

бить можливим їх комбіноване застосування. Це може стати підґрунтям для подальшого наукового дослідження у даному напрямку.

Висновки

1. Добрі результати отримано в 86,8 % пацієнтів, яким виконано вакуумне лігування гемороїдальних вузлів латексними кільцями, і у 87,8 % осіб, які перенесли прошивання дистальних гілок верхньої прямокишкової артерії під доплерометричним контролем.

2. Аналіз віддалених результатів застосування малоінвазивних методів лікування пацієнтів із хронічним гемороем вказує на високу ефек-

тивність їх застосування в ранніх стадіях захворювання та можливість їх комбінованого використання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Васильев С. В. Сравнительная оценка операции Лонго и шовного лигирования верхней прямокишечной артерии в лечении хронического геморроя / С. В. Васильев и др. // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2007. – Т. 166, № 3. – С. 70–72.

2. Шелыгин Ю. А. Результаты лигирования дистальных ветвей верхней прямокишечной артерии под контролем ультразвуковой доплерометрии при хроническом геморрое / Ю. А. Шелыгин, А. Ю. Титов // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2003. – № 1. – С. 39–44.

3. Doppler-guided haemorrhoidal arteries ligation: preliminary clinical experience / Y. Abdeldaim, O. Maba-

deje, K. Muhammad, D. Mc Avinchev // Irish Medical Journal. – 2007. – Vol. 100, N 7. – P. 535–537.

4. Палиенко Р. К. Опыт вакуумного лигирования геморроидальных узлов / Р. К. Палиенко, В. С. Андриец // Стационарозамещающие технологии: «Амбулаторная хирургия». – 2006. – № 3. – С. 41–43.

5. Нечай И. А. Современные технологии в лечении хронического геморроя / И. А. Нечай, Д. Ю. Гончаров // Амбулаторная хирургия. Стационарозамещающие технологии. – 2007. – № 2. – С. 58–62.

6. Воробьев Г. И. Геморрой / Г. И. Воробьев, Ю. А. Шелыгин, Л. А. Благодарный. – М.: Митра-пресс, 2002. – 192 с.

7. Ананко А. А. Геморрой — старая проблема и новые пути ее решения / А. А. Ананко // Український медичний часопис. – 2007. – № 3–4. – С. 117–121.

УДК 618.36:616.8-009.24-07

В. Г. Маричереда, Я. Я. Амбросийчук, С. Г. Черниевская,
Т. Ю. Таганова, Т. В. Давиденко

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ПЛАЦЕНТЫ НА ФОНЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Одесский национальный медицинский университет

Преэклампсия (ПЭ) возникает у 5–15 % беременных в Украине и является лидирующей причиной материнской и неонатальной смертности и заболеваемости как в Украине, так и во всем мире [1; 2]. Принимая во внимание то, что единственный эффективный метод лечения ПЭ — это прерывание беременности, возможность снижения смертности и инвалидности при данной патологии заключается в раннем выявлении патологии при помощи высокочувствительных и специфических биомаркеров, которые позволяют выделить пациентов группы риска, осуществить прицельный мониторинг, установить точный диагноз и, при необходимости, определить момент

своевременного вмешательства. Новые стратегии скрининга предполагают необходимость оценивать не только чувствительность, специфичность и прогностическую значимость биомаркера, но также затраты, приемлемость для пациента и контроль качества исследования [3]. Основным объектом исследований последних лет была идентификация в качестве потенциальных биомаркеров плацентарных факторов, изменение экспрессии которых обнаружено в плацентах при ПЭ. Однако опубликованные данные, зачастую, являются результатом немногочисленных исследований в строго рандомизированных группах пациентов, что не позволяет говорить об универ-

сальности изучаемых маркеров [4–7]. Таким образом, поиск биомаркера, который мог бы применяться как скрининговый для диагностики и прогноза ПЭ — актуальная задача современного акушерства.

Целью данного исследования был поиск биомаркеров и выявление новых патогенетических механизмов развития ПЭ путем определения профиля генетической экспрессии плацентарной ткани ПЭ при помощи ДНК-микрочипов.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 267 беременных, среди которых были выделены основная группа (ПЭ, n=172) и контрольная (физиологичес-



