов, относящих беременных в группу риска по данной патологии плода. Все это лишний раз демонстрирует низкую специфичность маркеров, используемых в современной пренатальной диагностике, и необходимость поиска новых, более специфичных маркеров. Кроме того, пока идет поиск новых, возможно более высокотехнологичных, маркеров ВПР и ХА, необходимо анализировать вклад других факторов, приводящих к изменению уровней сывороточных маркеров, с целью исключить из группы риска по ВПР и ХА женщин, у которых данные факторы привели к изменению уровня сывороточных маркеров.

Нами впервые была показана высокая прогностическая ценность определения на ранних сроках гестации панели эмбрионспецифических белков и гормонов, а также показателей окислительного статуса в сыворотке беременных с целью оценки низкой массы плода при рождении. Сочетанное определение хорионического гонадотропина, прогестерона, кортизола, тестостерона и св. эстриола, а также супероксиддисмутазы и малонового альдегида позволяет прогнозировать рождение ребенка с низким весом уже во втором триместре беременности (таблица 6). Мы полагаем, что полученная динамика биохимических показателей у беременных женщин, родивших детей с низкой массой тела, обусловлена патологическими изменениями непосредственно в плаценте, в частности нарушением её гемодинамики. С 16 недели беременности начинается период интенсивного роста плода и плаценты, которые зависят от функционирования системы мать-плацента-плод (Данилов Р.К., Боровая Т.Г., 2003; Сидорова И.С., Макаров И.О., 2007). Таким образом, нарушение гемодинамики плаценты, обуславливающая недостаточность её трофической функции, ведёт к нарушению процессов роста и развития плода. В таблице 6 показаны профили динамики

прогностических маркеров в ранней оценке эмбриональных потерь и гипотрофии новорожденных.

Таблица 6 – Динамика прогностических маркеров в ранней оценке долгосрочных состояний эмбриона

Динамика прогностических маркеров, ассоциированных с состояниями эмбриона	Срок обследования	Состояние эмбриона
АФП (↑), ХГЧ (↔), св. Эз (↔)	15-18 недель беременности	ДЗНТ
АФП (↓), ХГЧ (↑), св. Эз (↓)	15-18 недель беременности	с. Дауна
АФП (↔), ХГЧ (↓), св. Эз (↓)	15-18 недель беременности	с. Эдвардса
ХГЧ (↑), прогестерон (↑), кортизол (↑), тестостерон (↑), св. Эз (↓), АФП (↔), ТБГ (↔), ДГЭА-С (↔), 17-ОН-прогестерон (↔)	15-18 недель беременности	Гипотрофия плода
СОД (↓), МДА (↑), суммарные перекиси(↔)	15-18 недель беременности	Гипотрофия плода
Наличие полиморфных аллелей в генах системы свертывания крови: ITGB3(-), ITGA2(-), F VII(-), PAI 1(-), FGB(-)	8-12 недель беременности	Гибель эмбриона
Наличие полиморфных аллелей в генах системы детоксикации ксенобиотиков первой фазы: CYP2E1(-), CYP1A1(-), ADH1B(-), ALDH2(-)	8-12 недель беременности	Гибель эмбриона
Наличие полиморфных аллелей в генах системы детоксикации ксенобиотиков второй фазы: NAT2(-), GSTP1(++)	8-12 недель беременности	Гибель эмбриона
Количество полиморфных аллелей в генах системы детоксикации ксенобиотиков: 3(+), 4(++), 5(+++), 6(+++)	8-12 недель беременности	Гибель эмбриона

Примечание: (-), (↔) – отсутствует ассоциация данного маркера с исследуемым состоянием эмбриона; (+), (++) , (+++) – данный маркер ассоциирован с исследуемым состоянием эмбриона; (↑), или (↓) – уровень данного маркера повышен, или понижен, при исследуемом состоянии эмбриона.

Большое значение в понимании механизмов, нарушающих нормальное течение беременности, имеет изучение не только материнского генотипа, но и генотипа эмбриона. Наши исследования показали, что носительство как матерью, так и эмбрионом отдельного полиморфного аллеля генов системы свертывания крови и генов системы детоксикации ксенобиотиков слабо ассоциировано с ранними эмбриональными потерями. Однако анализ сочетанного носительства полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков матери и эмбриона выявил, что достоверно чаще по сравнению с контролем при невынашивании беременности выявляется сочетание материнского и эмбрионального гетерозиготного носительства полиморфного аллеля A114V гена глутатион-S-трансферазы. Большая часть женщин с невынашиванием беременности является носителем 3-4 исследуемых полиморфных аллелей, что фенотипически может приводить к повышению степени агрегации тромбоцитов при одновременном снижении активности процессов фибринолиза. В нашем исследовании

выявлены статистически значимые отличия по количеству полиморфных аллелей генов второй фазы детоксикации ксенобиотиков для эмбриональных тканей. Таким образом, можно заключить, что риск развития мультифакторной патологии повышается не столько при наличии полиморфного варианта отдельного гена системы биотрансформации, сколько при сочетании нескольких полиморфных маркеров, относящихся как к первой, так и ко второй фазе детоксикации ксенобиотиков как в материнском генотипе, так и генотипе эмбриона. Таким образом, с целью профилактики ранних эмбриональных потерь, необходимо проводить как можно раньше (лучше до зачатия) анализ уровня полиморфизма генов системы детоксикации одновременно и у матери и отца будущего ребенка.

