

АКУШЕРСТВО

УДК 618.39-021.3-02-07-085+612.63.031.3:577.21

*О.С. Кривопустов**Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ***ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ЗАГРОЗЛИВОГО АБОРТУ
У ЖІНОК З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА
ПРОГЕСТЕРОНОВОГО РЕЦЕПТОРА**

Розроблено метод прогнозування розвитку загрозового аборт у жінок репродуктивного віку з урахуванням поліморфізму гена рецептора прогестерону (SNP PGR) rs590688. Статистично значущими предикторами розвитку зазначеної патології є рівень стресу за шкалою Perceived Stress Scale та гомозиготне носійство G-алеля за SNP PGR rs590688. При цьому гомозиготне носійство G-алеля за SNP PGR rs590688 асоціюється з підвищенням ризику розвитку загрозового аборт у 2,5 разу.

Ключові слова: ген прогестеронового рецептора, загрозовий аборт, поліморфізм гена, прогнозування, стрес.

Ранні репродуктивні втрати залишаються вкрай актуальною медичною та соціально значущою проблемою сучасного акушерства та охорони здоров'я в цілому. Співвідношення народжуваності та смертності в нашій державі підкреслює важливість сприятливих результатів кожної вагітності [1]. При цьому загрозовий аборт зустрічається до 25 % серед усіх вагітностей [2].

Загрозовий аборт у 15 % випадків може завершитись власне викиднем [3]. За умови прогресування вагітності до наслідків загрозового аборт відносяться виникнення передлежання плаценти, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, допологова кровотеча невідомого генезу, передчасний розрив плідних оболонок, кровотеча у ранньому післяпологовому періоді, передчасні пологи, затримка внутрішньо-утробного росту плода, низька маса при народженні, більш висока неонатальна захворюваність та смертність [4].

До основних факторів розвитку аборт належать інфекційні, анатомічні, гормональні та генетичні чинники [5]. Як відомо, прогесте-

рон забезпечує розвиток вагітності [6, 7]. Його дія реалізується через активацію прогестеронової рецепторів [8]. Зазначені рецептори кодується геном рецептора прогестерону (PGR), котрий знаходиться на хромосомі 11q22–23 [9]. 17-ядерний PGR виявлено в тканинах матки, хоріона й амніона [10]. Від одноклеотидного поліморфізму (SNP) PGR може залежати рецепторна відповідь на прогестерон [11, 12]. Через порушення експресії PGR може змінюватися перебіг біохімічних процесів в організмі жінки, спричинюючи розвиток зазначеного патологічного процесу [12].

Залучення можливостей сучасної генетики до клінічної практики сприяє більш ефективному прогнозуванню, визначенню ризиків виникнення зазначеної патології і, як наслідок, більш ранньому та ретельному динамічному спостереженню груп ризику, більш ранньому та ефективному залученню сучасних терапевтичних можливостей.

У дослідженні M. Su у 2011 р. показано, що гаплотип C/C, який формується при SNP rs590688 (C/G) та rs11224592 (T/C), статис-

© О.С. Кривопустов, 2016

тично значущо асоціюється зі зменшенням ризику виникнення звичного невиношування вагітності [13]. При цьому інші автори довели, що SNP PGR rs500760 може впливати на ефективність прогестеронової терапії з метою попередження передчасних пологів [12]. У даному дослідженні одонуклеотидні поліморфізми гена рецептора прогестерону rs500760 та rs590688 були обрані як найбільш перспективні в аспекті вивчення асоціації SNPs PGR з розвитком загрозливого абортів.

Мета роботи – розробка методу прогнозування розвитку загрозливого абортів у жінок з урахуванням поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688.

Матеріал і методи. У дослідження було включено 197 жінок репродуктивного віку в терміні гестації 8–16 тижнів. Основну групу становили 95 пацієнок, у яких було діагностовано загрозу абортів, контрольну групу – 102 практично здорові жінки.

Критеріями включення до основної групи були: вік від 18 до 45 років включно; самостійна одноплідна вагітність; ознаки загрозливого абортів; наявність інформованої письмової згоди. Критерії невключення до основної групи такі: багатоплідна вагітність; застосування допоміжних репродуктивних технологій; рівень пролактину та естрадіолу поза межами нормальних значень для даного терміну гестації; аномалії розвитку статевих органів; наявність тяжкої акушерської та / або гінекологічної патології; тяжка екстрагенітальна патологія; ознаки гострої інфекції; алкоголізм або наркоманія в анамнезі; наявність протипоказань до застосування препарату натурального мікронізованого прогестерону.

