

# Роль полиморфизма генов ферментов системы обмена катехоламинов и эксцизионной репарации ДНК в генезе невынашивания беременности

О.В.Макаров, К.В.Морозова, В.С.Гончарова, Н.Н.Луценко

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. О.В.Макаров)

Невынашивание беременности по-прежнему занимает ведущее место среди основных проблем современной медицины. В последние десятилетия особое внимание уделяется системным генетическим предикторам невынашивания беременности. За процессы обмена катехоламинов в организме отвечают специальные ферменты, одним из них является катехол-о-метилтрансфераза, функциональная активность которого генетически детерминирована. Система эксцизионной репарации ДНК при участии фермента 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы обеспечивает поддержание исходной структуры ДНК, что крайне важно для гомеостаза организма. В исследовании проведено генотипирование 274 пациенток на наличие полиморфизма rs4680 гена *COMT* и полиморфизма rs1052133 гена *OGG1* и определено их влияние на течение беременности. Установлено, что носительство генотипов A/A и G/A rs4680 гена *COMT* и генотипов G/G и C/G rs1052133 гена *OGG1* ассоциировано с повышенным риском невынашивания беременности.

*Ключевые слова:* невынашивание беременности, полиморфизм генов, эксцизионная репарация ДНК, катехоламины

## The Role of Gene Enzymes Polymorphism of Catecholamines Exchange System and DNA Excision Reparation in the Genesis of Miscarriage

O.V.Makarov, K.V.Morozova, V.S.Goncharova, N.N.Lutsenko

Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology № 1 of Medical Faculty, Moscow (Head of the Department — Prof. O.V.Makarov)

Miscarriage still occupies a leading place among the main problems of medicine. In recent decades, special attention is paid to the system of genetic predictors of miscarriage. Special ferments are responsible for catecholamines exchange in the body, one of which is the catechol-o-methyltransferase, functional activity of which is genetically determined. DNA excision reparation system with the participation of the enzyme 8-oxoguanine-DNA glycosylase maintains the original structure of DNA, which is very important for the homeostasis of the organism. In our study we conducted genotyping of 274 patients for the presence of polymorphism of rs4680 gene *COMT* and polymorphism of rs1052133 gene *OGG1* and determined their impact on the course of pregnancy. It was found that carriage of A/A and G/A rs4680 genotypes of *COMT* gene and G/G and C/G rs1052133 genotypes of *OGG1* gene was associated with an increased risk of miscarriage.

*Key words:* miscarriage, polymorphism of genes, DNA excision reparation, catecholamines

**Н**есмотря на активное развитие современной медицины, невынашивание беременности остается одной из наиболее актуальных и нерешенных до настоящего вре-

мени проблем. Согласно статистическим данным около 15–20% всех клинически установленных беременностей заканчиваются самопроизвольным выкидышем [1]. Более половины из них приходится на I триместр беременности, во II триместре происходит снижение частоты выкидышей до 20%, в III триместре — до 7–10% и далее не изменяется вплоть до родов. Среди основных причин невынашивания беременности выделяют анатомические, инфекционные, иммунологические, эндокринные и другие комплексные факторы. Несмотря на многочисленные научные изыскания, в 30% случаев причину самопроизвольных выкидышей установить не удается, поэтому большую

### Для корреспонденции:

Морозова Ксения Владимировна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (499) 613-5640

E-mail: morozovack@mail.ru

Статья поступила 15.01.2014, принята к печати 20.02.2014

актуальность представляет изучение глубинных процессов в организме, предрасполагающих к репродуктивным потерям. В последние годы пристальное внимание ученых обращено на исследование генетических факторов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям, включая невынашивание беременности [1]. Среди множества причин следует отдельно упомянуть негативное влияние стресса на организм беременных, так как в современных условиях жизни подавляющее большинство женщин вынужденно испытывать на себе его дестабилизирующее воздействие.

