

Роль функціонального генетичного поліморфізму у виникненні синдрому гіперстимуляції яєчників при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій у пацієнток з синдромом полікістозних яєчників

В.М. Запорожан¹, В.Г. Дубініна¹, О.М. Борис²

¹Одеський національний медичний університет

²Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупіка, м. Київ

Метою даного дослідження була оцінка ролі поліморфізму генів *FSHR* і *ESR1* у детермінації виникнення СГЯ при застосуванні сучасних репродуктивних технологій у жінок із СПКЯ. Встановлено, що у жінок з СПКЯ частота генотипу SS складає 39%, SN – 48%, NN – 23% за геном *FSHR*, генотипу GG – 39%, GA – 50%, AA – 11% за геном *ESR1*. Частота СГЯ у обстежених жінок складає 31%. При сполученні гетерозиготних генотипів SN за геном *FSHR* і GA за геном *ESR1* ризик виникнення СГЯ збільшується втричі (OR=3,1, ДІ 95% (2,5; 3,6)), а за наявності сполучення гомозиготних варіантів NN за геном *FSHR* та AA за геном *ESR1* є малоімовірним. Для прогнозування і профілактики несприятливих клінічних виходів у вигляді СГЯ при застосуванні ДРТ у жінок з СПКЯ, доцільно впровадити у клінічну практику генотипування з виявленням алейних варіантів генів *FSHR* і *ESR1*.

Ключові слова: синдром полікістозних яєчників, синдром гіперстимуляції яєчників, генетичний поліморфізм, допоміжні репродуктивні технології.

Синдром гіперстимуляції яєчників (СГЯ) є ятрогенним ускладненням стимуляції яєчників, що найчастіше виникає після стимуляції овуляції під час лютеїнової фази або на ранніх термінах вагітності [1, 2]. Основними проявами СГЯ є збільшення розміру яєчників, верифіковане за допомогою методів медичної візуалізації, та больовий синдром, рідше диспепсичні прояви, гемодинамічні порушення, прояви цитолітичного та холестатичного синдрому, іноді – масивні кровотечі та тромбоемболічні ускладнення [3].

В останні роки дослідники приділяють велике значення розробленню профілактичних алгоритмів, спрямованих на зниження ризику виникнення СГЯ, а також для прогнозування та раннього виявлення даної патології [1, 2, 4, 5]. Це зумовлено тим, що поширеність СГЯ та його важких форм зростає [2]. Цей феномен пов'язаний насамперед зі значним поширенням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), насамперед екстракорпорального запліднення (ЕКЗ), протоколи якого для одержання суперовуляції передбачають застосування індукторів овуляції в дозах, що значно перевищують фізіологічні рівні [1, 2, 4].

Якщо до впровадження в медичну практику ДРТ частота СГЯ становила близько 13% для форми середньої важкості та від 0,08% до 5,0% для важких форм, то в цей час СГЯ розвивається в кожній п'ятій жінки, що одержує гонадотропіни або інші індуктори овуляції, причому в 5% з них розвиваються важкі прояви СГЯ, які вимагають невідкладного медичного втручання [1, 2].

Як фактори ризику розвитку СГЯ розглядають молодий вік, що пояснюється більшою щільністю рецепторів до гона-

дотропних гормонів і більш високим фолікулярним резервом; знижена маса тіла, наявність алергійних станів і імунологічних порушень та ін. [4].

Особливе значення мають порушення гормонального профілю і насамперед гіперандрогенні стани (ГАС), що супроводжуються хронічною гіперандрогенною ановуляцією (ХГА) і вираженими порушеннями менструального циклу (ПМЦ), а також знижують чутливість яєчника до медикаментозних впливів, що стимулюють овуляцію. Зокрема, СГЯ виникає значно частіше, ніж при інших формах ановуляції, саме при ановуляторних циклах, зумовлених СПКЯ [6]. З іншого боку, СГЯ також часто відзначається у жінок з високим рівнем естрогенів [1, 2]. Однак більшість авторів в останні роки на перше місце серед захворювань, при яких ризик розвитку СГЯ є максимальним, ставлять СПКЯ [1, 2, 6, 8, 9].

