

Прогнозирование гипертензивных расстройств у беременных

Т. А. Лоскутова¹, К. В. Воронин¹, В. Н. Турчин²

¹ Днепропетровская медицинская академия

² Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара

Цель исследования: разработка и оценка эффективности способа прогнозирования развития гипертензивных расстройств у беременных по результатам тестирования генов тромбофилии, измерения уровней антител к β_2 -гликопротеину 1 (β_2 -ГП-1) и D-димера, определения коэффициента атерогенности (КА).

Дизайн: проспективное исследование «случай — контроль».

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 175 женщин в III триместре беременности, среди которых были 131 пациентка с преэклампсией (ПЭ) различной степени тяжести и 44 пациентки с физиологическим течением беременности. Прогностическая модель ПЭ построена на результатах определения генных полиморфизмов (675 4G/5G в гене ингибитора активатора плазминогена 1-го типа, 455 G→A в гене фибриногена β методом ПЦР), на данных о количестве антител к β_2 -ГП-1 (ИФА), концентрации D-димера (иммунотурбидиметрический анализ), значении КА.

Результаты. Чувствительность предложенной прогностической модели составила 96,8% (95%-ный ДИ — 89,7–98,8%), специфичность — 67,8% (95%-ный ДИ — 54,4–79,4%). Модель учитывает роль не только каждого прогностического фактора, но и их взаимодействия между собой. Апробация прогностической модели на группе женщин в I триместре беременности показала ее высокую эффективность: частота ПЭ в группе с прогнозируемым низким риском ее развития составила 2,5% против 57,1% в группе с прогнозируемым высоким риском ($p < 0,05$).

Заключение. Предложенная модель прогнозирования ПЭ позволяет с большой точностью оценить вероятность развития гипертензивных нарушений у беременных.

Ключевые слова: беременность, преэклампсия, полиморфизм генов, антифосфолипидные антитела, прогнозирование.

Predicting Hypertensive Conditions in Pregnant Women

T. A. Loskutova¹, K. V. Voronin¹, V. N. Turchin²

¹ Dnipropetrovsk Medical Academy

² Oles Honchar Dnipropetrovsk National University

Study Objectives: 1) To develop a method of predicting hypertensive disorders in pregnant women based on investigating thrombophilia genes, measuring anti- β_2 -glycoprotein I antibodies (β_2 GPI) and D-dimer levels, and determining the atherogenic index; and 2) to assess the efficacy of this method.

Study Design: This was a prospective case-control study.

Materials and Methods: The study included 175 women in their third trimester of pregnancy, 131 of whom had pre-eclampsia (PE) of varying severity, and 44 of whom had unaffected pregnancies. A prognostic model of PE was created, based on the investigation of gene polymorphisms (675 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1] gene and 455 G→A in the fibrinogen β gene by PCR), levels of anti- β_2 GPI antibodies (ELISA), D-dimer levels (immunoturbidimetric assay), and the atherogenic index value.

Results: The sensitivity of this prognostic model was 96.8% (95% CI, 89.7–98.8%) and its specificity was 67.8% (95% CI, 54.4–79.4%). This model accounts not only for each prognostic factor separately, but also for their interaction. Testing this prognostic model in a group of women in their first trimester showed its high effectiveness: The rate of PE in the group with a low predicted risk was 2.5% vs. 57.1% in the group with a high predicted risk ($p < 0.05$).

Conclusion: The authors proposed a prognostic model of PE that provides a highly accurate assessment of the risk for hypertensive disorders in pregnant women.

Keywords: pregnancy, pre-eclampsia, gene polymorphisms, antiphospholipid antibodies, prediction.

Гипертензивные расстройства при беременности остаются актуальной проблемой акушерства: их частота составляет 3–21% и не имеет тенденции к снижению. Существует ряд факторов, которые значительно увеличивают риск развития преэклампсии (ПЭ): плацентарная ишемия, иммунная дезадаптация, повышенное содержание в крови ЛПНП, оксидативный стресс [3, 7, 10]. В последнее время установлена роль антифосфолипидного синдрома и генетических форм тромбофилии (мутации в генах фактора V Leiden, протромбина 20210 G→A, метилентетрагидрофоллатредуктазы 677 C→T; полиморфизмы 455 G→A в гене фибриногена β (FGB) и 675 4G/5G в гене ингибитора активатора плазминогена 1-го типа — PAI-1) в патогенезе многих акушерских осложнений, в том числе ПЭ [1, 2, 4, 7, 8, 10, 11]. Перечисленные факторы действуют совместно и обычно производят потенцирующий эффект.

