

Варіанти гена рецептора прогестерону як генетичний фактор ризику розвитку загрозового аборту

О.С. Кривоустов¹, В.Є. Досенко²

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ;

²Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: kryvopustov@gmail.com

Визначення поліморфізмів гена рецептора прогестерону rs590688 C/G та rs500760 A/G проведено з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі у вагітних жінок із загрозою аборту (дослідна група) та у практично здорових вагітних жінок (контрольна група). За результатами генотипування розподіл алельних варіантів значно відрізнявся при дослідженні rs590688: C/C – 23,9%, C/G – 44,8%, G/G – 31,3% у пацієнтів, що мали загрозу аборту та C/C – 27,2%, C/G – 58,7%, G/G – 14,1% у контрольній групі ($P < 0,05$ за χ^2). Розподіл алельних варіантів поліморфізму rs500760 статистично не відрізнявся, в дослідній групі A/A – 53,7%, A/G – 40,3%, G/G – 6%, в контрольній групі A/A – 52,2%, A/G – 44,6%, G/G – 3,3% ($P > 0,05$). Частота мінорної гомозиготи G/G поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688 у пацієнток з загрозою аборту в нашому дослідженні майже в 10 разів вища порівняно з жінками тайванської популяції, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності. Отримані результати свідчать про значні етнічні відмінності в частоті різних варіантів поліморфізмів гена рецептора прогестерону та наявність клінічного значення поліморфізму rs590688.

Ключові слова: ген прогестеронового рецептора; поліморфізм гена; загрозовий аборт.

ВСТУП

Загрозовий аборт є частим ускладненням, яке виникає у 16-25% усіх вагітностей [1]. Серед материнських негативних наслідків загрозового аборту виділяють такі, як виникнення передлежання плаценти, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, допологова кровотеча невідомого генезу, передчасний розрив плідних оболонок, кровотеча у ранньому післяпологовому періоді та ручне відділення плаценти. Серед негативних наслідків загрозового аборту для плода виділяють високий ризик передчасних пологів, затримку внутрішньоутробного росту плода, низьку масу при народженні, вищу неонатальну смертність, вищу неонатальну захворюваність та частішу наявність вроджених вад розвитку [2]. Так, серед провідних чинників розвитку аборту розглядають, насамперед, інфекційні, анатомічні, гормональні та генетичні [3]. Зокрема, прогестерон

відіграє вкрай важливу роль у забезпеченні репродуктивної функції жінки, регуляції менструального циклу, імплантації зиготи, розвитку матки та забезпеченні маткового “спокою” протягом вагітності, попередженні передчасного дозрівання шийки матки [3, 4]. Його нестача під час вагітності може спричинити загрозу переривання вагітності, самовільний викидень, загрозу передчасних пологів, передчасні пологи [4].

Провідне місце в лікуванні зазначеної патології посідають препарати натурального прогестерону [5]. Їх використання нормалізує тонус матки, зменшує частоту передчасного вкорочення шийки матки, сприяє покращенню циркуляції крові в нервовій системі плода [4-7]. Дія прогестерону реалізується через активацію прогестеронових рецепторів. Від їх кількості та афінності залежить ефективність цих препаратів [8]. Зазначені рецептори кодується геном рецептора прогестерону (PGR), котрий знаходиться на хромосомі 11q22-23 і

складається з 8 екзонів [9]. У тканинах амніона і хоріона виявлено 17-ядерний PGR [10]. Рецепторна відповідь на прогестерон може залежати від одонуклеотидного поліморфізму (SNP) PGR [11, 12]. Станом на 2016 р. описано 5732 поліморфізмів PGR, проте за останні роки було проведено лише декілька досліджень, які вказують на роль SNPs PGR у формуванні схильності до виникнення звичного невиношування вагітності [11-16]. SNPs PGR може спричиняти порушення експресії PGR, тим самим змінюючи перебіг біохімічних процесів в організмі жінки і сприяючи розвитку патологічного процесу та/або впливати на перебіг останнього [12].