При стрессе в организме резко возрастает активность многих систем, включая повышенную выработку катехоламинов как основных нейромедиаторов передачи информации в ЦНС. Гиперпродукция катехоламинов влечет за собой мобилизацию всех систем организма, что носит приспособительный характер, однако в условиях длительного воздействия возникает истощение защитных систем с активацией разрушающих механизмов [2].

В организме за метаболизм и элиминацию катехоламинов отвечает целый каскад реакций, протекающих при участии фермента катехол-О-метилтрансферазы, выработка которого регулируется экспрессией гена *COMT*. При полноценном функционировании ферментативной системы происходит поддержание катехоламинов на физиологическом уровне. Однако при снижении активности катехол-О-метилтрансферазы возникает чрезмерное их накопление, что напрямую воздействует на органы-мишени, в том числе и на матку, приводя к изменению ее тонуса и нарушению маточно-плацентарного кровотока [3, 4].

Другая важная функция фермента катехол-О-метилтрансферазы — осуществление элиминации эстрогенов [5, 6]. При снижении активности фермента происходит накопление катехолэстрогенов, которые, в свою очередь, оказывают генотоксическое воздействие на молекулы ДНК, вызывая их прямое повреждение и усиливая мутагенез [5].

За период жизненного цикла в каждой клетке под действием эндогенных и экзогенных факторов происходит от  $10^5$  до  $10^{10}$  мутаций в молекуле ДНК, которые имеют положительное значение, являясь основой эволюции, но также могут приводить к развитию целого ряда заболеваний при недостаточности репаративной системы [7]. Исходную структуру ДНК поддерживает слаженная работа всех звеньев системы репарации ДНК. Один из самых сложных механизмов репарации — эксцизионная репарация ДНК, а наиболее важный фермент такой репарации — 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, кодируемая геном *OGG1* [7]. Изменения в структуре гена *OGG1* могут сопровождаться экспрессией фермента 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы со сниженной активностью, что приводит к уменьшению эффективности репарации и усилению мутагенеза. Все вышеперечисленные процессы негативно влияют на гомеостаз организма, который особенно важен для формирования и развития эмбриона.

В последнее время установлено, что полиморфизм генов, кодирующих выработку ферментов, может приводить к значительным изменениям их активности, что, в свою очередь, отражается на их функциональной состоятельно-

сти. Полиморфизм генов неоспоримо связан с развитием многих мультифакториальных заболеваний [7–10].

Цель исследования — изучение влияния носительства аллелей полиморфизма rs4680 гена *COMT* и полиморфизма rs1052133 гена *OGG1* на исход первой половины беременности.

### Пациенты и методы

Объектом исследования были 274 женщины, 151 из которых имели в анамнезе 2 и более эпизодов потери беременности на сроке плода более 7 нед гестации, включая случаи анэмбрионии и беременности, наступившие в результате ЭКО. Группу контроля составили 123 женщины с двумя и более нормальными беременностями в анамнезе, протекавшими без угрозы прерывания и закончившимися самопроизвольными родами. Критерием включения пациенток в контрольную группу также было отсутствие эпизодов невынашивания беременности в анамнезе. Все отобранные женщины были славянской национальности, а также проживали в идентичных территориально-климатических условиях (Москва и Московская обл.).

Всем пациенткам, включенным в наше исследование, провели полное клинико-лабораторное обследование в целях исключения явных причин невынашивания. Обязательным исследованием для основной группы также было кариотипирование абортусов для исключения грубой аномалии кариотипа плода как фактора прерывания беременности.

Были проведены молекулярно-генетические исследования, материалом для которых служила периферическая кровь обследованных женщин. Для этого осуществляли забор 5 мл венозной крови в пробирку, содержащую консервант — раствор  $K_3EDTA$ , в соотношении 1:10, с дальнейшим хранением образцов при температуре  $-20... -80$  °C вплоть до постановки реакции. Выделение ДНК производили с использованием наборов реактивов Diatom DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) согласно протоколу, заявленному производителем.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия  $\chi^2$ . Для оценки достоверности различий частот бинарных показателей использовали трендовый тест Армитажа. Вклады различных генотипов в заболеваемость определяли с помощью традиционного для таких исследований показателя отношения шансов (OR, odds ratio).