Для практикующего врача важно понять, относится ли беременная с определенным набором факторов к груп-

пе риска и какую тактику при ее наблюдении следует применить. Чтобы ответить на эти вопросы, необходимо знать, какова вероятность развития гипертензивных расстройств (в частности, ПЭ) у беременных в зависимости от различных комбинаций факторов риска.

Цель исследования: разработка и оценка эффективности способа прогнозирования развития гипертензивных расстройств у беременных по результатам тестирования генов тромбофилии, измерения уровней антител к β_2 -гликопротеину 1 (β_2 -ГП-1) и D-димера, определения коэффициента атерогенности (КА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для реализации поставленной цели было обследовано 175 женщин в III триместре беременности. Исследование проводилось в 2010–2013 гг. на базе кафедры акушерства и гинекологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины» и родильного дома КУ «Областная клиниче-

ская больница им. И. И. Мечникова» г. Днепропетровска. Из числа обследованных 44 женщины с физиологическим течением беременности составили контрольную группу. В группу 1А вошли 62 беременных с гестационной АГ, или ПЭ легкой степени, в группу 1В — 69 беременных с ПЭ средней или тяжелой степени (степени тяжести ПЭ выделяли согласно клиническому протоколу МОЗ Украины № 676 [5]). У всех участниц был произведен однократный забор крови (в III триместре беременности) с целью определения генных полиморфизмов, состояния системы гемостаза, обмена липидов, уровня антител к β_2 -ГП-1. Средний срок беременности на момент обследования в группе 1А составил $35,5 \pm 0,3$ недели, в группе 1В — $32,0 \pm 0,4$ недели, в группе контроля — $36,7 \pm 0,2$ недели.

Концентрации общего холестерина (ОХС), холестерина ЛПВП (ХС ЛПВП), холестерина ЛПНП (ХС ЛПНП), триглицеридов в плазме крови измеряли на автоматическом анализаторе Biochemistry Analyzer 88 с использованием реактивов «Био-Ла-Тест» (Pliva-Lachema, Чешская Республика). КА рассчитывали по формуле:

$$KA = (OXC - XCLPVP) / XCLPVP.$$

Уровень D-димера в плазме крови определяли на основании иммунотурбодиметрического анализа с помощью латекс-теста Tina-quant a D-Dimer (Roche Diagnostics, США) на системе Roche/Hitachi Cobas с 6000.

Исследование генетической полиморфизмов проводили путем аллельспецифической ПЦР с последующей детекцией методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле. Для определения полиморфизмов в геноме человека (675 4G/5G в гене PAI-1, 455 G→A в гене FGB, 20210 G→A в гене протромбина) использовали комплект реагентов SNP-экспресс производства НПФ «Литех» (Россия).

Суммарные антитела классов IgM и IgG к β_2 -ГП-1 в сыворотке крови измеряли методом непрямого твердофазного ИФА (ELISA) с помощью реагентов производства Orgentec Diagnostika GmbH (Германия).

Статистическую обработку результатов производили на персональном компьютере. Для вычислений использовали программу GraphPad Prism 5 for Windows, методы аналитической и вариационной статистики. Выдвинутые гипотезы проверяли, применяя статистические критерии: непарный t-тест, критерий χ^2 , точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [6].

Прогностические маркеры развития преэклампсии

В качестве факторов риска появления ПЭ предложено рассматривать концентрацию D-димера, полиморфизмы в геноме человека (675 4G/5G в гене PAI-1, 455 G→A в гене FGB, 20210 G→A в гене протромбина), а также уровень антител к β_2 -ГП-1 и КА. Этот выбор основан на нижеперечисленных фактах.