Незважаючи на численні дослідження, присвячені пошуку причин розвитку СПКЯ, на жаль, і сьогодні немає досить чіткого його визначення. Значна морфологічна, функціональна та клінічна різноманітність проявів синдрому оваріальної гіперандрогенії стала приводом для подальшого пошуку маркерів полікістозних яєчників [6, 7, 14].

Особливо перспективними у цьому плані вбачають молекулярно-генетичні маркери, насамперед, функціональний поліморфізм таких генів, як *FSHR* (ген рецептора до ФСГ) та *AR* (ген рецептора до андрогенів), *ESR1* і *ESR2* (гени α - і β -рецепторів до естрогенів), *CYP19* (ген ароматази), *CYP11A*, *CYP21*, *SHBP* тощо [10, 11]. З огляду на сучасний стан репродуктології та клінічні потреби у визначенні «оваріальної відповіді» та стимуляцію гонадотропінами найбільший інтерес для науковців і практичних лікарів є оцінка зв'язку поліморфізму *FSHR* та функціонального стану яєчників. Утім, питання генетичної схильності до розвитку СГЯ досі вивчені недостатньо, саме тому можливість його прогнозування і профілактики в пацієнток із ХГА у програмах ДРТ залишається предметом наукової дискусії.

Метою даного дослідження була оцінка ролі поліморфізму генів *FSHR* і *ESR1* у детермінації виникнення СГЯ при застосуванні сучасних репродуктивних технологій у жінок із СПКЯ

Для досягнення поставленої мети були визначені такі наукові завдання:

1. Оцінити поширеність різних алейних варіантів *FSHR* і *ESR1* у пацієнток із СПКЯ.
2. Визначити ризик виникнення СГЯ при різних генотипах.
3. Розробити клінічний алгоритм прогнозування СГЯ шляхом застосування молекулярно-генетичних технологій у жінок з СПКЯ на етапі планування репродуктивного втручання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на базі кафедри акушерства, гінекології та репродуктології УДІР НМАПО імені П.Л. Шупика, в Київському міському центрі репродуктивної та перинатальної медицини (м. Київ). Були обстежені 100 жінок з верифікованим СПКЯ. Усі пацієнтки були комплексно обстежені з дотриманням вимог наказів № 620 МОЗ України від 29.12.2003 р. “Про організацію надання стаціонарної акушерсько-гінекологічної та неонатологічної допомоги в Україні” та № 582 від 15.12.2003 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги» [12, 13], рекомендацій Роттердамського ESHRE/ASRM консенсусу з СПКЯ [14].

З метою відновлення репродуктивної функції використовували довгі протоколи стимуляції оваріальної функції за допомогою гонадотропінів Менопур та Бравель, сумарна доза яких варіювала залежно від оваріального резерву, віку та маси тіла жінки, ступеня вираженості ГАС та обсягу попередньої антиандрогенної терапії, на тлі десенситизації Декапептилом-депо. Розвиток фолікулів та їх ріст контролювали за допомогою трансвагінального УЗД щоденно. Індукцію овуляції здійснювали за допомогою введення 5000–10 000 МО хоріонічного гонадотропіну лише у жінок з не менш ніж трьома фолікулами розміром понад 18 мм у діаметрі. У подальшому в умовах операційної одержували зрілі яйцеклітини та проводили IVF або ICSI за відповідними протоколами [15].