### Результаты исследования и их обсуждение

Предметом исследования был однонуклеотидный полиморфизм rs4680 гена *COMT*, при котором возникает замена азотистого основания гуанина на аденин в структуре нуклеотида, в результате чего в молекуле белка аминокислота валин замещается метионином [2]. В популяции европеоидов наиболее часто встречается гетерозиготный генотип G/A (около 45%), гомозигота по мутантному аллелю А наблюдается у 30% европеоидов и самый редкий гомозиготный генотип G/G — у

17% европеоидов. Согласно ранее проведенным исследованиям данную мутацию сопровождает изменение активности экспрессируемого фермента катехол-О-метилтрансферазы [2, 11]. Несмотря на столь активное исследование однонуклеотидного полиморфизма rs4680 гена *COMT*, его возможная роль в предрасположенности к репродуктивным потерям ранее не изучалась. Нам представлялось интересным проследить связь носительства аллелей rs4680 гена *COMT* и риска невынашивания первой половины беременности.

По результатам проведенного генотипирования установлено, что распределение генотипов в основной и контрольной группах соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. Гомозиготный генотип A/A у женщин с репродуктивными потерями составил 29% ( $n = 26$ ), что несколько выше по сравнению с группой здоровых женщин, однако разница не была достоверна. Гетерозиготный генотип G/A в основной группе выявлен у 57,80% ( $n = 52$ ), что близко к группе контроля, где частота встречаемости составила 42,47% ( $n = 48$ ), достоверной разницы также не установлено. Гомозиготу по дикому аллелю G, при котором происходит выработка полноценного фермента катехол-О-

метилтрансферазы, наблюдали у 37 (33%) здоровых женщин, тогда как в группе пациенток с невынашиванием беременности частота встречаемости была достоверно ниже и составила 13,3% ( $n = 12$ ),  $\chi^2 = 0,31$ ,  $p = 0,0013$  (рис. 1).

По результатам проведенного аддитивного теста Кохрана–Армитажа выявлено, что минорный аллель A у пациенток с невынашиванием беременности наследовался по доминантной модели, согласно которой оба генотипа A/A и G/A являются рисковыми в отношении репродуктивных потерь у этих пациенток ( $\chi^2 = 5,47$ ;  $p = 0,02$ ). Было также установлено, что, по сравнению с аллелем G, носительство аллеля A ассоциировано с повышенным риском невынашивания первой половины беременности (OR = 1,61;  $p = 0,02$ ; 95% df — 1,06–2,43).

Мы обратили внимание на тот факт, что у пациенток с привычным невынашиванием беременности, которые составили основную группу, частота миомы матки, аденомиоза и фиброзно-кистозной мастопатии была значительно выше. Поэтому было решено проследить связь носительства аллелей rs4680 (G 1947A) гена *COMT* с частотой развития вышеперечисленных эстрогензависимых заболеваний (рис. 2).

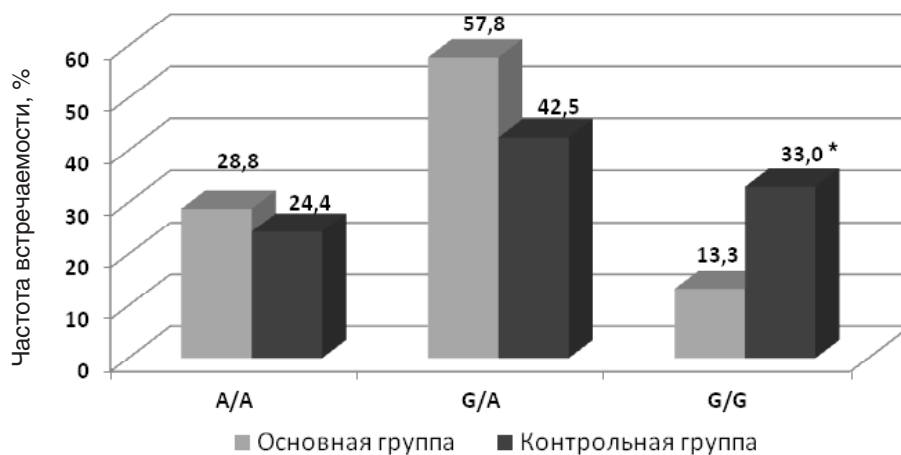


Рис. 1. Распределение генотипов полиморфного локуса rs4680 (G1947A) гена *COMT* у пациенток основной и контрольной групп. \* —  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующим значением основной группы.

