

УДК 575.174.015.3

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ И КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Куцын К. А., Коваленко К. А., Машкина Е. В., Шкурат Т. П.

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия (344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1), e-mail: lenmash@mail.ru

В данной работе были исследованы частоты полиморфных вариантов генов системы репарации (*APEX 1*, *ERCC2 (XPD)*) и контроля клеточного цикла (*CHEK2*) в образцах хориона и крови у женщин с невынашиванием беременности по следующим генным полиморфизмам: *APEX1 Asp148Glu*, *ERCC2 Lys751Gln*, *CHEK2 1100delC*. При анализе образцов крови статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по исследуемым полиморфизмам не выявлено. При анализе образцов хориона выявлены достоверные различия в частоте встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *1100delC* гена *CHEK2* между контрольной группой и образцами хориона, полученными при неразвивающейся беременности ( $\chi^2=4,15$ ,  $P=0,04$ ). В случае спонтанного аборта наблюдается заметное снижение доли гомозигот по нормальным аллелям генов *XPD* и *CHEK2* и увеличение доли гомозигот по исследуемому полиморфизму ( $\chi^2=6,05$ ,  $P=0,05$  и  $\chi^2=7,13$ ,  $P=0,03$ , соответственно) по сравнению с контрольной группой. Также между данными группами выявлены статистически значимые различия в частоте встречаемости аллелей генов *XPD* ( $\chi^2=3,84$ ,  $P=0,05$ ) и *CHEK2* ( $\chi^2=8,55$ ,  $P=0,003$ ). Согласно рассчитанным коэффициентам соотношения шансов OR, наличие полиморфных вариантов генов системы репарации увеличивает вероятность повторного развития невынашивания беременности.

Ключевые слова: невынашивание беременности, генный полиморфизм, система репарации, контроль клеточного цикла.

## MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF REPAIR AND CELL CYCLE CONTROL SYSTEMS' GENE POLYMORPHISMS FOR MISCARRIAGE

Kutsyn K. A., Kovalenko K. A., Mashkina E. V., Shkurat T. P.

Southern federal university, Rostov-on-Don, Russia (344006, av. Stachki 194/1, Rostov-on-Don) e-mail: lenmash@mail.ru

In this study we assessed the association of repair (*APEX 1*, *ERCC2 (XPD)*) and cell cycle control system (*CHEK2*) gene variants in chorion and blood samples from females with the miscarriage. The following polymorphic alleles were tested: *APEX1 Asp148Glu*, *ERCC2 Lys751Gln*, *CHEK2 1100delC*. During assay of the blood samples genotype and gene variant frequency analysis did not reveal any significant difference between controls and spontaneous abortion group. During analysis of the chorionic samples significant difference in genotype and gene variant frequency for *1100delC* polymorphism of *CHEK2* gene was unraveled between controls and undeveloping pregnancy group ( $\chi^2=4,15$ ,  $P=0,04$ ). In the spontaneous abortion group decreasing of part of normal homozygotes for *ERCC2 Lys751Gln* and *CHEK 2 1100delC* polymorphisms and increasing of part of Gln/Gln and -/- occurs in comparison with controls ( $\chi^2=6,05$ ,  $P=0,05$  and  $\chi^2=7,13$ ,  $P=0,03$ , respectively). Also significant differences in *ERCC2 Lys751Gln* and *1100delC CHEK2* gene variants frequency were revealed between control and undeveloping pregnancy groups ( $\chi^2=3,84$ ,  $P=0,05$  and  $\chi^2=8,55$ ,  $P=0,003$ ). Our results suggest that the presence of the polymorphic variants of repair system genes in the genotype lead to the spontaneous abortion susceptibility.

Key words: miscarriage, gene variants, repair system, cell cycle control.

### Введение

Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в профилактике и лечении невынашивания беременности, частота данной патологии остается стабильной и достаточно высокой. Так, по данным литературы, она составляет от 2 до 55 %, достигая в первом триместре 80 % [1]. Различные виды самопроизвольных абортов (от неразвивающейся

беременности до привычного невынашивания беременности) рассматриваются в качестве мультифакториальных заболеваний [2, 10].