У 2011 р. Mei-Tsz Su показав, що гаплотип C/C, який формується при аналізі SNP rs590688 (C/G) та rs11224592 (T/C) асоціювався зі зменшенням ризику виникнення звичного невиношування вагітності ($P=0,004$). Загалом, це дослідження показало наявність зв'язку між SNPs PGR та звичним невиношуванням вагітності [15]. У цьому ж році інші дослідники показали, що у когорті латиноамериканців та європеоїдів rs500760 може впливати на ефективність прогестеронової терапії для попередження передчасних пологів у терміні гестації до 37 тиж [11]. Саме тому ці поліморфізми були обрані як найбільш перспективні в аспекті вивчення асоціації з розвитком загрозового аборт.

Метою нашої роботи було встановити асоціацію SNPs PGR rs590688 (C/G) та rs500760 (A/G) з розвитком загрозового аборт.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження був букальний епітелій 67 пацієнток з діагнозом загрозовий аборт (дослідна група). Цей діагноз встановлювали за клінічними ознаками, а саме: при наявності болю внизу живота та/або кровотечі зі статевих шляхів різного ступеня вираженості за умови відсутності структурних змін шийки матки та серцебиття у плода за даними УЗД. До контрольної групи увійшли

93 практично здорових жінок, що народили як мінімум одну здорову дитину та не мали акушерських ускладнень.

Визначення SNPs PGR проводили в 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 з будь-якого біологічного матеріалу застосовували набір реагентів NeoPrep⁵⁰ DNA «НЕОГЕН» (Україна). Метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагували із сорбенту та переносили у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. 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 проводили аналіз дискримінації алелей.

Статистичну обробку результатів застосовували у спеціалізованому пакеті SPSS версії 20.0. Відповідність розподілу генотипів закону Харді-Вайнберга була перевірена за допомогою тесту χ^2 із 1-м ступенем свободи, без використання корекції Йетса за допомогою онлайн-калькулятора (<https://thething.shinyapps.io/SNPcalc/>). Розподіл генотипів у контрольній групі відповідав закону Харді – Вайнберга. Для встановлення можливої

асоціації між досліджуваними SNPs PGR та ризиком розвитку загрозливого аборт був застосований метод χ^2 -критерію за Пірсоном. Статистично значущими результатами вважали при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування пацієнтів з загрозою аборт показало, що розподіл генотипів у цих групах за поліморфізмом PGR rs590688 суттєво відрізняється: C/C – 23,9%, C/G – 44,8%, G/G – 31,3% у пацієнтів, що мали загрозу аборт та C/C – 27,2%, C/G – 58,7%, G/G – 14,1% у контрольній групі. Використавши тест χ^2 із 2-ма ступенями свободи нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в обох групах ($P=0,03$, $\chi^2=6,956$). Аналіз розподілу алелів також відрізняє дослідну групу – частота мінорного алеля становила 0,52 (в контрольній групі - 0,43), проте різниця не є статистично достовірною (рис. 1).

Генотипування за поліморфізмом rs500760 показало, що статистично значущих відмінностей у розподілі генотипів серед хворих та практично здорових жінок виявлено не було. В дослідній групі A/A - 53,7%, A/G – 40,3%, G/G – 6%, в контрольній групі A/A- 52,2%, A/G – 44,6%, G/G – 3,3% ($P>0,05$, $\chi^2=0,917$). Аналіз розподілу алелів майже не відрізняє дослідну групу – частота мінорного алеля становила 0,261 ум.од., в контрольній групі

- 0,255 ум.од.; $P>0,05$ (рис. 2).

Це свідчить про те, що серед двох досліджуваних SNP PGR rs590688 має клінічне значення та асоціюється із розвитком загрозливого аборт.