кая беременность, n=95). Клиническое обследование беременных проводили согласно соответствующим клиническим протоколам МЗ Украины [8]. Изучение профиля глобальной экспрессии генов в плацентах 30 здоровых беременных (роды через естественные родовые пути, n=15), роды путем планового кесарева сечения, n=15) и беременных, перенесших ПЭ (n=24), было проведено при помощи мультигеномных ДНК-микрочипов согласно стандартной схеме [9]. По результатам изменения профиля генетической экспрессии было проведено определение экспрессии mRNA Hb в образцах плацентарной ткани методом гибридизации *in situ* в плацентах здоровых беременных и перенесших тяжелую ПЭ. Определяли также концентрацию свободного фетального гемоглобина (Hbф) в плазме соответственно трем триместрам. Вычисление объема трансплацентарной фетоматеринской трансфузии (ФМТ) было выполнено методом Клейхауэра — Бетке (КБ-тест) на основании непрямого определения количества Hbф в материнской крови [10–13]. Для биоинформационного анализа использовали базу данных Gene Ontology для классификации генов соответственно их биологическому действию или молекулярной функции. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel, расчетом средней (M), ошибки (m), коэффициентов Стьюдента. Разницу считали достоверной при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В обследуемых группах средние показатели основных диагностических критериев, таких как систолическое давление (ПЭ — (158,30±0,66) мм рт. ст.; контрольная группа — (113,78±1,17) мм рт. ст.) и

диастолическое давление (ПЭ — (96,45±1,17) мм рт. ст.; контрольная группа — (71,48±0,85) мм рт. ст.) были достоверно различными (p<0,001). Средний уровень суточной протеинурии составил (3,65±0,18) г/л в группе ПЭ и (1,4±0,6) г/л в контрольной группе (p<0,001). В группе ПЭ также достоверно определялась тромбоцитопения — (215,0±9,3)·10⁹/л по сравнению с контрольной — (277,0±8,9)·10⁹/л (p<0,001). При анализе клинических показателей обследуемых групп не было обнаружено достоверных различий в таких параметрах, как возраст беременных, паритет, индекс массы тела по сравнению с контрольной группой (p>0,05) (таблица). Стати-

стически достоверные различия зарегистрированы в следующих категориях: срок гестации к моменту родов, масса новорожденного при рождении и оценка состояния новорожденного по шкале Апгар (на 5-й минуте). При анализе исходов беременности и родов в группе ПЭ выявлены случаи серьезных осложнений беременности в виде синдрома задержки внутриутробного развития (ЗВУР) (n=5; 21 %) и плацентарной дисфункции (n=17; 71 %), сочетание синдрома ЗВУР и плацентарной дисфункции (n=4; 16,7 %).

Исследования при помощи ДНК-микрочипов показали достоверное изменение экспрессии 22 генов в группе ПЭ (рис. 1). Наиболее значимые

Таблица

Клинико-анамнестические показатели

Показатели	Преэклампсия, n=172	Контрольная группа, n=95	p
Возраст матери, лет	30,0±3,3	28,0±5,3	>0,05
Индекс массы тела матери	24,00±2,12	24,0±2,7	>0,05
Паритет	3,37±3,34	3,02±3,13	>0,05
Срок родов (недели гестации)	33,0±0,6	37,0±0,5	<0,001
Масса ребенка при рождении, г	2330,0±8,7	3275,0±11,6	<0,001
Оценка по шкале Апгар (5-я минута), баллы	6,42±0,30	8,13±0,15	<0,001
Первородящие, %	68,04	40,00	—
Экстрагенитальная патология, %	69,1	51,1	—



Рис. 1. Сравнение профиля генетической экспрессии в группах «преэклампсия» и «здоровые беременные»



отклонения зарегистрированы по генам, кодирующим цепи гемоглобинов α и γ (Hb α и Hb γ), экспрессия которых была существенно увеличена в плацентах группы ПЭ. Изучение профиля экспрессии генов установило также снижение в группе ПЭ экспрессии десяти генов, связанных с ангиогенезом. Увеличение экспрессии генов Hb α , Hb γ , гена трансформирующего фактора роста β 1 (TFG β 1), гена гемоксигеназы-1 (HO-1) и снижение экспрессии пяти генов группы ангиогенеза было подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Существенных различий профиля экспрессии mRNA цепей четырех гемоглобинов (Hb α , Hb β , Hb γ , Hb δ) в образцах плацентарной ткани обеих групп найдено не было. Результаты исследования методом гибридизации *in situ* показали, что клетки, экспрессирующие mRNA Hb γ , были преимущественно расположены в просвете сосудов в образцах группы ПЭ и группы контроля. При этом в плацентах группы ПЭ обнаружены клетки, экспрессирующие mRNA Hb γ , в межворсинчатом пространстве с более интенсивными сигналами, чем в группе контроля. В зоне трофобласта обеих групп сигнал не был зарегистрирован.