D-димер. По данным исследования, уровень D-димера в группе 1А ($1,13 \pm 0,09$ мкг/мл) превышал в 2,35 раза ($p < 0,001$), а в группе 1В ($1,52 \pm 0,18$ мкг/мл) — в 3,17 раза ($p < 0,0001$) показатель контрольной группы ($0,48 \pm 0,03$ мкг/мл).

Полиморфизм в гене FGB 455 G→A. Количество нормальных гомозигот гена FGB 455 GG в группе 1В (28,99%) снижено в 2,59 раза в сравнении с контрольной группой (75,0%, $p < 0,05$). Количество гетерозигот в группе 1А (35,58%) в 1,74 раза, а в группе 1В (57,87) в 2,83 раза больше, чем в контрольной (20,45%, $p < 0,05$).

Полиморфизм в гене PAI-1 675 4G/5G. Количество нормальных гомозигот 675 5G/5G гена PAI-1 в группе 1А (17,74%) в 3,07 раза, а в группе 1В (24,64%) в 2,21 раза меньше, чем в контрольной (54,45%, $p < 0,05$). Количество гетерозигот 675 4G/5G гена PAI-1 в 1А группе (59,50%) в 1,54 раза, а патологических гомозигот 675 4G/4G гена PAI-1 в 1В группе (24,64%) в 3,61 раза больше, чем в группе контроля (38,64% и 6,82% соответственно, $p < 0,05$).

Уровень антител к β_2 -ГП-1. Статистически значимо более высокий, чем в контрольной группе, суммарный уровень антител классов IgM и IgG к β_2 -ГП-1 зафиксирован у беременных 1В группы: $6,52 \pm 0,46$ Ед/мл против $4,02 \pm 0,24$ Ед/мл ($p < 0,05$).

Коэффициент атерогенности. В обеих группах пациенток с ПЭ значение КА было статистически значимо выше, чем в контроле ($3,16 \pm 0,15$, $p < 0,05$): в группе А1 ($3,70 \pm 0,12$) — в 1,17 раза, в группе В1 ($3,98 \pm 0,16$) — в 1,26 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутация в гене протромбина

Данные исследования позволили выявить женщин с мутацией в гене протромбина 20210 G→A. Все они оказались в группах 1А или 1В. Значит, наличие гомо- или гетерозиготной мутации в гене протромбина 20210 G→A является маркером, позволяющим говорить об опасности развития ПЭ. Всего беременных с протромбиновой мутацией было 19 человек, из них ПЭ легкой степени имели 3 (16%), средней или тяжелой степени — 16 (84%). У всех 16 беременных 1В группы обнаружена гетерозиготная форма данной мутации. Таким образом, обнаружение мутации в гене протромбина является маркером развития ПЭ, а гетерозиготная ее форма — критерием дифференциации легкой и средней/тяжелой ПЭ.

Прогноз развития гипертензивных нарушений у беременных

Поскольку беременные с мутацией в гене протромбина заведомо попадают в группы с гипертензивными расстройствами, они были исключены из исследования. Оставшихся женщин (из групп А1 и В1) объединили в группу 1 ($n = 112$).

Далее используем обозначения: x_D — концентрация D-димера; x_{KA} — значение КА; $x_{At\beta 2}$ — количество антител к β_2 -ГП-1; x_{PAI} — значение PAI-1; x_{FGB} — значение FGB. Значение x_{PAI} равно 1, если ген нормальный; равно 2, если ген гетерозиготный; равно 3, если ген — аномальная гомозигота. Аналогично x_{FGB} принимает значения 1, 2 или 3.

Каждой беременной приписываем вектор факторов: $x = (x_D, x_{KA}, x_{At\beta 2}, x_{PAI}, x_{FGB})$ — результаты ее лабораторного обследования. Будем исходить из того, что вероятность развития гипертензивных нарушений у беременных является функцией

$$P(y) = P(x_D, x_{KA}, x_{At\beta 2}, x_{PAI}, x_{FGB}) = 1 / (1 + \exp\{-y\}) \quad (1)$$

от линейной комбинации факторов:

$$y = a + b_D x_D + b_{KA} x_{KA} + b_{At\beta 2} x_{At\beta 2} + b_{PAI} x_{PAI} + b_{FGB} x_{FGB}, \quad (2)$$

где a, b — коэффициенты регрессии.