На сегодняшний день в клиническую практику входит анализ потенциальных факторов риска выкидыша: отцовские хромосомные аномалии, материнские тромбофлебические, анатомические, эндокринные и иммунологические заболевания [4, 5, 12]. На данный момент исследован аллельный полиморфизм более 90 генов, относящихся к геной сети патологии беременности. В последнее время внимание сфокусировано на изучении генов, специфичных для функционирования плаценты (*PAPPA*, *IGF-2*, *STAT3*). Однако все накопленные на сегодняшний день данные о генетической составляющей генеза патологии беременности весьма противоречивы [10].

Аллельный полиморфизм генов системы репарации и контроля клеточного цикла подробно рассмотрен при изучении этиологии и патогенеза различных раковых заболеваний, в то же время вовлеченность полиморфизмов данных генов в развитие патологии беременности практически не исследована [9, 10, 11]. Имеются данные о связи между мутациями С-концевого мотива и участка, ответственного за его хеликазную активность *XPB*, и развитием плацентарной недостаточности и риском возникновения других осложнений беременности (таких как преэклампсия, синдром *HELLP*, повышенный уровень ХГЧ в сыворотке крови матери). Это связано с изменением связывания *XPB* с *cdk*-активирующей киназой и р44 субъединицей транскрипционного фактора (*TF*) *III*, что приводит к ослаблению функциональной активности последнего. *CDK7* субъединица данного транскрипционного фактора фосфорилирует ядерные рецепторы, что приводит к лиганд-зависимому контролю активации генов гормонального ответа, необходимому для нормального развития плаценты. При наличии мутаций в гене *XPB* происходит нарушение белок-белковых взаимодействий с *TFIII* и его мишенями, необходимых для функционирования плаценты [8, 10].

Целью настоящей работы являлось изучение частот полиморфных вариантов генов системы репарации ДНК, в том числе полиморфизма *Asp148Glu* гена *APEX1* (MIM\*107748), *Lys751Gln* гена *ERCC2* (*XPB*) (MIM\*126340) и *del1100C* гена *CHEK2* (MIM+604373) у женщин с физиологическим и патологическим течением ранних сроков беременности.

#### **Материал и методы исследования**

Материалом для исследования полиморфизмов генов системы репарации и контроля клеточного цикла послужили образцы ДНК, полученные из лейкоцитов периферической крови беременных женщин, а также из хорионической ткани, полученной при медицинском аборте или при спонтанном аборте раннего срока. В контрольную группу были отнесены женщины с физиологически протекавшей беременностью, решившие ее прервать на сроке 6

– 12 недель (24 образца хориона и 32 образца крови). Группу сравнения составили женщины с патологическим течением беременности: неразвивающаяся беременность (18 образцов хориона и 22 образца крови) или спонтанный аборт (14 образцов хориона и 23 образца крови). У женщин, включенных в исследуемые группы, были исключены анатомические и гормональные аномалии. Все женщины подписали информированное согласие об участии в исследовании.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови проводили термокоагуляционным методом («ДНК-экспресс-кровь», Литех). Для выделения ДНК из тканей использовали фенол-хлороформный метод. Полиморфизмы генов *APEX1*, *ERCC2 (XPD)* и *CHEK2* анализировали с использованием набора реагентов *SNP-экспресс* (Литех, Москва).

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе GelDoc (BioRad).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета MS Excel. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга определяли по стандартным формулам. Для всех исследуемых аллелей выявлено соответствие равновесию Харди – Вайнберга. Оценку различий в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию  $\chi^2$  при помощи программы BIOSTAT. Расчет OR проводили с помощью программы GraphPadInStat3.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Ни в одном из исследуемых образцов ДНК, полученных из лейкоцитов периферической крови женщин, не выявлено делеции по гену *CHEK2*.

Анализ частот генотипов в образцах крови по полиморфизму *Asp148Glu* гена *APEX1* показал, что как в контрольной группе, так и в группе с невынашиванием беременности преобладают гетерозиготные носители данного полиморфизма (табл. 1). Около трети женщин в контрольной группе и в группе со спонтанным абортом являются гомозиготами по полиморфному варианту гена апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы.