Уровни Hbф в плазме крови были в 9 раз выше в группе ПЭ по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$) в третьем триместре (рис. 2). Диагностическая ценность Hbф в качестве маркера ПЭ была следующей: чувствительность 91 % и специфичность 93,5 % для доверительного интервала 95 %.

На основании полученных данных, с учетом потребности в эффективном и недорогом скрининговом тесте ПЭ, нами было проведено сопоставление содержания Hbф прямым методом и опосредовано, при помощи количест-

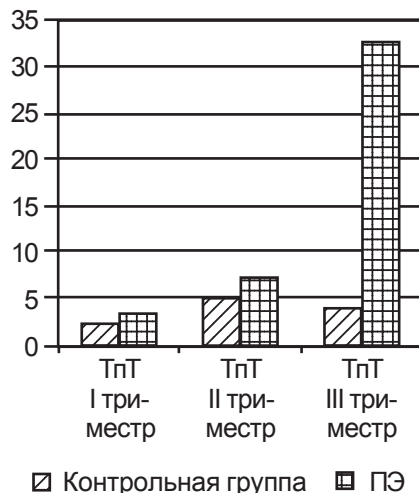


Рис. 2. Динамика фетоматеринской трансплацентарной трансфузии

венного определения объема трансплацентарной ФМТ методом Клейхауэра — Бетке (КБ-тест). КБ-тест относится к наиболее распространенным методам определения ФМТ, основанным на цитохимических отличиях Hbф и Hb взрослого. Чувствительность КБ-теста, по данным различных исследований, составляет 92 % [10–13]. Положительная корреляция между уровнем Hbф в плазме и объемом ФМТ была выявлена в случае позднего начала ПЭ во втором ($r=0,43$) и третьем ($r=0,47$) триместрах.

Изучение профиля глобальной экспрессии генов в пла-

центе при неосложненной беременности и беременности на фоне ПЭ показало достоверное изменение экспрессии генов в плаценте под влиянием патологии при отсутствии влияния процесса родов на состояние генетической экспрессии. Появление свободных форм гемоглобина на фоне изменения экспрессии его генов может вызывать повреждение тканей и разрушение клеточных мембран, причем основными повреждающими факторами становятся метаболиты гемоглобина — гем и железо (рис. 3) [13–15]. Гем может повредить клетки косвенно, повышая чувствительность клеточных мембран к окислению, или же путем прямого окисления. Благодаря гидрофильной природе, гем может проникать сквозь клеточные мембраны и вызывать повреждение цитозольных белков, органелл клетки и ДНК. Гем и железо также способны вызвать окисление белков и липидов в цитотоксические формы, которые продолжают окислительное повреждение. Кроме того, будучи сильным окислителем, гем стимулирует формирование реактивных кислородных разновидностей [16–18]. Кроме окислительных свойств, гем также вызывает воспалитель-

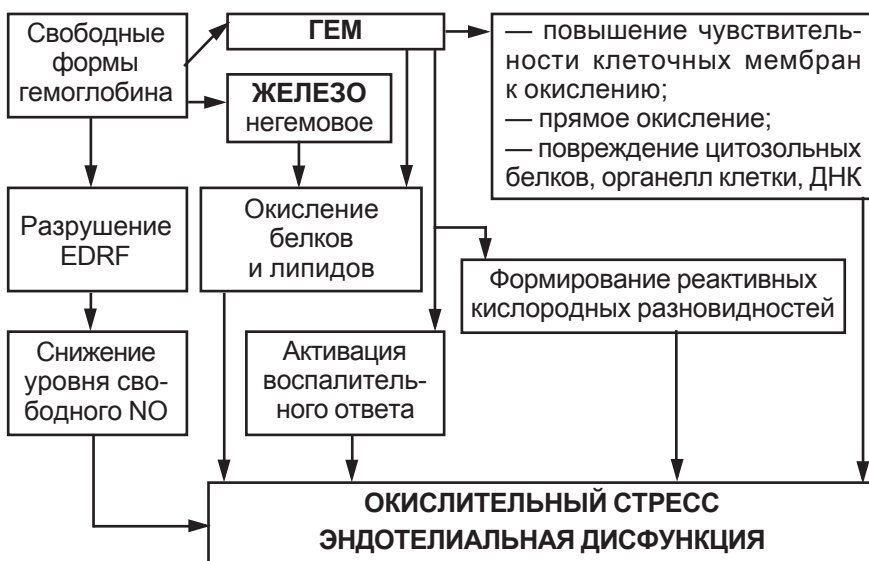


Рис. 3. Схема действия свободных форм гемоглобина

ный ответ активацией нейтрофилов или прямым воздействием через провоспалительный toll-like-рецептор 4 [19–20].

