

<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.5.008>
УДК 618.3



Кошулько П.А. ✉, Денисов С.Н., Ламзов С.В., Климов Н.В., Климова Т.В., Степанов А.А.,
Пырикова К.С., Кошулько Д.А., Курбанов А.А.
Рязанский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова, Рязань, Россия

Биохимические маркеры полного выкидыша (полного самопроизвольного аборта)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Кошулько П.А., Климов Н.В.; сбор и обработка материала – Пырикова К.С., Кошулько Д.А., Курбанов А.А.; статистическая обработка данных – Денисов С.Н., Ламзов С.В.; написание текста – Климова Т.В., Степанов А.А.; редактирование – Кошулько П.А., Кошулько Д.А.

Подана: 12.10.2023

Принята: 30.10.2023

Контакты: nikolconnik@gmail.com

Резюме

Цель. Разработка и применение методики определения риска возникновения патологии беременности (полного выкидыша) путем мониторинга уровня активности катепсинов в лейкоцитах крови на ранних сроках беременности.

Материалы и методы. В исследование были включены 70 беременных женщин на сроке 5–6 недель, которые были разделены на две группы. Первая группа (контрольная) состояла из 35 клинически здоровых женщин с физиологически нормальной беременностью. Вторая группа (основная) состояла из 35 женщин, у которых впоследствии произошел полный самопроизвольный аборт. У всех пациенток беременность (плодное яйцо в полости матки) была подтверждена при проведении ультразвукового исследования. Диагноз полного самопроизвольного аборта в дальнейшем был поставлен на основании отсутствия плодного яйца в полости матки по результатам ультразвукового исследования и/или обнаружения хориальной ткани в гистологическом анализе. Для измерения уровня активности катепсинов использовались биохимические наборы, и полученные данные были оценены спектрофлуориметрическими методами.

Результаты. Результаты исследования показали, что новый метод ранней диагностики полного выкидыша обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Заключение. Исследование подтвердило, что катепсины являются маркерами полного самопроизвольного аборта, и была разработана методика ранней диагностики и прогнозирования данной патологии беременности до ее клинических проявлений и исхода беременности.

Ключевые слова: катепсины D, G, протеазы, полный самопроизвольный аборт, невынашивание беременности, полный выкидыш

Koshulko P. ✉, Denisov S., Lamzov S., Klimov N., Klimova T., Stepanov A., Pyrikova K.,
Koshulko D., Kurbanov A.

Ryazan State Medical University named after acad. I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

Biochemical Markers of Complete Miscarriage (Complete Spontaneous Abortion)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design – Koshulko P., Klimov N.; collection and processing of material – Pyrikova K., Koshulko D., Kurbanov A.; statistical data processing – Denisov S., Lamzov S.; text writing – Klimova T., Stepanov A.; editing – Koshulko P., Koshulko D.

Submitted: 12.10.2023

Accepted: 30.10.2023

Contacts: nikolconnik@gmail.com

Abstract

Purpose. Development and application of a method for determining the risk of pregnancy pathology (complete miscarriage) by monitoring the level of cathepsin activity in blood leukocytes in early pregnancy.

Materials and methods. The study included 70 pregnant women at 5–6 weeks, who were divided into two groups. The first group (control) consisted of 35 clinically healthy women with a physiologically normal pregnancy. The second group (main) consisted of 35 women who subsequently had a complete spontaneous abortion. In all patients, pregnancy (fertilized egg in the uterine cavity) was confirmed by ultrasound examination. The diagnosis of complete spontaneous abortion was subsequently made based on the absence of the fertilized egg in the uterine cavity according to the results of ultrasound examination and/or detection of chorionic tissue in histological analysis. Biochemical kits were used to measure cathepsin activity levels and the data obtained were assessed by spectrofluorimetric methods.

Results. The results of the study showed that the new method for early diagnosis of complete miscarriage has high sensitivity and specificity.

Conclusion. The study confirmed that cathepsins are markers of complete spontaneous abortion, and a method for early diagnosis and prediction of this pregnancy pathology was developed before its clinical manifestations and pregnancy outcome.