Функцию (2) будем называть функцией риска, ее значение, выраженное по значениям факторов $x_D, x_{KA}, x_{At\beta 2}, x_{PAI}, x_{FGB}$, определяет вероятность развития гипертензивных нарушений. Коэффициенты $b_D, b_{KA}, b_{At\beta 2}, b_{PAI}, b_{FGB}$ оценены по выборке так, чтобы зависимость $P(y) = P(x_D, x_{KA}, x_{At\beta 2}, x_{PAI}, x_{FGB})$ развития гипертензивных нарушений от линейной комбинации факто-

ров (2) была наилучшей. Соответствующие оценки получены по методу максимального правдоподобия, в результате функция риска приняла следующий вид:

$$y = -11,74 + 6,25x_D + 0,80x_{KA} + 0,49x_{At62} + 1,08x_{PAI} + 1,25x_{FGB}. \quad (3)$$

Вероятность развития гипертензивных нарушений у беременной с вектором факторов $x = (x_D, x_{KA}, x_{At62}, x_{PAI}, x_{FGB})$ равна:

$$P(y) = P(x_D, x_{KA}, x_{At62}, x_{PAI}, x_{FGB}) = 1 / (1 + \exp\{-y\}) = 1 / (1 + \exp\{-(-11,74 + 6,25x_D + 0,80x_{KA} + 0,49x_{At62} + 1,08x_{PAI} + 1,25x_{FGB})\}). \quad (4)$$

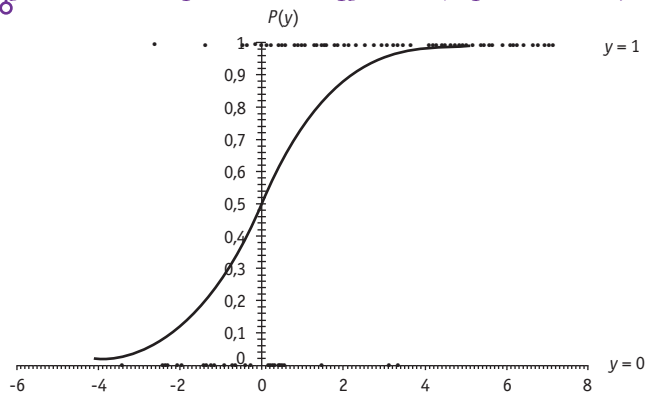
График функции $P(y) = 1 / (1 + \exp\{-y\})$ изображен на рисунке. По оси абсцисс отложены значения функции риска (y), по оси ординат — значения вероятностей развития гипертензивных расстройств $P(y)$. По зависимости (4) вероятности развития гипертензивных расстройств $P(y)$ от значения функции риска (y) можно оценить различные частотные характеристики, связанные с опасностью развития ПЭ. В частности, можно определить значение функции риска (y), превышение которого у беременной с вероятностью, большей значения P , относит ее в группу высокого риска развития гипертензивных расстройств. Например, для P , равных 0,75; 0,80; 0,90; 0,95, имеем соответственно $P(1,099) = 0,75$; $P(1,386) = 0,80$; $P(2,197) = 0,90$; $P(2,944) = 0,95$. Если у беременной значение функции риска оказалось равным 1,099 или больше, то с вероятностью, не меньшей 0,75, она окажется в группе высокого риска развития гипертензивных расстройств (в среднем из 100 беременных со значением функции риска, превышающим 1,099, не менее чем у 75 будут гипертензивные расстройства).

Пример определения вероятности развития гипертензивного нарушения

Беременная М., результаты обследования: концентрация D-димера — 1,1 мкг/мл, суммарные антитела к β_2 -ГП-1 — 3,7 Ед/мл. Результаты генетического тестирования: полиморфизм в гене PAI-1 675 4G/5G — гетерозигота (2); полиморфизм в гене FGB 455 G→A — нормальная гомозигота (1); KA — 3,3. Вектор факторов $x = (x_D, x_{KA}, x_{At62}, x_{PAI}, x_{FGB}) = (1,1; 3,3; 3,7; 2; 1)$. Значение функции риска:

Рис. График зависимости вероятности развития гипертензивных расстройств при беременности $P(y)$ от значения функции риска (y).