Таким образом, увеличенная продукция и накопление свободного гемоглобина могут быть патофизиологическим механизмом, который ответствен за окислительный стресс и эндотелиальное повреждение, зарегистрированные в плацентах группы ПЭ. Свободный Hb и его метаболиты могут выступать как повреждающие агенты не только на клеточном уровне, но и как медиаторы системных эффектов. Например, свободный гемоглобин повышает сократительную способность сосудов, что может привести к повышению артериального давления [21]. Гемоглобин, являющийся потенциальным антагонистом оксида азота (NO), способствует снижению уровня свободного NO, приводя к усугублению эндотелиальной дисфункции и повышению сосудистого тонуса. Повышенный уровень свободного гемоглобина способствует разрушению NO (EDRF), что также увеличивает сосудистый тонус [19; 20]. Следовательно, свободный гемоглобин может, при условии проникновения в материнское русло, посредством указанных механизмов влиять на изменения гемодинамики, типичные для ПЭ.

Синтез гемоглобина у взрослых обусловлен низким парциальным давлением кислорода, что зарегистрировано в различных исследованиях [14–17]. В условиях ПЭ плацента находится в состоянии гипоперфузии, которая может стимулировать повышение экспрессии гена Hb. Отдельными исследованиями было установлено увеличение плазменных уровней двух Hb-стимулирующих гормонов — эритропоэтина и активина A на фоне ПЭ, что, возможно, является вспомогательным механизмом описанного повышения



Рис. 4. Онтология генов: 1 — комплекс гемоглобина; 2 — метаболизм гемоглобина; 3 — полимеризация актина; 4 — связывание трансформирующего фактора; 5 — хемотаксис; 6 — связь цитокинов; 7 — регуляция апоптоза

синтеза Hb [21]. Экспрессия гена *HO-1* (гемоксигеназы), фермента, отвечающего за деструкцию гема, повышена в плацентах ПЭ по сравнению с контрольной группой, а экспрессия гена *HO-2*, напротив, снижена, что может свидетельствовать о локальном дисбалансе системы гемоксигеназ, также способствующем аккумуляции Hb в плаценте [16–18]. Экспрессия гена трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*TFG\beta 1*), который связан с ангиогенезом и Hb, оказалась повышенной в плацентах группы ПЭ, а *TFG\beta 1*, который относится к провоспалительным цитокинам, обладает способностью реактивировать экспрессию Hb γ .

Биоинформационный анализ измененных генов выявил функциональные категории, связанные с гемоглобином, транспортом кислорода и комплекса гемоглобина (рис. 4). Анализ сигнальных путей показал, что гены, изменение экспрессии которых обнаружено при ПЭ, связаны с нейродегенеративными расстройствами, ангиогенезом, *TGF\beta 1* и *VEGF*-сигнальными путями (рис. 5). Анализ ассоциации указанных изменений с биологическими функциями свидетельствует о том, что в плацентах ПЭ наблюдаются гипоксия, изменение апоптоза,

ангиогенеза и метаболизма фолатов [7; 10]. Полученные данные позволяют выделить эти биологические процессы как основные звенья патогенеза ПЭ и проводить углубленные исследования метаболитических изменений именно этих биологических процессов.

Достоверность и значимость изменений уровня HbF в плазме для ПЭ была установлена только для второго и третьего триместров беременности, и, соответственно, маркер не может быть применим в первом триместре, что снижает его ценность с прогностической точки зрения в ранних сроках беременности, но



Рис. 5. Анализ сигнальных путей: 1 — нейродегенеративные нарушения; 2 — антигенпроцессинг и презентация; 3 — MAPK-сигнальный лейкоцитарный путь; 4 — трансэндотелиальная миграция



подтверждает правильность предположения о роли Hbф в патогенезе ПЭ и может использоваться со второго триместра.

Таким образом, КБ-тест может быть предложен как прямой недорогой и быстрый скрининговый тест прогноза ПЭ для групп риска. Полученные результаты продемонстрировали значительно более высокие плазменные уровни свободного фетального Hb у женщин с ПЭ в поддержку этого предположения.

Выводы

1. В результате изучения профиля экспрессии генов плаценты в группе ПЭ установлены следующие биологические процессы, которые можно отнести к базовым патофизиологическим механизмам преэклампсии: гипоксия, апоптоз, ангиогенез и метаболизм фолатов.

2. Важным этиопатогенетическим фактором прогрессии ПЭ является увеличение уровня свободного Hbф в материнской плазме крови.