Для групи контролю застосовувалися такі критерії включення: вік від 18 до 45 років включно; самостійна одноплідна вагітність; відсутність загрози самовільного абортів; нормальні рівні естрадіолу та прогестерону в крові на момент включення в дослідження; задовільний соматичний стан; наявність інформованої письмової згоди. Критеріями невключення були: багатоплідна вагітність; застосування допоміжних репродуктивних технологій; аномалії розвитку статевих органів; наявність в анамнезі патологічних пологів, самовільного абортів, загрози самовільного абортів, передчасних пологів, загрози передчасних пологів; наявність хромосомної пато-

логії в сімейному анамнезі; наявність ознак будь-якої гострої інфекції; наявність тяжкої екстрагенітальної патології; алкоголізм або наркоманія в анамнезі.

Всім пацієнткам крім обстеження загальноклінічними методами (згідно з наказом МОЗ України № 620 від 20.12.03 та № 417 від 15.07.11) проводили ультразвукове дослідження органів малого тазу (підтвердження наявності маткової вагітності, визначення терміну вагітності і наявності ретрохоріальної гематоми тощо) на апараті Aloka SSD-1700 (Японія). Оцінювали рівні гормонів: естрадіолу, прогестерону, пролактину (ELISA, DRG Instruments GmbH, Німеччина). Методом анкетування визначали рівень сприйняття стресу, для цього використовували опитувальник Perceived Stress Scale (PSS) за Sheldon Cohen (1988).

Для визначення поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688 (C/G) та rs500760 (A/G) використовували молекулярно-генетичні дослідження. SNPs PGR визначали у два етапи. Першим було виділення ДНК біологічного матеріалу з букального епітелію. Цей матеріал збирали за допомогою зонда «Jiangsu Suyun Medical Materials Co., Ltd.» (Китай). Для отримання ДНК використовували набір реагентів NeoPrep50 DNA «НЕОГЕН» (Україна). Отриману ДНК безпосередньо використовували для проведення полімеразної ланцюгової реакції. SNP PGR rs590688 (C/G) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_997600_10 та 7500 Fast Real-time PCR System «Applied Biosystems, Foster City» (США). SNP PGR rs500760 (A/G) визначали із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_997496_10 та 7500 Fast Real-time PCR System «Applied Biosystems, Foster City» (США). Програма ампліфікації складалася з 50 циклів (денатурація – 92 °C, 15 с, гібридизація та елонгація – 60 °C, 1 хв), після чого аналізували дискримінацію алелей.

Аналіз результатів був проведений за допомогою статистичного пакета SPSS (версія 22) з використанням статистичного середовища R (версія 3.2).

Результати та їх обговорення. Середній вік пацієнок основної групи становив (28,7±0,5) року. Середній вік настання менархе – (13,1±0,4) року. Середня тривалість циклу дорівнювала (29,4±0,4) дня, середня трива-

лість *mensis* – (5,3±0,2) дня. Вік початку статевого життя становив (18,6±0,8) року. Переважна більшість пацієнок була у шлюбі – 87 (91,6 %). 86 (90,5 %) пацієнок характеризували стан здоров'я батька майбутньої дитини як «здоровий». В анамнезі 30 (31,6 %) жінок мали одні пологи, 4 (4,2 %) – двоє пологів, 1 (1 %) – 5 пологів, 60 (63,2 %) жінок не мали пологів в анамнезі, 25 (26,3 %) пацієнок мали викидень в анамнезі. На момент госпіталізації біль унизу живота відмічала 91 (95,78 %) особа, кров'янисті виділення – 55 (57,9 %). У всіх пацієнок при гінекологічному дослідженні не було виявлено структурних змін шийки матки (закрите зовнішнє вічко). Ехографічно в усіх пацієнок було визначено наявність серцевих скорочень плода та відповідність розмірів ембріона терміну гестації. У 16 (16,8 %) вагітних діагностували ретрохоріальну гематому. Отримані рівні естрадіолу, прогестерону та пролактину відповідали референтним значенням для наявних термінів вагітності.