ВЫВОДЫ

1. Введение в Ростовской области региональных норм для АФП, ХГЧ и св. эстриола повышает на 8% чувствительность пренатального скрининга по сывороточным маркерам крови матери во втором триместре независимо от метода их определения (иммуноферментный или иммунофлуоресцентный).

2. Сочетанное определение хорионического гонадотропина, прогестерона, кортизола, тестостерона и св. эстриола позволяет прогнозировать рождение ребенка с низким весом.

3. У женщин, родивших детей с низкой массой тела на 38-40 неделях, в сыворотке крови во втором триместре беременности регистрируется активность супероксиддисмутазы на 38,6% ниже по сравнению с референсными значениями.

4. Частоты генотипов полиморфных аллелей генов системы гемостаза (ITGB3, ITGA2, F VII, FGB, PAI 1) среди женщин с эмбриональными потерями и женщин с физиологической протекающей беременностью практически одинаковы.

5. При невынашивании беременности выявляется сочетание материнского и эмбрионального гетерозиготного носительства полиморфного аллеля A114V гена глутатион-S-трансферазы P1.

6. Среди погибших эмбрионов 86% являются носителями трёх и более полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков, тогда как среди эмбрионов, развивавшихся при физиологически протекающей беременности, доля носителей трёх и более полиморфных аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков составляет 25%.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гутникова, Л.В. Региональные нормы сывороточных маркеров крови, используемых в пренатальной диагностике плода / Л.В. Гутникова// Труды аспирантов и соискателей Ростовского государственного университета: сб. науч. тр. – Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 2005. – Т. XI – С. 63-64.

2. Гутникова, Л.В. Маркеры окислительного стресса в мониторинге беременности/ Л.В. Гутникова// От экспериментальной биологии к превентивной и

интегральной медицине: мат-лы междунар. междисциплинарного симпозиума (г. Судак, 17-27 сентября 2006 г.). – Судак, 2006. – С. 23-24.

3. Гутникова, Л.В. Динамика содержания альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина в крови беременных женщин в зависимости от времени года / Л.В. Гутникова // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине: мат-лы I междунар. науч.-практ. конф. (г. Ростов-на-Дону, 10-12 октября 2007 г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во «ЦВВР», 2007. – С. 15-16.

4. Данько, Е.А. Пренатальный скрининг врожденных пороков развития плода / Е.А. Данько, Л.В. Гутникова, Е.В. Машкина, А.А. Александрова, Т.П. Шкурят // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: мат-лы II междунар. науч.-практ. конф. (г. Ростов-на-Дону, 8-10 октября 2008 г.). – Ростов-на-Дону, 2008. – С. 94-95.

5. Ломтева, С.В. Аллантаин и нормальная беременность / С.В. Ломтева, Л.В. Гутникова, В.Н. Прокофьев, Е.П. Гуськов // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 11-15 мая 2008 г.). – Новосибирск: Изд-во Арта, 2008. – С. 402. – ISBN 5-9027-0011-6.

6. Гутникова, Л.В. Анализ результатов пренатального биохимического скрининга у беременных женщин Ростовской области / Л.В. Гутникова // Главный врач юга России. – 2009. – № 2 – С. 25-26.

7. Гутникова, Л.В. Исследование эффективности пренатального скрининга в первом триместре беременности / Л.В. Гутникова, А.А. Александрова, С.В. Ломтева, Е.А. Данько, Е.В. Машкина, Т.П. Шкурят // Валеология. – 2009. – № 3. – С. 28-34.

8. Гутникова, Л. В. Динамика отклонений биохимических маркеров в первом триместре беременности у жительниц Ростовской области в зависимости возраста / Л.В. Гутникова // Ранние сроки беременности. Профилактика репродуктивных потерь: мат-лы науч.-практ. конф. (г. Ростов-на-Дону, 20 ноября 2009 г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во ГОУ ВПО РостГМУ, 2009. – С. 28-29.

9. Александрова, А.А., Исследование референсных региональных норм биохимических маркеров пренатального скрининга второго триместра у жительниц г. Ростова-на-Дону / А.А. Александрова, Л.В. Гутникова, С.С. Амелина // Медицинская генетика: мат-лы VI съезда Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 16-17 мая 2010 г.). – М.: Изд-во Гениус Медиа, 2010. – С. 6.

10. Гутникова, Л.В. Полиморфизм генов интегринов и невынашивание беременности / Л.В. Гутникова, К.А. Коваленко, И.О. Покудина, И.О. Буштырева, Е.В. Машкина // Медицинская генетика: мат-лы VI съезда Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 16-17 мая 2010 г.). – М.: Изд-во Гениус Медиа, 2010. – С. 50.

11. Коваленко, К.А. Гены системы детоксикации и невынашивание беременности / К.А. Коваленко, Л.В. Гутникова, А.А. Родионов, А.А. Александрова, Т.П. Шкурят // Медицинская генетика: мат-лы VI съезда Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 16-17 мая 2010 г.). – М.: Изд-во Гениус Медиа, 2010. – С. 86.