Keywords: cathepsins D, G, proteases, complete spontaneous abortion, pregnancy loss, complete miscarriage

■ ВВЕДЕНИЕ

Полный выкидыш (полный самопроизвольный аборт) – распространенное осложнение беременности, которое характеризуется прерыванием беременности до 22-й недели с выходом из матки всех плодных оболочек и плода [1–4]. В мировой практике полный выкидыш встречается у 10–15% беременных женщин и может быть вызван множеством факторов, таких как генетические аномалии, воспалительные процессы, эндокринные нарушения и другие причины [5–8].

Для диагностики полного выкидыша используются различные методы, включая ультразвуковое исследование и биохимические анализы крови, но в настоящее время нет возможности диагностики данной патологии до клинических проявлений и непосредственно исхода беременности. Поэтому в последние годы особое внимание уделяется поиску биохимических маркеров, которые могут помочь в ранней диагностике и прогнозировании этого осложнения беременности [9–12]. В данной статье мы рассмотрим биохимические маркеры, которые могут быть использованы для диагностики полного выкидыша, и их клиническую значимость [13–15].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и применение методики определения риска возникновения патологии беременности (полного выкидыша) путем мониторинга уровня активности катепсинов в лейкоцитах крови на ранних сроках беременности.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 35 здоровых беременных женщин с нормальным течением беременности (контрольная группа) и 35 пациенток в возрасте от 18 до 36 лет, которые были госпитализированы из-за угрозы прерывания беременности на сроке 5–6 недель. В результате у 32 пациенток из группы с угрозой аборта произошел полный самопроизвольный аборт.

Пациентки с нежеланной беременностью, декомпенсированными заболеваниями, инфекционными или аутоиммунными заболеваниями, а также те, кто не дал добровольное информированное согласие на участие, были исключены из кандидатов на участие в группах исследования.

У всех пациенток, включенных в исследование, беременность (плодное яйцо в полости матки) была подтверждена при проведении ультразвукового исследования. Диагноз полного выкидыша у пациенток из основной группы был установлен на основании отсутствия плодного яйца в полости матки по результатам ультразвукового исследования и/или обнаружения хориальной ткани в гистологическом анализе.

Ультразвуковое исследование и взятие образцов крови производились на базе двух учреждений: государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 8» и Городского клинического родильного дома № 1. Дальнейший анализ образцов крови и определение активности протеаз проводились на базе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

В качестве материала для исследования использовались лейкоциты периферической крови. Получение лейкоцитов периферической крови производилось путем венопункции (утром натощак) в стерильные вакуумные пробирки. Кровь центрифугировали в течение 30 минут при 1800 g (ELMI, CM-6M, Латвия) для отделения плазмы крови. Далее, после разморозки образцов, в пробирку вносили фиколл-урографин (БелкиАнтителаРФ) из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови и центрифугировали в течение 30 минут при 1800 g. В результате центрифугирования кровь разделяется на 4 отдельные фракции: первая фракция на дне пробирки содержит эритроциты и обломки клеток крови; вторая – это раствор фиколл-урографина; третья, расположенная над градиентом, – суспензия

лимфоидных клеток; четвертая – образована плазмой с тромбоцитами. Далее в стерильных условиях пипеткой с границы раздела плотности отбирали фракцию лейкоцитов. Полученные клетки ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH=7,2 (БелкиАнтителаРФ) и центрифугировали в течение 15 минут при 1800 g. Отмывку клеток проводили трижды. Для определения активности и количества протеаз использовались коммерческие наборы фирмы AssayGenie (Ирландия). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США) [16].