Додатково оцінювали поліморфізм *FSHR* і *ESR2*. Геном на ДНК із зразків крові була виділена за допомогою наборів *Genomic DNA purification Kit* (Fermentas). Вимірювання концентрації ДНК проводили на флуориметрі Nanodrop. Виділе-

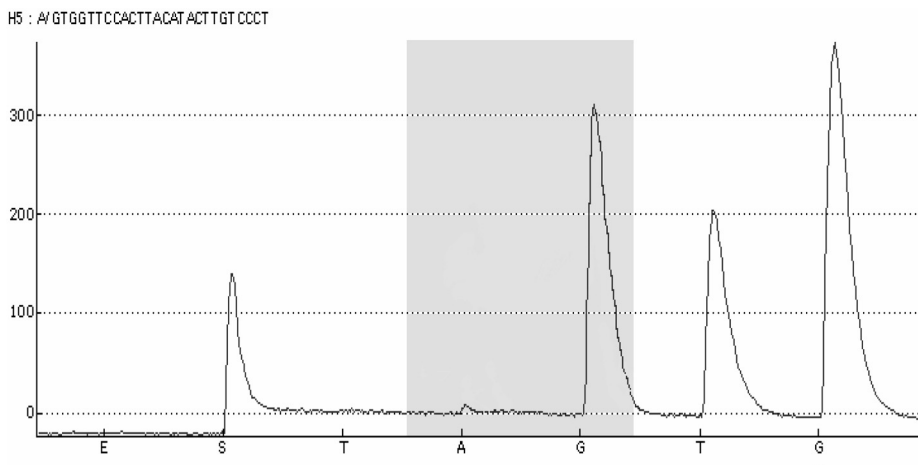
на ДНК була ампліфікована методом мультиплексної TouchDown ПЛП с HotStartTag DNA Polymerase з використанням набору *Maxima Hot Start PCR master mix* (Fermentas) і 10 пкмоль специфічних праймерів для аналізованих SNP гена *FSHR* і *ESR2*: 95 °C 15 хв, 10 циклів 95 °C – 30 с, 65 °C – 1 хв, зі зниженням температури на 1 °/цикл; 30 циклів, 95 °C – 30 с; 60 °C – 30 с, 72 °C – 45 с, 72 °C – 10 хв.

Аналіз SNP був проведений методом піросеквенування з дослідженням набору *Pyro Gold Reagents* фірми Qiagen та 7 пкмоль специфічних секвенуючих праймерів до *FSHR* і *ESR1* згідно з методикою піросеквенування (Qiagen). Аналіз поліморфізму проводили на приборі PyroMark Q96 MA. Дізайн праймерів для піросеквенування і специфічної ампліфікації rs6166 (ген *FSHR*) та rs1256049 (ген *ESR1*) виконано за допомогою програми PSQ Assay Desing. Послідовності ДНК поліморфізмів генів *FSHR* і *ESR1*, використані у даному дослідженні, визначали як Ser680 Asn (GenBank No. S73526) та g.938C>T (GenBank No. AF326912) [16, 17].

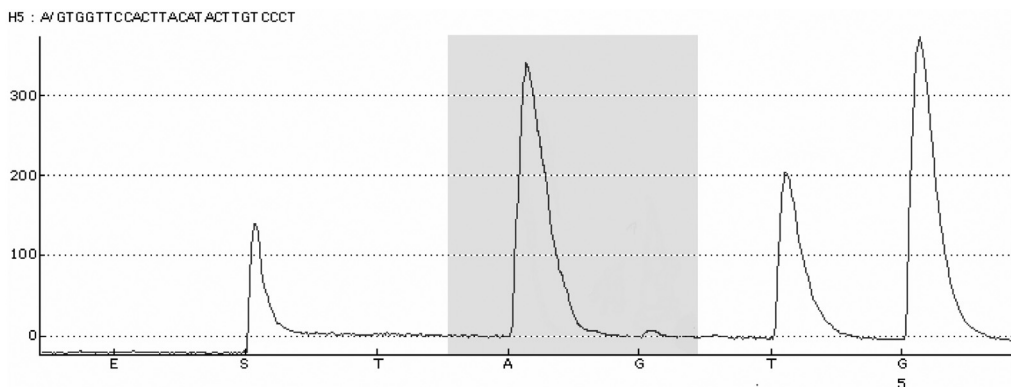
Статистичне оброблення одержаних результатів проводили непараметричними методами дисперсійного та кореляційного аналізу з використанням пакета спеціалізованих програм Statistica 7.0 (StatSoft Inc.) [18].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