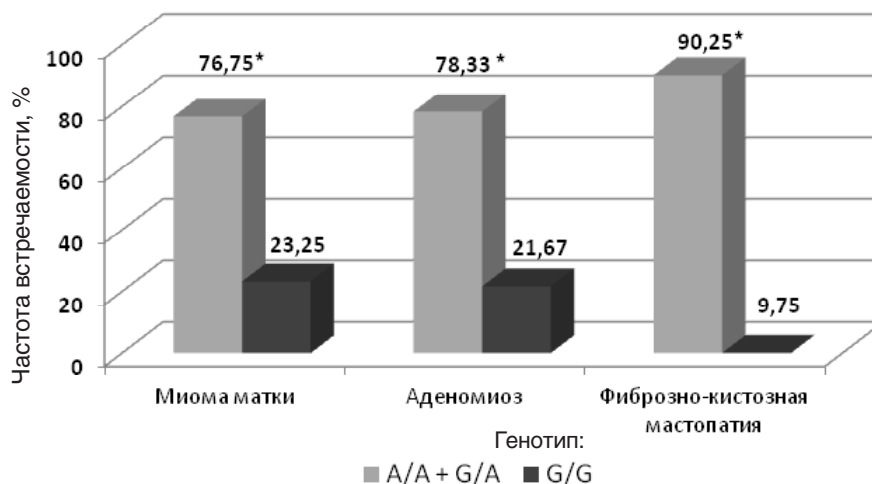


Рис. 2. Распределение частоты встречаемости эстрогензависимых заболеваний в зависимости от генотипа G1947A rs4680 гена *COMT*. \* —  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующим значением генотипа rs4680 G/G *COMT* (с нормальной активностью фермента).

В нашем исследовании среди женщин носителей аллеля А в гомо- и гетерозиготном состоянии аденомиоз встречался достоверно чаще ( $\chi^2 = 2,78; p = 0,0004$ ). Установлена также более частая заболеваемость миомой матки при наличии генотипов А/А и G/A ( $\chi^2 = 3,35; p = 0,0003$ ). Более 90% носителей мутантного аллеля А в гомо- и гетерозиготном состоянии были подвержены развитию фибронокистозной мастопатии, тогда как у женщин с генотипом G/G данная патология отмечена крайне редко ( $\chi^2 = 28,71; p < 0,0001$ ) (см. рис. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что носительство аллеля А rs4680 гена *COMT*, сопровождающееся снижением активности экспрессируемого фермента катехол-о-метилтрансферазы, может определять чрезмерное накопление катехолэстрогенов с активизацией их генотоксических свойств, в результате чего возможно увеличение вероятности развития не только соматических заболеваний различной локализации, но и риска осложненного течения беременности.

В клетках человека все процессы реализуются на основе информации, заложенной в молекуле ДНК, поэтому поддержание стабильности генома крайне важно для гомеостаза организма. Сохранение исходной структуры ДНК происходит благодаря слаженному взаимодействию репаративных механизмов, одним из которых является система эксцизионной репарации [12]. Среди основных ферментов эксцизионной репарации ДНК можно выделить 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазу (*OGG1*), при участии которой происходит восстановление поврежденных и окисленных оснований. Однонуклеотидные замены, возникающие в случае нарушения структуры гена *OGG1*, по-разному влияют на функциональную способность экспрессируемого фермента [7]. В данном исследовании нами изучен один из наиболее значимых полиморфных вариантов rs1052133 гена *OGG1*, который характеризуется изменением нуклеотидной последовательности с заменой азотистого основания цитозин на гуанин, что в свою очередь приводит к замене аминокислоты серин на цистеин в молекуле белка. Согласно