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью лицензионного пакета программ Statistica. Оценка же характера распределения данных производилась при помощи критериев Шапиро – Уилка. Оценка этих критериев позволила установить нормальное распределение наших данных. Полученные данные были представлены в виде средней квадратической ошибки (m) и среднего значения (M). Для определения статистической значимости различий между сравниваемыми показателями пользовались критериями Стьюдента (t-критерий) для независимых выборок. В дальнейшем результаты оценивались как статистически значимые при $p<0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентки, включенные в исследование, не имели значимых различий по возрасту, соматической заболеваемости ($p>0,05$). У 3 пациенток из группы с полным самопроизвольным выкидышем беременность удалось сохранить, несмотря на то что уровни активности катепсинов находились в пределах показателей данной патологии, что отражено в табл. 1. По нашему мнению, это может быть связано с эффективностью проводимого лечения.

При анализе полученных результатов было выявлено, что активность катепсина D выше, чем активность катепсина G, и объясняется это тем, что катепсин D является самым активным представителем катепсинов, а следовательно, самым первым вступает в любые реакции, что представлено в табл. 2.

Таблица 1
Количество случаев полного выкидыша в зависимости от показателя
Table 1
Number of cases of complete miscarriage depending on the indicator

Показатель	Полный выкидыш подтвержден по уровню катепсинов и случился в исходе	Полный выкидыш не подтвержден по уровню катепсинов, но случился в исходе
Катепсин D	32 (91,43%)	3 (8,57%)
Катепсин G	32 (91,43%)	3 (8,57%)

Таблица 2
Показатели активности катепсинов D и G при полном самопроизвольном аборте
Table 2
Indicators of activity of cathepsins D and G during complete spontaneous abortion

Показатель	Минимальная активность	Максимальная активность
Катепсин D (ед. фл/секхмг белка)	110863,7	120 564
Катепсин G (нмоль/секхмг белка)	0,79	0,89



Таблица 3
Значения коэффициентов регрессии β и факторов риска полного самопроизвольного аборта
Table 3
Values of regression coefficients β and risk factors for complete spontaneous abortion

N=35	B_0	Катепсин D	Катепсин G	ИЦН в анамнезе
Коэффициент регрессии	-785,540	0,004	379,059	3,621
p-значение	0,00001	0,005	0,001	0,003

На основании полученных данных была создана математическая модель, которая использует исследуемые параметры пациенток и метод логистической регрессии для диагностики вероятности возникновения полного самопроизвольного аборта. В процессе моделирования были определены β -стандартизированный коэффициент регрессии и его доверительная вероятность p . Сначала были удалены факторы, которые не оказывают прогностического влияния на модель на первом этапе построения. Затем на втором этапе были выбраны статистически значимые факторы, частота которых у пациенток с полным самопроизвольным абортом была выше, чем в группе контроля, – табл. 3.

Для оценки приемлемости полученной регрессионной модели в целом был проведен дисперсионный анализ (анализ дисперсии ANOVA). Вышло, что $p > 0,05$, следовательно, наша модель приемлема.

Расчет прогнозирования возникновения неполного самопроизвольного аборта осуществлялся по формуле:

$$p = 1 / (1 + e^{-y}), y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3,$$

где p – вероятность возникновения полного самопроизвольного аборта;
 b_0, b_1, b_2, b_3 – коэффициенты регрессии;
 x_1, x_2, x_3 – значения предикторов в номинальной, порядковой или количественной шкале.

Финальный вариант формулы: $P = 1 / (1 + e^{-(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2)})$.

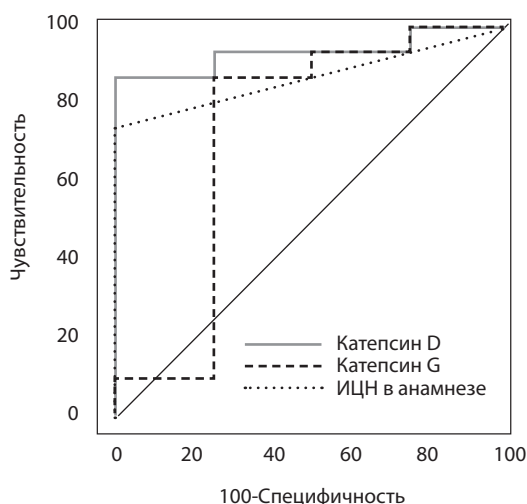
Базовые параметры прогностической модели: коэффициент регрессии $B - 785,540$; $p < 0,000$; $\text{Exp } B - 0,001$.