Середній вік жінок контрольної групи становив (27,7±0,4) року. Середній вік настання менархе – (13,4±0,5) року. Середня тривалість циклу дорівнювала (29,3±0,4) дня, середня тривалість *mensis* – (5,2±0,2) дня. Вік початку статевого життя становив (18,5±0,7) року. Переважна більшість була у шлюбі – 90 (88,2 %). 93 (91,2 %) характеризували стан здоров'я батька майбутньої дитини як «здоровий». В анамнезі 28 (27,5 %) жінок мали одні пологи, 4 (3,9 %) – двоє пологів, 70 (68,6 %) жінок не мали пологів в анамнезі. Соматичний стан усіх характеризувався як задовільний. У всіх жінок при спеціальному гінекологічному дослідженні не було виявлено структурних змін шийки матки (закрите зовнішнє вічко). За даними ультразвукової діагностики у всіх було визначено наявність серцевих скорочень плода та відповідність розмірів ембріона терміну гестації. Отримані рівні естрадіолу та прогестерону відповідали референтним значенням для наявних термінів вагітності.

З метою прогнозування виникнення загрозового абортів було використано статистичний аналіз для пошуку найбільш важливих предикторів захворювання. Пошук проводили серед таких факторів, як рівень стресу за шкалою PSS, поліморфізм гена рецептора

прогестерону rs590688 та rs500760, рівень естрадіолу, прогестерону в крові, індекс маси тіла, даних щодо того, першовагітна жінка чи ні, відсутності пологів в анамнезі, наявності вищої освіти, даних щодо віку, наявності в сім'ї курця, тютюнопаління, пов'язаності роботи з фізичною працею, сімейного стану жінки (табл. 1).

Серед зазначених факторів для пошуку найбільш значущих з них використовували статистичний метод «Random Forest», кількість «побудованих дерев» – 1000. Загальна класифікаційна спроможність моделі на «тренуючій» вибірці становила 0,99 (99 %). Загальна класифікаційна спроможність моделі для бутстреп-вибірки дорівнювала 0,59 (59 %).

За результатами «Random Forest» статистично значущими виявились такі проаналізовані фактори: рівень стресу за шкалою PSS, індекс маси тіла, SNP PGR rs590688 та рівень естрадіолу. Подальше зменшення кількості предикторів з метою спрощення моделі та досягнення максимуму класифікаційної спроможності привело до моделі, що містить два компоненти: рівень стресу за шкалою PSS та SNP PGR rs590688. Загальна класифікаційна спроможність даної моделі на «тренуючій» вибірці становила 0,78 (78 %). Була створена оновлена матриця для «тренуючої» вибірки. Загальна класифікаційна спроможність моделі для бутстреп-вибірки становила 0,68 (68 %).

При аналізі характеристик поліморфізму rs590688, який був визначений як один з найбільш важливих предикторів розвитку загрозового абортів, їх було перевірено за допомогою тесту хі-квадрат з 1 ступенем свободи, без використання корекції Йетса. Розподіл генотипів відповідає закону Харді–Вайнберга. Проаналізувавши всі моделі успадкування, було обрано найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айккайке. Такою для rs590688 виявилася рецесивна модель, для якої розраховані значення відношення шансів та статистична значущість відповідно до результатів тесту хі-квадрат (табл. 2).

З метою з'ясування значущості кожного з факторів, котрі були визначені методом «Random Forest», використовували логістичну регресію, специфічність моделі становила 62,7 %, чутливість моделі – 53,7 %, класифікаційна спроможність моделі – 58,4 % (табл. 3, 4).

Таблиця 1. Порівняльна характеристика основної і контрольної груп жінок, включених у дослідження

Фактор	Практично здорові вагітні (n=102)	Вагітні з загрозовим абортom (n=95)	P
Вік жінки, років	27,71±0,43	28,68±0,49	0,136
Жінка в шлюбі	90 осіб (88,24 %)	87 осіб (91,58 %)	0,589
Наявність повної або неповної вищої освіти	96 осіб (94,12 %)	86 осіб (90,53 %)	0,496
Відсутність пологів в анамнезі	70 осіб (68,63 %)	60 осіб (63,16 %)	0,510
Перша вагітність	53 особи (51,96 %)	52 особи (54,74 %)	0,805
Жінка палить	2 особи (1,96 %)	4 особи (4,21 %)	0,431
Наявність курця в сім'ї	15 осіб (14,71 %)	14 осіб (14,74 %)	1,000
Робота, пов'язана з фізичною працею	9 осіб (8,82 %)	8 осіб (8,42 %)	1,000
Рівень прогестерону, нг/мл	29,11±0,57	27,69±0,87	0,171
Рівень естрадіолу, пг/мл [#]	1635,18±404,18	1492,80±790,38	0,022*
Індекс маси тіла, кг/м ^{2#}	24,70±0,20	24,40±0,25	0,037*
Рівень стресу [#]	16±5	17±6	0,007*
<i>rs590688</i>			
CC	30 осіб (29,41 %)	29 осіб (30,53 %)	0,988
CG	58 осіб (56,86 %)	40 осіб (42,10 %)	0,054
GG	14 осіб (13,73 %)	40 осіб (42,10 %)	0,028*
<i>rs500760</i>			
AA	51 особа (50,00 %)	53 особи (55,79 %)	0,503
AG	45 осіб (44,12 %)	37 осіб (38,95 %)	0,503
GG	6 осіб (5,88 %)	5 осіб (5,26 %)	1,000