Подобный характер распределения частот генотипов и аллелей выявлен и для полиморфизма *Lys751Gln* гена *ERCC2* (табл. 1). Статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по полиморфизмам исследуемых двух генов между контрольной группой и группами женщин со спонтанным абортом или неразвивающейся беременностью выявлено не было.

**Таблица 1. Частота генотипов (%) и аллелей генов *APE1* и *XPD* в образцах крови беременных женщин**

Ген, полиморфизм	Контроль (МА)	Патология беременности			
		СА, абс.(%)	$\chi^2_1$ (P)	НБ, абс. (%)	$\chi^2_1$ (P)
<i>APEX1 Asp148Glu</i>					
<i>Asp/Asp</i>	7 (21,9%)	5 (21,7%)	0,09 (0,96)	5 (22,7%)	0,5 (0,78)
<i>Asp/Glu</i>	15 (46,85%)	10 (43,5%)		12 (54,5%)	
<i>Glu/Glu</i>	10 (31,25%)	8 (34,8%)		5 (22,7%)	
Частота аллели 148 <i>Glu</i>	0,55	0,57		0,5	
$\chi^2_2$ (P)		0,04 (0,85)		0,23 (0,63)	
<i>ERCC2 (XPD) Lys751Gln</i>					
<i>Lys/Lys</i>	4 (12,5%)	5 (21,7%)	1,2 (0,55)	6 (27,3%)	2,08 (0,35)
<i>Lys/Gln</i>	21 (59,4%)	12 (52,2%)		11 (50%)	
<i>Gln/Gln</i>	7 (28,1%)	6 (26,1%)		5 (22,7%)	
Частота аллели 751 <i>Gln</i>	0,55	0,52		0,48	
$\chi^2_2$ (P)		0,07 (0,79)		0,51 (0,48)	

Примечание: МА – медицинский аборт; СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность;  $\chi^2_1$  – сравнение частот генотипов с контролем;  $\chi^2_2$  – сравнение частот аллелей с контролем.

Анализ частот генотипов в образцах хориона по полиморфизмам *Asp148Glu* и *Lys751Gln* генов *APEX1* и *ERCC2*, соответственно, показал, что как в контрольной группе, так и в группе невынашивания беременности преобладают гетерозиготные носители исследуемых полиморфизмов, в то время как по полиморфизму *1100delC* гена *CHEK2* преобладают гомозиготы по нормальной аллели (табл. 2).

В группе женщин с неразвивающейся беременностью в образцах хориона не выявлено гомозигот по нормальной аллели *Asp148* гена *APEX1*, в то время как доля гетерозигот и *148Glu/Glu* гомозигот повышена. Однако данные различия статистически не значимы. Характер распределения частот генотипов по полиморфизму *Lys751Gln* гена *ERCC2* в хорионической ткани при неразвивающейся беременности не отличается от такового для контрольной группы (табл. 2).

В то же время в образцах хорионической ткани, полученных после спонтанных абортов, почти в 7 раз выше частота гомозигот по полиморфизму *Lys751Gln* гена *ERCC2* по сравнению с контролем (OR составил 9,2 при 95 % CI 0,91 – 93,0). При этом наблюдается заметное снижение доли гомозигот по нормальной аллели (табл. 2). Гомозиготы *Lys/Lys751*

по гену *ERCC2* имеют сниженный риск развития спонтанного аборта (OR=0,04, 95 % CI: 0,002-0,7, P=0,03).

Анализ частот встречаемости генотипов и аллелей по полиморфизму *1100delC* гена *CHEK2* показал, что среди образцов хорионической ткани, полученных от женщин с патологией беременности первого триместра, выявляются гетерозиготные по делеции данного гена (табл. 2). Распределение частот аллелей по данному полиморфизму при обеих патологиях ранних сроков беременности статистически значимо отличается от контроля (табл. 2). У гетерозигот по данной делеции повторный риск спонтанного аборта составил 13,7 (при 95 % CI 0,66 – 286,9).