Эффективность прогностической модели оценивали с помощью построения ROC-кривой. Показатель AUC (площадь под кривой) является надежным показателем качества полученной модели, что представлено в табл. 4.

Исходя из полученных результатов, для переменной катепсина D были зафиксированы чувствительность и специфичность на уровне 87,1% и 100% соответственно.

Таблица 4
Площадь ROC-кривой при полном самопроизвольном аборте
Table 4
Area of the ROC curve for complete spontaneous abortion

Тестовая переменная	Площадь
Катепсин D	0,935
Катепсин G	0,726
ИЦН в анамнезе	0,871



ROC-кривая диагностической модели полного самопроизвольного аборта
ROC curve of the diagnostic model of complete spontaneous abortion

Для переменной катепсина G эти показатели составили 87,1% и 75% соответственно, ИЦН в анамнезе – 74,2% и 100% соответственно – см. рисунок.

Значение cut-off 0,5 показывает положительную прогностическую значимость модели при повышении данной величины (порогового значения).

Определение степени риска (высокая, низкая) подводит нас к персонифицированной тактике для каждой конкретной пациентки:

- при высокой степени (cut-off >0,05) требуется госпитализация в условия экстренного гинекологического стационара, начало профилактических и лечебных мероприятий даже при отсутствии клинических симптомов на момент госпитализации;
- при низкой степени (cut-off <0,05) требуется начало профилактических мероприятий, направленных на сохранение беременности, а также повторный анализ уровня активности катепсинов лейкоцитов крови через 7 дней. При отсутствии роста уровня активности катепсинов повторный анализ и продолжение профилактических мероприятий не требуются. При наличии же роста уровня активности катепсинов в повторном анализе требуется продолжить профилактические мероприятия, а при переходе из низкой вероятности в высокую – госпитализация в условия экстренного гинекологического стационара и начало лечебных мероприятий, даже при отсутствии клинической картины данной патологии беременности. При наличии клинических симптомов, характерных для патологии беременности, но при низкой вероятности ее возникновения по результатам исследования также требуется госпитализация в гинекологический стационар и своевременное начало лечебных мероприятий.

Работоспособность заявленного метода подтверждается следующими клиническими примерами.



Пример 1. Пациентка К. 27 лет с полным самопроизвольным абортom и ИЦН в анамнезе. В сроке 5–6 недель определили в лейкоцитах крови активность катепсина D – 118325,8 ед. фл/секхмг белка, катепсина G – 0,835 нмоль/секхмг белка, произвели расчет по формуле, получили результат $p=0,99$. Женщина была госпитализирована в стационар, наблюдалась и получала терапию в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи. Беременность завершилась полным самопроизвольным абортom.