Примітка. * Показники статистично значущо розрізняються у двох групах. # У одній чи обох групах за цим показником розподіл даних відрізняється від нормального (відповідно до результатів тесту Шапіро–Уїлка), дані представлені як медіана ± міжквартильний діапазон. Порівняння середніх проводили за допомогою тесту Манна–Уїтні–Уїлкоксона. Дані для кількісних параметрів, що не відмічені #, нормально розподілені (відповідно до результатів тесту Шапіро–Уїлка) і представлені як середнє ± стандартна похибка середнього. Різницю середніх визначали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Таблиця 2. Найкраща модель успадкування SNP PGR rs590688

Генотип	Контроль		Випадок		Відношення шансів	Статистична значущість
	абс.	%	абс.	%		
CC + CG	88	86,3	69	72,6	1,00	
GG	14	13,7	26	27,4	2,37 (1,17–4,99)	0,02

Таблиця 3. Модель логістичної регресії для визначення значущості кожного з факторів, котрі були визначені методом «Random Forest»

Фактор	Коефіцієнт регресії	Відношення шансів (ВШ)	95 % довірчий інтервал для ВШ		P
			нижній	верхній	
Рівень стресу	0,132	1,141	1,054	1,243	0,001
rs590688(GG)*	0,828	2,290	1,090	4,810	0,029
Константа	-2,532	0,079			0,001

* rs590688 відповідає рецесивній моделі успадкування, тому rs590688 (GG) порівнюється з rs590688 (CC + CG), що виступає референсною категорією.

Таблиця 4. Метрика моделі логістичної регресії для визначення значущості кожного з факторів, котрі були визначені методом «Random Forest»

Спостереження	Передбачення		Відсоток вірних
	здорові	хворі	
Здорові	64	38	62,7
Хворі	44	51	53,7
Загальний відсоток			58,4

Підсумком побудованої моделі є такі формули: $y^* = -2,532 + 0,132 \text{ PSS} + 0,828 \text{ rs590688}$, де $y^* = \ln(p / (1 - p))$. Для розрахунку ймовірності розвитку захворювання для конкретного випадку необхідно провести розрахунок: $p = e^{y^*} / (e^{y^*} + 1)$, де e – число Ейлера ($e \approx 2,718$), $y^* = -2,532 + 0,132 \text{ PSS} + 0,828 \text{ rs590688}$.

Аналіз коефіцієнтів регресії вказує на те, що як рівень стресу за шкалою PSS, так і гомозиготне носійство G-алеля за rs590688 є факторами, котрі асоціюються з вищим ризиком розвитку зазначеного захворювання. Іншим відображенням коефіцієнтів регресії є відношення шансів, що являє собою e^{y^*} .

Для категоріальних змінних як генотип за поліморфізмом цей показник вказує на те, в яку кількість разів у осіб, котрі мають дану категорію (тобто генотип GG за rs590688), вищий ризик розвитку захворювання, що вивчається, ніж у референсній категорії (тобто у осіб з генотипом CC або CG за rs590688).

Отже, найбільш значущими з досліджуваних є такі предиктори: рівень стресу за шкалою PSS та одонуклеотидний поліморфізм rs590688. У гомозиготних носіїв G-алеля за rs590688 ризик розвитку захворювання у 2,5 разу вищий, ніж у носіїв інших генотипів за цим поліморфізмом.

Список літератури

1. Зоря О. П. Демографічний стан в Україні в умовах глибокої трансформаційної економічної кризи / О. П. Зоря // Грані. – 2015. – № 2 (118). – С. 89–92.
2. Saraswat L. Maternal and perinatal outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester: a systematic review / L. Saraswat, S. Bhattacharya // BJOG. – 2010. – № 117. – P. 245–257.
3. Basama F. The outcome of pregnancies in 182 women with threatened miscarriage / F. Basama, F. Crosfill // Arch. Gynecol. Obstet. – 2004. – № 270. – С. 86–90.
4. Ozdemirci S. Influence of threatened miscarriage on pregnancy and early postpartum period: a case-control report / S. Ozdemirci, E. Karahanoglu // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. – 2015. – № 28. – P. 1186–1189.
5. Лихачев В. Практичне акушерство з невідкладними станами / В. Лихачев. – Полтава : Медичне інформаційне агентство, 2010. – 720 с.
6. Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone / M. Al-Asmakh // Middle East Fertility Society J. – 2007. – V. 12, № 3. – P. 197–201.
7. Graham J. Physiological action of progesterone in target tissues / J. Graham, C. Clarke // Endocrine. – 1997. – № 18. – P. 502–519.
8. Romano A. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone / A. Romano, B. Delvoux, D. Fischer // J. Mol. Endocrinol. – 2007. – № 38. – P. 331–350.
9. Guoyang L. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth / L. Guoyang, T. Morgan, M. Bahtiyar // Reprod. Sci. – 2008. – № 15. – P. 147–155.