Примечание. • — значения функции риска: на оси абсцисс ($y = 0$) — для беременных из группы контроля (с физиологическим течением беременности); при $y = 1$ — для беременных из группы 1 (с преэклампсией)



$$y = -11,74 + 6,25 \times 1,1 + 0,80 \times 3,3 + 0,49 \times 3,7 + 1,08 \times 2 + 1,25 \times 1 = 2,998.$$

Вероятность $P(y)$ развития гипертензивного нарушения у беременной М. составляет:

$$P(y) = 1 / (1 + \exp\{-2,998\}) = 0,952.$$

О соответствии прогнозируемого и фактического развития гипертензивных расстройств при беременности

Выясним, насколько хорошо согласуется с реальностью предложенная модель зависимости вероятности развития гипертензивных расстройств от факторов $x_D, x_{KA}, x_{At62}, x_{PAI}, x_{FGB}$ (4). Для этого упорядочим значения функции риска всех беременных (из контрольной группы и группы 1) от меньших к большим и разобьем полученные значения на восемь близких по численности частей — восьми-квантилей (табл. 1). В восьми-квантиль № 1 вошли женщины, значения функции риска у которых минимальны, № 2 — со следующими по величине значениями функции риска и т. д.

Таблица 1

Фактическое и прогнозируемое количество гипертензивных нарушений среди исследуемых женщин

Порядковый номер восьми-квантиля	Диапазон изменения значений функции риска у	Диапазон изменения вероятности $P(y)$	Число беременных				Всего
			с гипертензивными нарушениями		без гипертензивных нарушений		
			фактическое	прогнозируемое	фактическое	прогнозируемое	
1	-3,410; -1,418	0; 0,195	1	2	20	18	21
2	-1,417; 0,068	0,196; 0,517	8	6	10	11	18
3	0,069; 0,765	0,518; 0,683	10	12	10	8	20
4	0,766; 2,455	0,684; 0,921	18	16	2	4	20
5	2,456; 4,860	0,922; 0,922	18	19	2	1	20
6	4,861; 6,325	0,923; 0,998	19	19	0	1	19
7	6,326; 9,511	0,9981; 0,999	20	20	0	0	20
8	9,512; 27,873	0,9991; 1,00	18	18	0	0	18

Частота возникновения преэклампсии в группах прогнозирования, n (%)

Группы	Нет пре-эклампсии	Преэклампсия	
		легкой степени	средней степени
Высокий риск (n = 21)	9 (42,9)*	5 (23,8)*	7 (33,3)*
		Всего 12 (57,1)*	
Низкий риск (n = 81)	79 (97,5)	2 (2,5)	0 (0,0)
		Всего 2 (2,5)	

* Различие показателей между группами высокого и низкого риска статистически значимо ($p < 0,05$).

Наконец, восьми-квантиль № 8 составили участницы с максимальными значениями данной функции. Для восьми-квантилей подсчитали фактическое и прогнозируемое число беременных с гипертензивными расстройствами, а также фактическое и прогнозируемое число женщин с нормальным течением беременности (см. табл. 1).

Значение статистики Hosmer — Lemeshow [9], которое характеризует степень уклонения между прогнозируемым числом и наблюдаемым, составляет 7,99 при критическом значении статистики, равном 12,59 ($p < 0,05$), что указывает на высокую степень соответствия модели фактическим данным.

Анализ полученных нами результатов свидетельствует о том, что при $P(0,765) = 0,683$ число беременных с фактическим и прогнозируемым количеством гипертензивных расстройств резко повышается, а число здоровых резко падает. Поэтому $P(0,765) = 0,683$ принято как критическое значение, при превышении которого беременную следует относить к группе с высокой вероятностью развития гипертензивных расстройств. Чувствительность предложенной модели составляет 96,8% (95%-ный ДИ — 89,7–98,8%), специфичность — 67,8% (95%-ный ДИ — 54,4–79,4%).