Пример 2. Пациентка К. 30 лет с полным самопроизвольным абортom в анамнезе. В сроке 5–6 недель определили в лейкоцитах крови активность катепсина D – 113535,31 ед. фл/секхмг белка, катепсина G – 0,872 нмоль/секхмг белка, произвели расчет по формуле, получили результат $p=0,01$. Беременность завершилась родами.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что катепсины являются маркерами исследуемой нами патологии, а уровень активности катепсинов может быть использован в качестве маркера для прогнозирования и ранней диагностики полного самопроизвольного аборта. Это обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью используемых нами методов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Udonova T.A., Gavryuk S.A., Bordinova Z.S., Petrushova O.P. Activity of cathepsin D in placenta with mild gestosis. *Izvestiya GPGU*. 2008;10(6):23–34. Available at: <https://ziplink.me/s/SW7c2T43>. (in Russian)
2. Koshulko P.A., Kovalenko M.S., Abalenikhina Y.V., Mirov A.I., Golofast O.E., Rokunov E.D. Biochemical markers of non-developing pregnancy. *Problems of reproduction*. 2021;27(6):138–142. Available at: <https://doi.org/10.17116/repro202127061138>. (in Russian)
3. Vovchuk I.L. Activity of cathepsin-L-like proteases in the tissues and neoplasms of the ovaries of women. *Visnik ONU*. 2018;12(5):31–44. Available at: <https://ziplink.me/s/SW7gtK1m>. (in Russian)
4. Chulkova S.V., Bocharova O.A., Klimenkov A.A., Karpova R.V., Benevsky A.I. The possibility of increasing the effectiveness of complex treatment of advanced gastric cancer with phytoadaptogen. *Russian Biotherapeutic journal*. 2018;3(2):85–91. Available at: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-2-78-87>. (in Russian)
5. Vartanyan E.V., Martyshkina E.Y., Tsaturova K.A. The role of combined pathology in unsuccessful protocols. *Obstetrics, gynecology, reproduction*. 2019;5(4):40–43. Available at: <https://ziplink.me/s/SWE28zrH>. (in Russian)
6. Ishtulin A.F., Korotkova N.V., Karpov E.I., Minaev I.V., Polyakova P.M. The relationship of cathepsin L activity with sperm motility in patients with chronic prostatitis. *Innovative technologies in medicine: the view of a young specialist*. 2021;3(4):96–97. Available at: <https://clinic.rzgm.ru/images/upload/users/sc/Sbornik%2007.10.2021.pdf>. (in Russian)
7. Kostyuchenko L.N., Varvanina G.G., Mikhailyats G.S., Danilov M.A. The choice of tactics of combined treatment of patients with malignant oncological diseases of the colon. *Medical Alphabet*. 2021;20(2):25–28. Available at: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-20-25-28>. (in Russian)
8. Varvanina G.G., Kostyuchenko L.N. Metabolic disorders in lysosomes in oncopathology as a marker of nutritional prognosis. *Medical Alphabet*. 2021;19(6):19–22. Available at: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-6-19-22>. (in Russian)
9. Gerasimov A.M., Borzova N.Yu., Kerimkulova N.V. Prognostic value of cathepsin D activity in the endometrium in peritoneal endometriosis. *Questions of gynecology, obstetrics and perinatology*. 2018;7(4):40–43. Available at: <https://ziplink.me/s/SWE3dL56>. (in Russian)
10. Franzants E.M., Soldatkina N.V., Orlovskaya L.A., Dashkov A.V. Hydrolytic activity of breast tumor tissue and its perifocal zone in various variants of cancer course. *Journal of tumors of the female reproductive system*. 2017;3(4):3–12. Available at: <https://ziplink.me/s/SWE56Jq6>. (in Russian)
11. Donenko F.V. Factors influencing tumor growth and approaches to non-cytotoxic method of its treatment. *Alternative opinion. Oncogynecology*. 2021;4(40):4–17. Available at: https://doi.org/10.52313/22278710_2021_4_4. (in Russian)
12. Dubrovina S.O., Mutsalkhanova Y.S. Early prognostic markers of preeclampsia. *Gynecology*. 2016;18(5):4–15. Available at: http://elib.usma.ru/bitstream/usma/13359/1/UJM_2016_144_11_005.pdf. (in Russian)
13. Yelnikova O.A. Features of biochemical parameters in deceased pregnancy. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2020;3(1):5–14. Available at: <https://doi.org/10.24412/2220-7880-2023-2-63-69>. (in Russian)
14. Zinovkina V.Y., Glinkaya T.N., Grynchak V.A. Features of structural and functional changes in the lysis-somal system of hepatocytes in cholestatic liver lesions in a toxicological experiment. *BSMU is at the forefront of medical science and practice*. 2021;1(3):448–454. Available at: <http://rep.bsmu.by/bitstream/handle/BSMU/33720/73.pdf>. (in Russian)
15. Koshulko P.A., Kovalenko M.S., Krotkova N.V. Cathepsins as markers of malignant neoplasms of the mammary glands. *Eruditio Juvenium*. 2019;7(2):301–306. Available at: <https://doi.org/10.23888/HMJ201972301-306>. (in Russian)
16. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry*. 1976;7(72):248–254.