данным литературы носительство минорного аллеля G ассоциировано с уязвимостью репаративной системы и, как следствие, развитием многих мультифакторных заболеваний, в том числе и онкологических [12–15]. Недавно установлена роль аллеля G в развитии спонтанных хромосомных aberrаций в условиях радиационного загрязнения [7]. Авторами было принято решение проанализировать влияние носительства полиморфных аллелей rs1052133 гена *OGG1* на течение беременности, особенно учитывая тот факт, что подобные исследования в контексте невынашивания беременности отсутствуют.

В результате проведенного генотипирования установлено, что распределение генотипов rs1052133 гена *OGG1* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. Дикий аллель С в гомозиготном состоянии был выявлен у 54 (59%) пациенток с невынашиванием беременности, тогда как в группе контроля его наблюдали несколько чаще, в 87 (72%) случаях. Полученные данные совпали с общепопуляционными для европеоидов (60%), а разница между группами не была статистически значима (рис. 3). Гетерозиготный генотип C/G в основной группе отмечен в 33 (36,3%) случаях, что практически совпало с показателями в группе здоровых женщин — 33 (27,2%) и соответствовало данным по популяции европеоидов в целом — 30% (см. рис. 3). Минорный аллель G в гомозиготном состоянии выявлен у 4 (4,39%) пациенток с невынашиванием беременности, тогда как среди здоровых женщин установлен всего один случай носительства генотипа G/G в нашем исследовании ( $\chi^2 = 4,1; p = 0,04$ ). Статистически значимая разница указывает на неблагоприятный характер генотипа G/G (см. рис. 3).

Согласно проведенному статистическому анализу выявлена доминантная модель наследования аллеля G, что характеризует оба генотипа G/G и C/G как рисковые. Установлено также, что носительство аллеля G характеризуется повышенным риском репродуктивных потерь в первые 10 нед гестации (OR = 1,72;  $p = 0,04$ ; 95% df — 0,34–0,99).

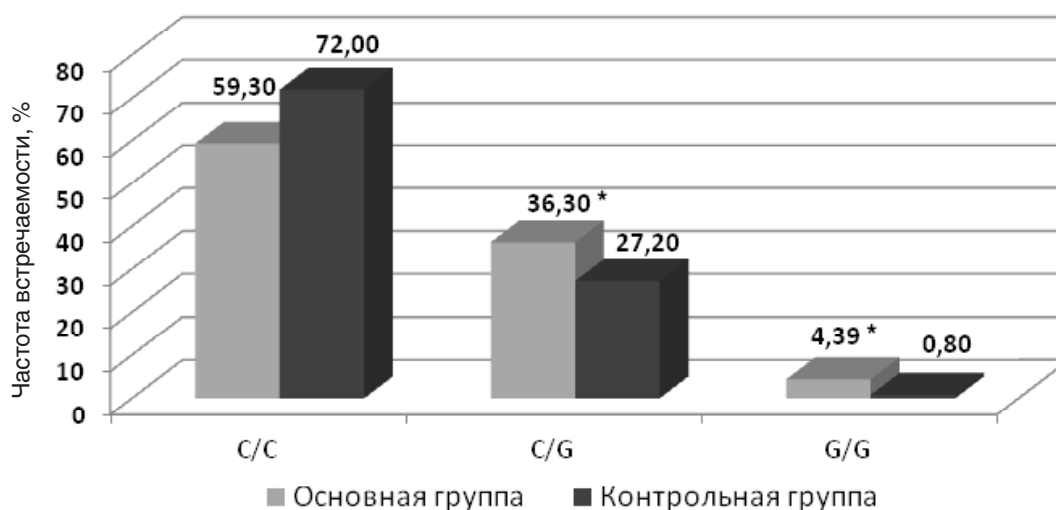


Рис. 3. Распределение генотипов полиморфного локуса rs1052133 (C977G) гена *OGG1* у пациенток основной и контрольной групп.  
\* —  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующим значением контрольной группы.