На основі побудованої формули логічно привести декілька клінічних прикладів застосування розрахунку ризику розвитку загрозливого аборту.

Приклад 1. Пацієнтка має генотип C/C за SNP PGR rs590688, рівень стресу за шкалою PSS становить 15 балів.

$$y^* = -2,532 + 0,132 * 15 + 0,828 * 0 = -0,507;$$

$$p = e^{-0,507} / (e^{-0,507} + 1) = 0,37.$$

Ймовірність розвитку загрозливого аборту в даному випадку становить 37 %.

Приклад 2. Пацієнтка має генотип G/G за SNP PGR rs590688, рівень стресу за шкалою PSS становить 20 балів.

$$y^* = -2,532 + 0,132 * 20 + 0,828 * 1 = 0,996;$$

$$p = e^{0,996} / (e^{0,996} + 1) = 0,73.$$

Ймовірність розвитку загрозливого аборту в даному випадку становить 73 %.

Висновок

Розроблено метод прогнозування розвитку загрозливого аборту у жінок із урахуванням поліморфізму гена рецептора прогестерону. Доведено, що найбільш значущими предикторами розвитку зазначеної патології є рівень стресу за шкалою PSS та гомозиготне носійство G-алеля за SNP PGR rs590688. При цьому гомозиготне носійство G-алеля за SNP PGR rs590688 асоціюється з підвищеним ризиком розвитку загрозливого аборту у 2,5 разу.

10. *Mills A.* Characterization of progesterone receptor isoform expression in fetal membranes / A. Mills, B. Yonish // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2006. – № 195. – P. 998–1003.
11. *Manuck T.* Predictors of response to 17-alpha hydroxyprogesterone caproate for prevention of recurrent spontaneous preterm birth / T. Manuck, M. Esplin, J. Biggio // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2016. – № 214. – P. 376.
12. *Kryvopustov O.* Single nucleotide polymorphisms in human progesterone receptor gene and its value in miscarriage or preterm delivery / O. Kryvopustov, V. Dosenko // *Fiziol. Zh.* – 2015. – № 61. – P. 111–119.
13. *Su M.* Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population / M. Su, I. Lee, Y. Chen // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2011. – № 28. – P. 239–243.

A.C. Кривоустов

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ УГРОЖАЮЩЕГО АБОРТА У ЖЕНЩИН С УЧЕТОМ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ПРОГЕСТЕРОНОВОГО РЕЦЕПТОРА

Разработан метод прогнозирования развития угрожающего аборта у женщин репродуктивного возраста с учетом полиморфизма гена рецептора прогестерона (SNP PGR) rs590688. Статистически значимыми предикторами развития данной патологии являются уровень стресса по шкале Perceived Stress Scale и гомозиготное носительство G-аллели по SNP PGR rs590688. При этом гомозиготное носительство G-аллели по SNP PGR rs590688 ассоциируется с повышением риска развития угрожающего аборта в 2,5 раза.

Ключевые слова: ген прогестеронового рецептора, угрожающий аборт, полиморфизм гена, прогнозирование, стресс.

O.S. Kryvopustov

PREDICTION OF THREATENED ABORTION IN ACCORD WITH PROGESTERONE RECEPTOR GENE POLYMORPHISM

It has been studied prognosis of threatened abortion in women of reproductive age taking into account progesterone receptor gene polymorphism (SNP PGR) rs590688. Statistically significant predictors of this pathology development are stress level on a scale of Perceived Stress Scale and single nucleotide polymorphism of progesterone receptor gene (SNP PGR) rs590688. Homozygous carriers of G-allele SNP PGR rs590688 is associated with an increase of risk of threatened abortion in 2,5 times.

Keywords: progesterone receptor gene, threatened abortion, gene polymorphism, prediction, stress.

Поступила 25.02.16