Для оценки эффективности этого способа прогнозирования развития ПЭ он был апробирован на группе из 108 женщин, протестированных в I триместре беременности. Из них 84 женщины составили группу с прогнозируемым низким риском ($P(y) < 0,683$), 24 — с прогнозируемым высоким риском ($P(y) \geq 0,683$) развития ПЭ. У 3 (12,5%) пациенток из группы высокого риска и 3 (3,6%) из группы низкого риска беременность прервалась в срок 10–14 недель, и они были исключены из исследования. У оставшихся оценены исходы беременности и родов, рассчитано абсолютное снижение (увеличение) риска с 95%-ным ДИ. В группе прогнозируемого высокого риска беременность чаще осложнялась развитием ПЭ (табл. 2). У беременных из группы прогнозируемого высокого риска абсолютное увеличение риска развития ПЭ составило 54,6% (95%-ный ДИ — 50,3–59,1%), в том числе ПЭ легкой степени — 21,3% (95%-ный ДИ — 16,8–25,9%), ПЭ средней степени — 33,3% (95%-ный ДИ — 28,7–37,9%).

Таким образом, предложенная нами модель позволяет оценить роль как полиморфных вариантов генов тромбофилии, так и степени гиперкоагуляции, наличия кофактора к антифосфолипидным антителам, дисбаланса обмена липи-

дов и повышенного количества атерогенных фракций в развитии ПЭ. Более того, в предложенной модели учитывается роль не только каждого фактора, но и их взаимодействия между собой. Способ дает возможность оценить вероятность развития гипертензивных расстройств у беременной. Кроме того, он обладает высокой информативностью и позволяет прогнозировать появление не только ПЭ, но и встречающихся при ней осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Мутация в гене протромбина является маркером развития гипертензивных расстройств у беременных. При ее наличии пациентку следует включить в группу риска развития преэклампсии (ПЭ) тяжелой или средней степени.
2. Предложена модель зависимости вероятности развития гипертензивных расстройств у беременных от уровня D-димера, значения коэффициента атерогенности, количества антител к β_2 -гликопротеину 1, наличия полиморфизма 455 G→A в гене фибриногена β и 4G/5G в гене ингибитора активатора плазминогена 1-го типа. В модели учитывается роль в развитии ПЭ не только каждого отдельного фактора, но и их совокупности.
3. Предложенная модель обладает хорошими прогностическими свойствами, что позволяет с большой точностью оценить вероятность риска развития гипертензивных нарушений у беременных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В. С., Иващенко Т. Э., Готов А. С. Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности: методические рекомендации / Под ред. В. С. Баранова, Э. К. Айламазяна. СПб.: Н-Л, 2009. 68 с.
2. Бицадзе В. О. Патогенез, принципы диагностики и профилактики осложнений беременности, обусловленных тромбофилией: Дис. ... докт. мед. наук. М., 2004. 251 с.
3. Ванько Л. В., Сафронова В. Г., Матвеева Н. К., Сухих Г. Т. Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений / Под ред. Т. А. Николаевой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 264 с.
4. Макацария А. Д. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике / Под ред. А. Д. Макацарии, В. О. Бицадзе. М.: Триада-Х, 2003. 904 с.
5. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги: Наказ від 31.12.2004. № 676 / Міністерство охорони здоров'я України. К., 2004.

6. Турчин В. Н. Теория вероятности и математическая статистика. Днепропетровск: изд-во ДНУ, 2008. 656 с.
7. Brenner B., Grabowski E. F., Hellgren M., Kenet G. [et al.] Thrombophilia and pregnancy complications // *Thromb. Haemost.* 2004. Vol. 92. N 4. P. 678–681.
8. Camilleri R. C., Peebles D., Portmann C., Everington T. et al. -455G/A beta-fibrinogen gene polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T, and placental vascular complications // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2004. Vol. 15. N 2. P. 139–147.
9. Hosmer D. W., Lemeshow S. *Applied logistic regression.* N. Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2000. 392 p.
10. Smith R. A., Baker P. N. Risk factors, prevention and treatment of hypertension in pregnancy // *Minerva Ginecol.* 2005. Vol. 57. N 4. P. 379–388.
11. Yamada N., Arinami T., Yamakawa-Kobayashi K., Watanabe H. et al. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia // *J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 45. N 3. P. 138–141. 