## Заключение

Установленная взаимосвязь носительства полиморфных вариантов генов ферментов обмена катехоламинов и эксцизионной репарации ДНК с повышенным риском невынашивания беременности имеет большое клиническое значение. В комплексе прекоцепционной подготовки пациенток с репродуктивными потерями в анамнезе исследование на предмет носительства генотипов A/A и G/A в локусе rs4680 гена *COMT* и генотипов G/G и C/G в локусе rs1052133 гена *OGG1* позволит выделить группы риска по неблагоприятному течению беременности с последующей разработкой профилактических и терапевтических мероприятий, направленных на снижение числа репродуктивных потерь.

## Литература

1. Баранов В.С., Айламазян Э.К. Экологические и генетические причины нарушения репродуктивного здоровья и их профилактика // Журн. акуш. и женск. бол. 2007. Т.LVI. Вып.1. С.3–10.
2. Feng Y., Zhao X., Zhou C. et al. The associations between the Val158Met in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM) // Gene. 2013. V.529 (2). P.296–299.
3. Tiihonen J., Hallikainen T., Lachman H. et al. Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism // Mol Psychiatry. 1999. V.4 (3). P.286–289.
4. Wang X., Wang Z., Wu Y. et al. Association analysis of the catechol-O-methyltransferase /methylene tetrahydrofolate reductase genes and cognition in late-onset depression // Psychiatry Clin Neurosci. 2013 Dec 25. doi: 10.1111/pcn.12133. PMID:24373005.
5. Cavalieri E., Frenkel K., Liehr J.G. et al. Estrogens as endogenous genotoxic agents — DNA adducts and mutations // J Natl Cancer Inst Monogr. 2000. №27. P.75–93.
6. Середа Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. Ферменты метаболизма эстрогенов и рецепторы как факторы риска развития и прогноза при раке молочной железы // Сибирск. онкол. журн. 2004. №1. С.35–43.
7. Salnikova L., Chumachenko A., Belopolskaya O., Rubanovich A. Correlations between DNA polymorphism and frequencies of gamma-radiation induced and spontaneous cytogenetic damage // Health Phys. 2012. V.103 (1). P.37–41.
8. Zhang J., Zhou J., Zhang P. et al. A meta-analysis of the association between the hOGG1 Ser326Cys polymorphism and the risk of esophageal squamous cell carcinoma // PLoS One. 2013. V.8 (6). e65742. doi: 10.1371.
9. Zhang H., Xu Y., Zhang Z., Li L. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis of 2584 cases and 3234 controls // BMC Cancer. 2011. V.11. P.391.
10. Kuraoka I., Suzuki K., Ito S. et al. RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIIS // DNA Repair (Amst). 2007. V.6 (6). P.841–851.
11. Houston J.P., Kohler J., Ostbye K.M. et al. Association of catechol-O-methyltransferase variants with duloxetine response in major depressive disorder // Psychiatry Res. 2011. V.189 (3). P.475–477.
12. Chen X., Liu X., Wang J. et al. Functional polymorphisms of the hOGG1 gene confer risk to type 2 epithelial ovarian cancer in Chinese // Int J Gynecol Cancer. 2011. V.21 (8). P.1407–1413.
13. Maga G., Villani G., Crespan E. et al. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins // Nature. 2007. V.447. P.606–608.
14. Plum G.E., Grollman A.P., Johnson F., Breslauer K.J. Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex // Biochemistry. 1995. V.34 (49). P.16148–16160.
15. Sun C., Liu X., Zhang H. et al. Functional polymorphism of hOGG1 gene is associated with type 2 diabetes mellitus in Chinese population // Mol Cell Endocrinol. 2010. V.325 (1–2). P.128–134.

---

### Информация об авторах:

Макаров Олег Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (499) 237-4033  
E-mail: profmakarov@mail.ru

Гончарова Варвара Сергеевна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (499) 613-5640  
E-mail: v\_seredenina@mail.ru

Луценко Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии № 1 лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (499) 613-5640  
E-mail: lnn55@mail.ru