Таблица 2. Частота генотипов (%) и аллелей генов *APE1* и *XPB* в образцах хориона

Ген, полиморфизм	Контроль (МА)	Патология беременности			
		НБ, абс. (%)	$\chi^2_1$ (P)	СА, абс. (%)	$\chi^2_1$ (P)
<i>APE1 Asp148Glu</i>					
<i>Asp/Asp</i>	4 (16,7%)	0	3,64 (0,16)	1 (7,1%)	0,82 (0,66)
<i>Asp/Glu</i>	16 (66,7%)	13 (72,2%)		11 (78,6%)	
<i>Glu/Glu</i>	4 (16,7%)	5 (27,8%)		2 (14,3%)	
Частота аллели <i>148Glu</i>	0,5	0,64		0,54	
$\chi^2_2$ (P)		1,61 (0,2)		0,09 (0,76)	
<i>ERCC2 (XPB) Lys751Gln</i>					
<i>Lys/Lys</i>	7 (29,2%)	4 (22,2%)	0,28 (0,87)	1 (7,1%)	<b>6,05</b> <b>(0,05)</b>
<i>Lys/Gln</i>	16 (66,7%)	13 (72,2%)		9 (64,3%)	
<i>Gln/Gln</i>	1 (4,2%)	1 (5,6%)		4 (28,6%)	
Частота аллели <i>751Gln</i>	0,38	0,42		0,6	
$\chi^2_2$ (P)		0,15 (0,7)		<b>3,84 (0,05)</b>	
<i>CHEK2 del 1100C</i>					
<i>C/C</i>	24 (100%)	15 (83,3%)	4,31 (0,12)	11 (73,3%)	<b>7,13</b> <b>(0,03)</b>
<i>C/del</i>	0	3 (16,7%)		3 (20%)	
<i>del/del</i>	0	0		1 (6,7%)	
Частота аллели <i>del1100C</i>	0	0,08		0,17	
$\chi^2_2$ (P)		<b>4,15 (0,04)</b>		<b>8,55 (0,003)</b>	

Примечание: МА – медицинский аборт; СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность;  $\chi^2_1$  – сравнение частот генотипов с контролем;  $\chi^2_2$  – сравнение частот аллелей с контролем.

Таким образом, при анализе полученных данных установлено, что наличие определенных генотипов по полиморфным локусам генов системы репарации ДНК может оказать влияние на предрасположенность к репродуктивной патологии. К тому же, согласно рассчитанным коэффициентам соотношения шансов OR, наличие полиморфных вариантов некоторых генов системы репарации увеличивает риск повторного развития рассматриваемой нами патологии.

В течение первого триместра беременности происходит активное деление как фетальных (цитотрофобласт, плазмодиотрофобласт, первичная мезодерма), так и материнских клеток (децидуальные клетки), при этом неизбежно возникновение ошибок, которые в норме исправляются системой контроля повреждений ДНК. Очевидно, что наличие полиморфных вариантов генов системы репарации и контроля клеточного цикла посредством снижения функциональной активности *BER/NER*-репарационных белков и специфических протеинкиназ вносит немалый вклад в развитие патологии беременности вследствие несрабатывания механизма корректировки повреждений ДНК, появления геномной нестабильности и запуска апоптоза в материнских и фетальных клетках. Показано, что при различных осложнениях беременности наблюдается повышенный уровень апоптоза в трофобласте [3]. В результате происходит недостаточная децидуализация стромы эндометрия, способствующая неполной или слабой инвазии цитотрофобласта, что подавляет нормальные гестационные изменения в маточно-плацентарных артериях и приводит к снижению кровотока в них. Следствием этого является смерть эмбриона и отслойка трофобласта.

Наличие полиморфизма *Asp148Glu* гена *APEX1* оказывает влияние на взаимодействие с другими участниками геномной сети, приводящее к более глобальным изменениям в эффективности процессов регуляции репарации, активности транскрипционных факторов, стабильности мРНК и пр. [8]. Полиморфизм *Lys751Gln* гена *ERCC2 (XPD)* связан со сниженной хеликазной активностью [6]. Полиморфизм *1100delC* гена *CHEK2* приводит к экспрессии укороченного киназного домена. Это в свою очередь ослабляет все выполняемые чекпоинт-киназой функции [7]. Наличие данного полиморфизма приводит к значительному снижению эффективности работы системы контроля повреждений ДНК *DDR* и таким образом может повлиять на развитие патологии беременности за счет нарушения процессов контроля клеточного цикла, *ATM-CHEK2* сигнального пути нарушений ДНК, апоптоза и возникновения геномной нестабильности как в материнских, так и в фетальных тканях. Все это может привести к дефектам имплантации и снижению глубины децидуальной инвазии трофобласта, что может послужить причиной неразвивающейся беременности.