3. Уровень свободного Hbф — потенциально важный диагностический биомаркер, также отражающий степень тяжести ПЭ, может быть предложен как скрининговый во втором и третьем триместрах как в абсолютном значении, так и опосредованно в виде теста Клейхауэра — Бетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грищенко В. И. Современный взгляд на патогенез и лечение преэклампсии / В. И. Грищенко, О. П. Липко // Медицинские аспекты здоровья женщины. — 2008. — № 2 (11). — С. 4–7.

2. Гестозы / Б. М. Венцовский, В. Н. Запорожан, А. Я. Сенчук, Б. Г. Скачко. — М.: МИА, 2005. — 462 с.

3. Запорожан В. Н. Генетичні передумови здоров'я нації / В. Н. Запорожан // Журнал АМН України. — 2007. — Т. 13, № 3. — С. 455–463.

4. Роль окислительного стресса в патогенезе гестоза / И. С. Сидорова, Е. И. Боровкова, И. В. Мартынова [и др.] // Акушерство и гинекология. — 2007. — № 3. — С. 3–5.

5. Фаткулин И. В. Функциональное состояние клеточных мембран как предиктор развития гестоза / И. В. Фаткулин, Е. В. Ризванова, В. Н. Осколков // Акушерство и гинекология. — 2007. — № 4. — С. 19–23.

6. Detection and identification of novel metabolomic biomarkers in preeclampsia / L. C. Kenny, D. Broadhurst, M. Brown [et al.] // *Reprod. Sci.* — 2008. — Vol. 15. — P. 591–597.

7. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis / B. Huppertz // *Hypertension*. — 2008. — Vol. 51. — P. 970–975.

8. Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги: Наказ МОЗ України № 676 от 31.12.2004. — К., 2004. — С. 16–32.

9. Биологические микрочипы, содержащие иммобилизованные в гидрорегеле нуклеиновые кислоты, белки и другие соединения: свойства и приложения в геномике / В. Барский, А. Колчинский, Ю. Лысов, А. Мирзабеков // Молекулярная биология. — 2002. — Т. 36. — С. 563–584.

10. Large fetomaternal hemorrhage: prenatal predictive factors for perinatal outcome / C. Huissoud, V. Divry, C. Dupont [et al.] // *Am. J. Perinatol. Reference*. — 2009. — Vol. 26 (Issue 3). — P. 227–233.

11. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease / C. D. Reiter, X. Wang, J. E. Tanus-Santos [et al.] // *Nature medicine*. — 2002. — Vol. 8. — P. 1383–1389.

12. Zhong X. Y. The levels of circulatory cell-free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia / X. Y. Zhong, W. Holzgreve, S. Hahn // *Hypertens Pregnancy*. — 2002. — Vol. 21. — P. 77–83.

13. Total cell-free DNA (beta-globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening / A. Farina, A. Sekizawa, M. Iwasaki [et al.] // *Prenat. Diagn.* — 2004. — Vol. 24. — P. 722–726.

14. Erythrocyte Hemolysis and Hemoglobin Oxidation Promote Ferric Chloride-induced Vascular Injury / K. J. Woollard, S. Sturgeon, J. P. F. Chindusting [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2009. — May 8. — Vol. 284 (19). — P. 13110–13118.

15. Морщакова Е. Ф. Эритропоз и его регуляция в эмбриональном, фетальном и неонатальном периодах / Е. Ф. Морщакова, А. Д. Павлов, А. Г. Румянцев // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 1999. — № 3. — С. 12–16.

16. Сидельникова В. М. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного / В. М. Сидельникова, А. Г. Антонов. — М.: Триада X, 2004. — С. 37–51.

17. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data / R. Barry Zeeberg, Weimin Feng, Geoffrey Wang [et al.] // *Genome Biology*. — 2003. — Vol. 4. — R28.

18. Jauniaux E. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution / E. Jauniaux, L. Poston, G. J. Burton // *Hum. Reprod. Update*. — 2006. — Vol. 12. — P. 747–755.

19. Heme Induces Neutrophil Migration and Reactive Oxygen Species Generation through Signaling Pathways Characteristic of Chemotactic Receptors / B. N. Porto, L. S. Alves, P. L. Fernandez Dutra [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 24430–24436.

20. Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4 / R. T. Figueiredo, P. L. Fernandez, D. S. Mourao-Sa [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2007. — July 13. — Vol. 282 (28). — P. 20221–20229.

21. Roberts J. M. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme / J. M. Roberts, C. A. Hubel // *Placenta*. — 2009. — Vol. 30 (Suppl. A). — S32–S37.