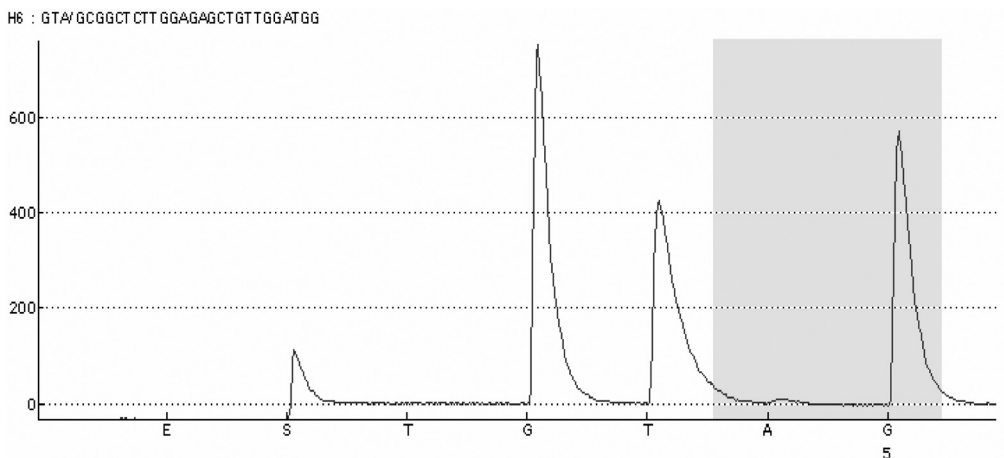
На підставі проведеного генотипування у жінок, що страждають на СПКЯ, нами були визначені такі генотипи (табл. 1): за генотипом rs6166 (*FSHR*) гомозиготні варіанти SS (мал. 1) і NN (мал. 2) та гетерозиготний варіант SN (де S – серин, N – аспарагінова кислота); за генотипом rs1256049 (*ESR1*)



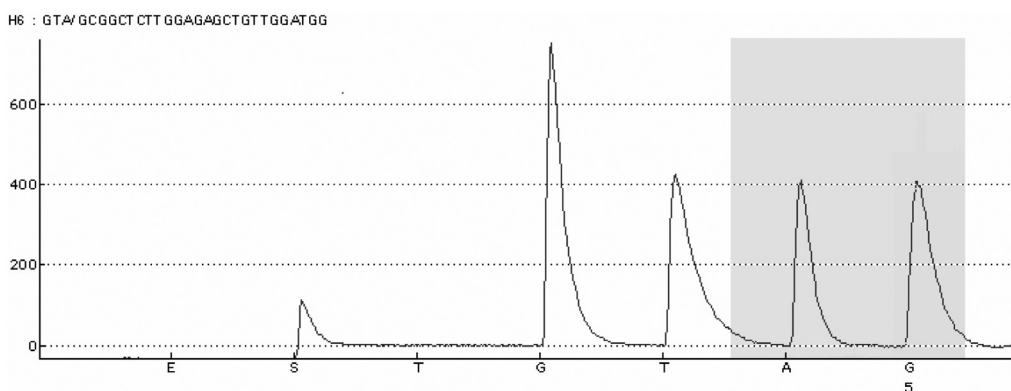
Мал. 1. GG алейний варіант поліморфізму rs 6166 (генотип SS) у гені *FSHR*