Согласно рассчитанным коэффициентам соотношения шансов OR, наличие полиморфных вариантов некоторых генов системы репарации увеличивает вероятность повторного развития невынашивания беременности, вероятно, из-за сниженной способности к взаимодействию с другими участниками системы контроля повреждений ДНК, может привести к уменьшению эффективности репарационных процессов и потенциальной связи с предрасположенностью к возникновению невынашивания беременности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 12-04-31408.*

### Список литературы

1. Гусякова О. А. Метаболические аспекты невынашивания беременности, взаимосвязь с групповой принадлежностью крови по системе АВО / Гусякова О. А., Спиридонова Н. В., Буданова М. В., Мелешкина О. И. // Практическая Медицина (Акушерство. Гинекология. Эндокринология). – 2011. – Т. 6. – N 54. – С. 45 – 49.
2. Степанян Л. В. Неразвивающаяся беременность: этиология, патогенез / Степанян Л. В., Синчихин С. П., Мамиев О. Б. // Астраханский медицинский журнал. Научно-практический медицинский журнал. – 2011. – Т. 6. – № 3. – С. 48-51.
3. Щербаков В. И. Апоптоз в трофобласте и его роль при патологии беременности / Щербаков В. И. // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131. – № 2. – С. 145 – 158.
4. Branch D. W. Clinical practice. Recurrent miscarriage / Branch D. W., Gibson M., Silver, R. M. // N Engl J Med. – 2010. – V. 363. – P. 1740–1747.
5. Christiansen, O. B. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications / Christiansen O. B., Steffensen R., Nielsen H. S., Varming K. // Gynecol. Obstet. – 2008. – N. 66. – P. 257–267.
6. Hemminki K. XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ / Hemminki K., Xu G., Angelini S., Snellman E., Jansen C.T., Lambert B., Hou S.M. // Carcinogenesis. – 2001. – V. 22. – P.1185-1188.
7. Jackson S. P. The DNA-damage response in human biology and disease / Jackson S. P., Jiri Bartek // Nature. – 2009. – Vol. 461. – N 7267. – P. 1071–1078.
8. Kasahara M. Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population / Kasahara M., Osawa K., Yoshida K., Miyaishi A., Osawa Y., Inoue N., Tsutou A., Tabuchi Y., Tanaka K., Yamamoto M., Shimada E., Takahashi J. // J Exp Clin Cancer Res. – 2008. – V. 27. – N 1. – P. 1 – 49.

9. Moslehi R. Phenotype-Specific adverse effects of XPD mutations on human prenatal development implicate impairment of TFIIH-mediated functions in placenta / Moslehi R., Kumar A., Mills J.L., Ambroggio X., Signore C., Dzutsev A. // *Evr J Hum. Gen.* – 2012. – V. 20. – P. 626 – 631.
10. Rull K. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions / Rull K., Nagirnaja L., Laan M. // *Frontiers in Genetics.* – 2012. – V. 3. – N 34.-doi: 10.3389/fgene.2012.00034.
11. Tamura D. Effects of mutations in XPD (ERCC2) on pregnancy and prenatal development in mothers of patients with trichothiodystrophy or xerodermapigmentosum / Tamura D., Khan S. G., Merideth M., DiGiovanna J.J., Tucker M.A., Goldstein A.M. et al. // *Evr J Hum Gen.* – 2012. – V. 20. – P. 1308 – 1310.
12. Tang, A. W. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss / Tang A., Quenby S. // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2010. – V. 22. – P. 446–451.

**Рецензенты:**

Амелина Светлана Сергеевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом биомедицины НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.

Усатов Александр Вячеславович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом изменчивости генома НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.