На наступному етапі ми вирішили порівняти отримані результати з проведеними генотипуваннями в інших країнах (табл. 1, 2). Генотип G/G поліморфізму PGR rs590688, який асоціюється зі збільшенням частоти виникнення загрози аборт в нашому дослідженні, зустрічається в 5,1 раза частіше серед жінок контрольної групи порівнянно з практично здоровими жінками тайванської популяції та у 9,5 раза частіше серед жінок дослідної групи порівнянно з тайванською популяцією, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності [15]. Різниця в розподілі частоти генотипу G/G SNP PGR rs500760 порівнянно з іншими популяціями майже відсутня.

ВИСНОВКИ

Розподіл генотипів при аналізі SNP PGR rs590688 у пацієток з загрозою аборт та у практично здорових жінок суттєво відрізняється ($P<0,05$ за χ^2), що свідчить про асоціацію SNP з розвитком загрозливого аборт.

Розподіл генотипів SNP PGR rs500760 у пацієток з загрозою аборт та у практично здорових жінок не відрізняється.

Розподіл алельних варіантів досліджуваних генів має значні популяційні відмінності:

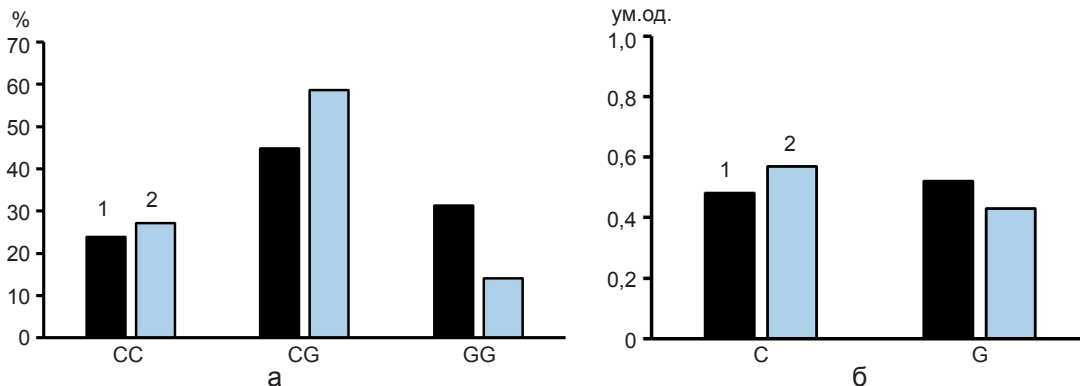


Рис. 1. Розподіл генотипів при поліморфізмі гена рецептора прогестерону rs590688 та його алелів (1 – дослідна група, 2 – контрольна група)

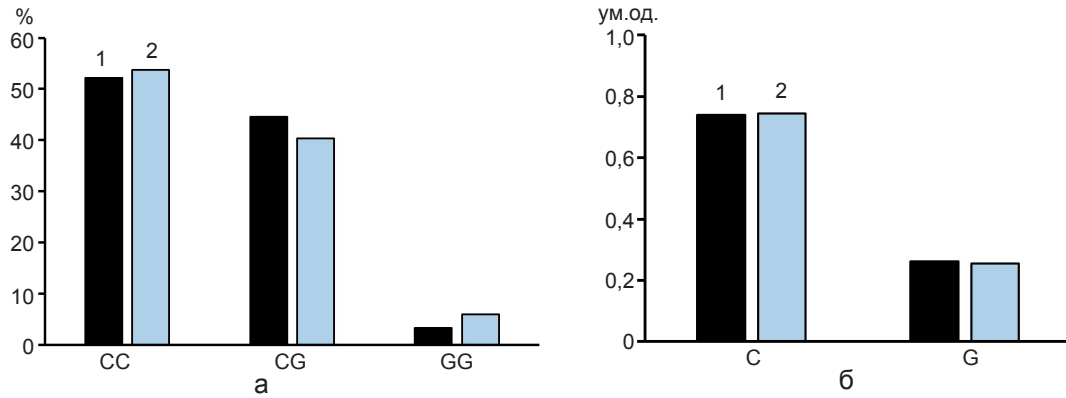


Рис. 2. Розподіл генотипів при поліморфізмі гена рецептора прогестерону rs500760 та його алелів (1 – дослідна група, 2 – контрольна група)