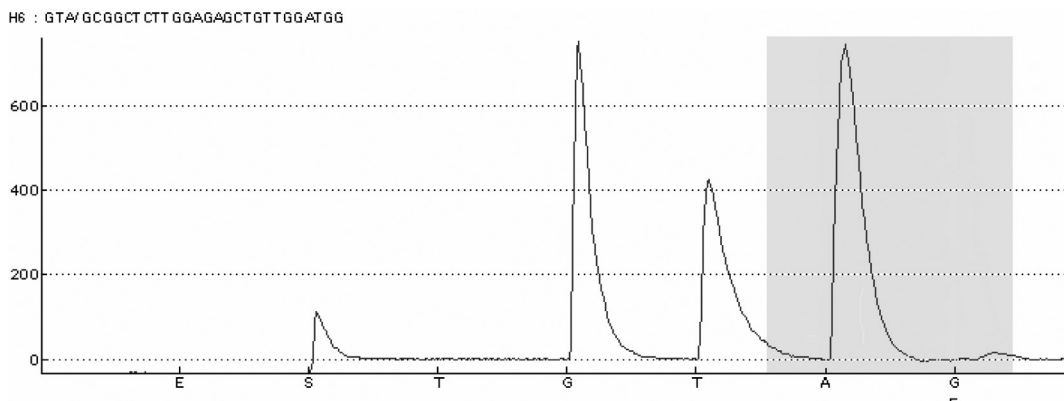
Мал. 2. AA алейний варіант поліморфізму rs 6166 (генотип NN) у гені *FSHR*



Мал. 3. GG алейний варіант поліморфізму rs 1256049 у гені ESR1



Мал. 4. GA алейний варіант поліморфізму rs 1256049 у гені ESR1



Мал. 5. AA алейний варіант поліморфізму rs 1256049 у гені ESR1

– гомозиготні варіанти GG (мал. 3) і AA (мал. 4) та гетерозиготний GA (рис. 5). Як видно з наведеної нижче табл. 1, для пацієток з СПКЯ є характерною висока частота генотипів SN і SS за геном *FSHR* та генотипів GG і GA за геном *ESR1*. Таким чином, наявність гетерозиготного стану за досліджуваними генами є певною мірою пов'язаною з розвитком СПКЯ, а генотип AA за геном *ESR1* зустрічається набагато рідше.

Ознаки СГЯ різного ступеня важкості були визначені у 31 пацієтки, в тому числі у 8 – тяжкого ступеня з вираженим больовим синдромом, УЗД-ознаками асцити, ураженням печінки у вигляді цитолітичного та холестатичного синдрому. У двох пацієток відзначали явища гемоконцентрації

(гематокрит > 45%), зниження ниркової перфузії, олігурію. Інші клінічні прояви, що реєстрували у пацієток з СГЯ – субфебрильна температура тіла, нудота, блювання, пронос, диспноє, зниження артеріального тиску.

Як свідчать результати наших досліджень, серед пацієток, у яких після застосування ДРТ виникли ознаки СГЯ, найбільш часто зустрічалися гетерозиготні генотипи SN за геном *FSHR* і GA за геном *ESR1*, при цьому гомозиготні генотипи NN за геном *FSHR* визначали відносно рідко (3 випадки або 9,7%), а варіант AA за геном *ESR1* взагалі не визначали (табл. 2). Таким чином, у разі поєднання гетерозиготних генотипів SN за геном *FSHR* і GA за геном *ESR1* ризик виникнення СГЯ збільшується втричі (OR=3,1 ДІ 95% (2,5;

Результаты генотипирования у пациенток с СПКЯ

Ген	FSHR						ESR1					
	SS		SN		NN		GG		GA		AA	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Частота	39	39,0	48	48,0	23	23,0	39	39,0	50	50,0	11*	11,0
Алель	S		N		N		G		G		A	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Частота	87	55,0	71	45,0			89*	59,3*	61*			40,7*

Примітка: * – відмінності за частотою показника є достовірними (p<0,05).

Таблица 2

Результаты генотипирования у пациенток с СГЯ, що виник на тлі застосування ДРТ

Ген	FSHR						ESR1					
	SS		SN		NN		GG		GA		AA	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Частота	5	16,1	23	74,2	3	9,7	3	9,7	28	90,3	-	-
Алель	S		N		N		G		G		A	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Частота	28	53,8	24	46,2			31	55,4	25			44,6

3,6), а за наявності сполучення гомозиготних варіантів NN за геном *FSHR* та AA за геном *ESR1* є малоймовірним. Це певною мірою збігається з даними літератури [19, 20], однак у нашому дослідженні частота гетерозиготних варіантів була більшою, ніж у інших авторів.