Таблиця 1. Розподіл різних генотипів поліморфізму гена рецептора прогестерону rs590688 у різних популяціях

Генотип	The International HarMap Project Європейська популяція (усі, n=120)	The International HarMap Project Азіати (усі, n=90)	Дослідження Su M. Тайванська Популяція (здорові жінки, n=179)	Дослідження Su M. Тайванська Популяція (хворі жінки, n=121)	Власне дослід- ження Українська популяція (здорові жін- ки, n=92)	Власне дослід- ження Українська популяція (хворі жінки, n=67)
C/C	n=30 (25%)	n=50 (55,6%)	n=123 (68,7%)	n=75 (62%)	n=25 (27,2%)	n=16 (23,9%)
C/G	n=58 (48,3%)	n=34 (37,8%)	n=45 (25,2%)	n=42 (34,7%)	n=54 (58,7%)	n=30 (44,8%)
G/G	n=32 (26,7%)	n=6 (6,7%)	n=11 (6,1%)	n=4 (3,3%)	n=13 (14,1%)	n=21 (31,3%)

Таблиця 2. Розподіл різних генотипів поліморфізму гена рецептора прогестерону rs500760 у різних популяціях

Генотип	The International HarMap Project Європейська попу- ляція (усі, n=226)	The International HarMap Project Азіати (усі, n=86)	Власне дослідження Українська популяція (здорові жінки, n=92)	Власне дослідження Українська популяція (хворі жінки, n=67)
A/A	n=129 (57%)	n=46 (53%)	n=48 (52,2%)	n=36 (53,7%)
A/G	n=81 (36%)	n=34 (40%)	n=41 (44,6%)	n=27 (40,3%)
G/G	n=16 (7%)	n=6 (7%)	n=3 (3,3%)	n=4 (6%)

частота мінорної гомозиготи G/G SNP PGR rs590688 у пацієток з загрозою абортів у нашому дослідженні майже в 10 разів вище порівнянно з жінками тайванської популяції, котрі мали ідіопатичне переривання вагітності.

Визначення мінорної гомозиготи G/G поліморфізму SNP PGR rs590688 може знайти застосування у проведенні скринінгових досліджень для формування груп підвищеного ризику розвитку загрозового абортів у жінок нашої країни.

А.С. Кривопустов¹, В.Е. Досенко²

ВАРИАНТЫ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ПРОГЕСТЕРОНА КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ УГРОЖАЮЩЕГО АБОРТА

Определение полиморфизмов гена рецептора прогестерона rs590688 C/G и rs500760 A/G проведено с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени у беременных женщин с угрозой самопроизвольного аборта (основная группа) и у практически здоровых беременных (контрольная группа). По результатам генотипирования распределение аллельных вариантов значительно отличалось при исследовании rs590688: C/C - 23,9%,

C/G - 44,8%, G/G - 31,3% у пацієнтів имевших угрозу аборт и C/C - 27,2%, C/G - 58,7%, G/G - 14,1% у пацієнтів контрольной группы ($P < 0,05$ за χ^2). Распределение аллельных вариантов полиморфизма rs500760 статистически не отличалось, в основной группе A/A - 53,7%, A/G - 40,3%, G/G - 6%, в контрольной группе A/A - 52,2%, A/G - 44,6%, G/G - 3,3% ($P > 0,05$ за χ^2). Частота минорной гомозиготы G/G полиморфизма гена рецептора прогестерона rs590688 у пацієнок с угрозой аборт в нашем исследовании почти в 10 раз выше по сравнению с женщинами тайваньской популяции, которые имели идиопатическое прерывания беременности. Полученные результаты свидетельствуют о значительных этнических различиях в частоте вариантов гена рецептора прогестерона и о наличии клинического значения у полиморфизма rs590688.

Ключевые слова: ген прогестеронового рецептора; полиморфизм; угрожающий аборт.

O.S. Kryvopustov¹, V.E. Dosenko²

PROGESTERONE RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AS GENETIC RISK FACTOR OF THREATENED ABORTION

Determination of the progesterone receptor gene polymorphisms rs590688 C/G and rs500760 A/G was provided using PCR method. To investigate the genetical precursors of threatened abortion the next groups were included: 67 patients with threatened abortion and 93 healthy persons. These allelic variants have the significantly different at rs590688 study: C/C - 23,9%, C/G - 44,8%, G/G - 31,3%, and C/C - 27,2%, C/G - 58,7%, G/G - 14,1% in the control group ($P < 0,05$ by χ^2 -test). The allelic variants of the rs500760 polymorphism did not differ statistically in the study group A/A 53,7%, A/G - 40,3%, G/G - 6% in the control group A/A - 52,2%, A/G - 44,6%, G/G - 3,3% ($P > 0,05$ by χ^2 -test). Distribution of minor homozygote G/G polymorphism rs590688 progesterone receptor gene in patients with threatened abortion in our study almost in 10 times higher in comparing with women of Taiwanese Han population, who had idiopathic recurrent pregnancy loss. The obtained data indicate significant ethnic differences in PGR and show polymorphism rs590688 clinical significance.

Keywords: progesterone receptor gene; polymorphism; threatening abortion.

¹ O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine;

² O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

REFERENCES

1. Farrell T, Owen P. The significance of extrachorionic membrane separation in threatened miscarriage. Br J

Obstet Gynaecol 1996;103:926-8.

2. Saraswat L, Bhattacharya S, Maheshwari A, Bhattacharya S. Maternal and perinatal outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester: a systematic review. BJOG. 2010;117(3):245-57.

3. Manukhin I. Gynecological endocrinology. Moscow. GEOTAR Media. 2013. [Russian].

4. Graham J, Clarke C. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocr Rev. 1997;18(4):502-19.

5. O'Brien J. Progestogen safety: implications for meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2012;40(4):486-7.

6. Al-Asmakh M. Reproductive functions of progesterone. Mid East Fertil Soc J. 2007;12(3):197-201.

7. Barda G, Ben-Haroush A, Barkat J, Malinger G, Luria O, Golan A, Bar J. Effect of vaginal progesterone, administered to prevent preterm birth, on impedance to blood flow in fetal and uterine circulation. Ultrasound Obstet Gynecol. 2010;36(6):743-8.

8. Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. J Mol Endocrinol. 2007;38(1-2):331-50.

9. Guoyang Luo, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Schatz F, Kuczynski E, Funai EF, Dulay AT, Huang ST, Buhimschi CS, Buhimschi IA, Fortunato SJ, Menon R, Lockwood CJ, Norwitz ER. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. Reprod Sci. 2008;15(2):147-55.

10. Mills AA, Yonish B, Feng L, Schomberg DW, Heine RP, Murtha AP. Characterization of progesterone receptor isoform expression in fetal membranes. Am J Obstet Gynecol. 2006;195(4):998-1003.

11. Manuck TA, Lai Y, Meis PJ, Dombrowski MP, Sibai B, Spong CY, Rouse DJ, Durmwald CP, Caritis SN, Wapner RJ, Mercer BM, Ramin SM. Progesterone receptor polymorphisms and clinical response to 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. Am J Obstet Gynecol. 2011;205(2):135.

12. Kryvopustov O, Dosenko V. Single nucleotide polymorphisms in human progesterone receptor gene and its value in miscarriage or preterm delivery. Fiziol Zh. 2015;61(2):111-19.

13. Su MT, Lin SH, Chen YC. Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2011 Dec;96(6):1435-44

14. Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;113(1):67-72.

15. Su MT, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. J Assist Reprod Genet. 2011;28(3):239-43.

16. Li Wang, Zeng Chan Wang, Cui Xie, Xiao Feng Liu, Mao Sheng Yang. Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. Reprod Sci. 2010;17(6):578-84.

Матеріал надійшов до редакції 02.06.2016