Наведені вище результати свідчать про те, що генетично детермінований стан рецепторного апарату яєчників є визначальним у реалізації відповіді на стимуляцію препаратами гонадотропінів, що вимагає широкого впровадження методів молекулярно-генетичних досліджень на етапі планування репродуктологічного втручання у неплідних жінок, що страждають на СПКЯ та ХГА.

ВИСНОВКИ

1. У жінок з СПКЯ частота генотипу SS складає 39,0%, SN – 48,0%, NN – 23,0% за геном *FSHR*, генотипу GG – 39,0%, GA – 50,0%, AA – 11,0% за геном *ESR1*.

2. Частота СГЯ у обстежених жінок складає 31,0%. При сполученні гетерозиготних генотипів SN за геном *FSHR* і GA за геном *ESR1* ризик виникнення СГЯ збільшується втричі (OR=3,1 ДІ 95% (2,5; 3,6)), а за наявності сполучення гомозиготних варіантів NN за геном *FSHR* та AA за геном *ESR1* є малоймовірним.

3. Для прогнозування і профілактики несприятливих клінічних виходів у вигляді СГЯ при застосуванні ДРТ у жінок з СПКЯ, доцільно впровадити у клінічну практику генотипування з виявленням алельних варіантів генів *FSHR* і *ESR1*.

Роль функционального генетического полиморфизма в возникновении синдрома гиперстимуляции яичников при применении вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с синдромом поликистозных яичников
В.Н. Запорожан, В.Г. Дубинина, О.М. Борис

Целью данного исследования была оценка роли полиморфизма генов *FSHR* и *ESR1* в детерминации возникновения СГЯ при при-

менении современных репродуктивных технологий у женщин с СПКЯ. Установлено, что у женщин с СПКЯ частота генотипа SS составляет 39%, SN – 48%, NN – 23% по гену *FSHR*, генотипа GG – 39%, GA – 50%, AA – 11% по гену *ESR1*. Частота СГЯ у обследованных женщин составляет 31%. При сочетании гетерозиготных генотипов SN по гену *FSHR* и GA по гену *ESR1* риск возникновения СГЯ повышается втрое (OR=3,1, ДІ 95% (2,5; 3,6)), а при наличии сочетания гомозиготных вариантов NN по гену *FSHR* и AA по гену *ESR1* является маловероятным. Для прогнозирования и профилактики неблагоприятных клинических выходов в виде СГЯ при применении ВРТ у женщин с СПКЯ целесообразно внедрить в клиническую практику генотипирование с выявлением алельных вариантов генов *FSHR* и *ESR1*.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, синдром гиперстимуляции яичников, генетический полиморфизм, вспомогательные репродуктивные технологии.

The role of functional genetic polymorphism in developing the ovarian hyperstimulation syndrome in the ART use amongst patients with polycystic ovarian syndrome
V.M. Zaporozhan, V.G. Dubinina, O.M. Boris

The study was aimed to assess the role of polymorphism of *FSHR* and *ESR1* genes in the determination of OHS during the use of the modern reproductive technologies amongst females with PCOS. There was stated that the frequency of SS genotype by *FSHR* is 39%, SN – 48%, NN – 23%, GG genotype by *ESR1* – 39%, GA – 50%, AA – 11% among females with PCOS. The incidence of OHS was 31.0% amongst the patients whereas the combination of heterozygote genotypes SN by *FSHR* and GA by *ESR1* increases the risk of OHS in three folds (OR=3,1 ДІ 95% (2,5; 3,6)). The combination of homozygote variants i.e. NN by *FSHR* and AA by *ESR1* makes the outcome be unlikely. For prognosis and prevention of the unfavorable clinical outcomes viz. OHS when ART is used among females with PCOS there is expediently to implement into the clinical practice genotyping with the detection of allele variants of *FSHR* and *ESR1*.

Key words: polycystic ovarian syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, genetic polymorphism, assisted reproductive technologies.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ільїн І.Є. Профілактика синдрому гіперстимуляції яєчників при екстракорпоральному заплідненні: Дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01 / І.Є. Ільїн / АМН України; Інститут педіатрії, акушерства та гінекології. – К., 2003. – 151 с.
2. Ovarian hyperstimulation syndrome. / Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. // *Fertil Steril*. 2008. – Vol. 90 (5 Suppl). – P. 188–193.
3. Thromboembolic phenomena after ovarian stimulation with human gonadotrophins / M. Mozes, H. Bogokowsky, E. Antebi. [et al.] // *Lancet*. 1965. – Vol. 2, No. 7424. – P. 1213–1215.
4. Fauser BC. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. / BC. Fauser, K. Diedrich, P. Devroey; *Evian Annual Reproduction Workshop Group 2007*. // *Hum Reprod Update*. – 2008. – Vol. 14, No 1. – P. 1–14.
5. Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). / I. Kwan, S. Bhattacharya, A. McNeil, M.M. van Rumste. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2008. – Vol. 2 – CD005289.
6. Hart R. PCOS and infertility / R. Hart // *Panminerva Med*. – 2008. – Vol. 50 (4). – P. 305–314.
7. Erel CT, Senturk LM. Is laparoscopy necessary before assisted reproductive technology? / CT Erel, LM. Senturk *Curr Opin Obstet Gynecol*. – 2005. – Vol. 17 (3). – P. 243–248.
8. Капустін Е.В. Підвищення ефективності протоколів контрольованої оваріальної гіперстимуляції в циклах екстракорпорального запліднення у жінок з ризиком формування слабкої оваріальної відповіді: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01 / Е.В. Капустін / Одеський держ. медичний ун-т. – О., 2006. – 18 с.
9. Софронова Е.В. Синдром гіперстимуляції яєчників в программе екстракорпорального оплодотворення : прогнозирование, профилактика. / Автореферат дис. ... канд. мед. наук : 14.00.01 / Е.В. Сафронова [Место защиты: Рост. гос. мед. ун-т] : Ростов-на-Дону, 2008 – 18 с.
10. Jakubowski L. Aspekty genetyczne zespołu policystycznych jajników. / L. Jakubowski // *Endokrynol Pol*. – 2005 – Vol. 56 (3). – P. 285–293.
11. Gu BH. Genetic variations of follicle stimulating hormone receptor are associated with polycystic ovary syndrome. / B.H. Gu, J.M. Park, K.H. Baek // *Int J Mol Med*. – 2010. – Vol. 26 (1). – P. 107–112.
12. Наказ МОЗУ від 15.12.2003 № 582 „Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги”. Електронний курс. Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20031215_582.html
13. Наказ від 29.12.2003 № 620 „Про організацію надання стаціонарної акушерсько-гінекологічної та неонатологічної допомоги в Україні”. Електронний курс. Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20031229_620.html
14. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. – 2004. – Vol. 81. – P. 19–25.
15. Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). / I. Kwan, S. Bhattacharya, A. McNeil, M.M. van Rumste. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2008. – Vol. 2. – CD005289.
16. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / E.W. Sayers, T. Barrett, D.A. Benson [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – Vol. 39. – P. 38–51.
17. Sambrook J., Molecular cloning: a laboratory manual. / J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis (2nd ed., 3th vol.) NY Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 253 p.
18. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
19. Association of FSH receptor and CYP19A1 gene variations with sterility and ovarian hyperstimulation syndrome. / H. Binder, R. Dittrich, I. Hager [et al.] // *Reproduction*. – 2008 – Vol. 135 (1). – P. 107–116.
20. Rizk B. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Genetics of ovarian hyperstimulation syndrome. / B. Rizk // *Reprod Biomed Online*. – 2009 – Vol. 19 (1). – P. 14–27.