

---

---

## ГЕНЕТИКА

---

---

# АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *DNMT3B* И *DNMT3L* С ПОТЕРЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ НА РАННЕМ СРОКЕ

М.М.Азова<sup>1</sup>, А.А.Ахмед<sup>1</sup>, А.Аит Аисса<sup>1</sup>, М.Л.Благонравов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биологии и общей генетики, <sup>2</sup>кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А.Фролова Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ

Метилирование ДНК является одним из ключевых факторов на начальных сроках беременности. Была исследована возможность ассоциации полиморфизмов генов метилтрансфераз (*DNMT3B rs2424913*, *DNMT3B rs1569686*, *DNMT3L rs2276248* и *DNMT3L rs2070565*) с потерей беременности на ранних сроках у женщин русской национальности. В исследование были включены 100 женщин с ранней потерей беременности, которые в дальнейшем были разделены на две подгруппы, каждая из которых включала 50 пациенток со спорадической или повторной потерей беременности. Контрольная группа состояла из 56 женщин с нормально протекавшими беременностями. Для генотипирования использовался метод ПЦР с последующей рестрикцией ДНК. Было выявлено статистически значимое увеличение частоты генотипа *TT* и аллеля *T* по полиморфизму *DNMT3B rs2424913* как в общей группе пациенток, так и в обеих подгруппах по сравнению с контролем. Более того, наличие гомозиготного генотипа *TT* увеличивает риск ранних репродуктивных потерь, как спорадических, так и повторных. Полиморфизм *rs2424913* гена *DNMT3B* может быть использован в качестве маркера предрасположенности к потере беременности на ранних сроках и к привычному невынашиванию.

**Ключевые слова:** ДНК-метилтрансферазы, потеря беременности на ранних сроках, од-  
нонуклеотидные полиморфизмы

Выкидыши в I триместре рассматриваются как потеря беременности на ранних сроках (ранняя потеря беременности, РПБ), при спонтанном прерывании двух или более беременностей используется термин “привычное невынашивание” [4-6]. Считается, что привычное невынашивание наблюдается в 2-5% супружеских пар, желающих иметь детей [5]. Приблизительно 9-15% всех клинически диагностированных беременностей прерываются на раннем сроке [9]; 30% выкидышей наблюдается в период между имплантацией и 6-й неделей беременности, в то время как после I триместра их частота значительно уменьшается [4,9].

Нарушения имплантации и раннего постимплантационного развития являются одной из ведущих причин привычного невынашивания, и ге-

нетические факторы задействованы в 50-76% случаев. Были проведены исследования, направленные на выявление генов, вовлеченных в различные аспекты взаимодействия между эмбрионом и организмом матери. Установлено, что некоторые варианты последовательностей в промоторных областях и сайтах сплайсинга данных генов могут влиять на уровень экспрессии и активности ферментов, формирующих паттерны метилирования путем метилирования ДНК *de novo* на ранних стадиях эмбриогенеза или во время гаметогенеза, что в конечном итоге ведет к риску повторных спонтанных репродуктивных потерь [15].

Метилирование ДНК у млекопитающих играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов и эмбрионального развития. ДНК-метилтрансферазы (DNMT) присоединяют метильные группы к цитозинам, расположенным в так называемых CpG-

Адрес для корреспонденции: azovam@mail.ru. Азова М.М.

островках. У человека семейство DNMT включает ряд ферментов: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B и DNMT3L. DNMT3A и DNMT3B обеспечивают метилирование *de novo* на стадии имплантации эмбриона, в то время как DNMT1 поддерживает данный паттерн метилирования в ряду митотических делений. DNMT2 является тРНК-метилтрансферазой и не влияет на метилирование геномной ДНК. DNMT3L не имеет ДНК-метилтрансферазной активности, но стимулирует активность метилтрансфераз DNMT3B и DNMT3A [11, 14].

Целью данного исследования являлось изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах *DNMT3B* и *DNMT3L* (*DNMT3B* -149C>T, *DNMT3B* -579G>T, *DNMT3L* rs2276248 и *DNMT3L* rs2070565) с РПБ, включая привычное невынашивание. Несмотря на то что существует ряд исследований полиморфизмов *DNMT3B* -149C>T (rs2424913) при онкологических заболеваниях [7, 13], *DNMT3L* rs2276248 и *DNMT3L* rs2070565 при нарушениях сперматогенеза у мужчин [8] и эндометриозе у женщин [2], указанные полиморфизмы у женщин с РПБ ранее не изучались. Полиморфизму *DNMT3B* -579G>T (rs1569686) к настоящему времени посвящено лишь одно исследование, выполненное в Словении в группе женщин с повторной потерей беременности [1], но в России подобные исследования не выполнялись.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выявления возможной ассоциации генных полиморфизмов *DNMT3B* -149C>T (rs2424913), *DNMT3B* -579G>T (rs1569686), *DNMT3L* rs2276248 и *DNMT3L* rs2070565 с РПБ у женщин русской национальности, проживающих в Центральной России, проведено исследование «случай-контроль». Информированное согласие было получено от всех его участников.

**Таблица 1.** Условия генотипирования

Генные полиморфизмы	Праймеры	Температура отжига, °С	Рестриктаза	Длина фрагментов ДНК, п.н.
<i>DNMT3B</i> rs2424913	F: 5'-TGCTGTGACAGGCAGAGCAG-3' R: 5'-GGTAGCCGGGAACCTCCACGG-3'	65	ASPA2I	CC: 380 CT: 380, 207, 173 TT: 207, 173
<i>DNMT3B</i> rs1569686	F: 5'-GAGGTCTCATTATGCCTAGG-3' R: 5'-GGGAGCTCACCTTCTAGAAA-32	49	PvuII	TT: 132, 93 TG: 225, 132, 93 GG: 225
<i>DNMT3L</i> rs2276248	F: 5'-TATGTTGTCCAGGCTCGTCTC-3' R: 5'-ATCACAATCGCCAACCGTAG-3'	56	PvuII	AA: 357 AG: 357, 218, 139 GG: 218, 139
<i>DNMT3L</i> rs2070565	F: 5'-GGGGTGCATCAGGGATCTGA-3' R: 5'-СТААГТГАСТGGTCCAATAAGC-3'	53	ApeKI	AA: 218 AG: 218, 151, 67 GG: 151, 67

Исследование проводилось в двух группах. Общая группа пациентов включала 100 женщин в возрасте 31.5±4.9 года с потерей беременности на сроке гестации до 12 нед. В дальнейшем она была разделена на две подгруппы: 50 женщин со спорадическим выкидышем, за которым следовали одна или более нормально протекавших беременностей (спорадическая потеря беременности, СПБ), и 50 женщин с повторной (двумя или более) потерей беременности (ППБ). Критерии исключения: наличие анатомических аномалий или хронических заболеваний, способных индуцировать РПБ. Контрольная группа состояла из 56 женщин в возрасте 29.2±3.5 года с наличием как минимум одной нормально протекавшей беременности и неотягощенным акушерским и гинекологическим анамнезом.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием реагентов компании «Синтол». Генотипирование по полиморфизмам *DNMT3B* -149C>T (rs2424913), *DNMT3B* -579G>T (rs1569686), *DNMT3L* rs2276248 и *DNMT3L* rs2070565 осуществляли методом ПЦП с последующей рестрикцией ДНК (табл. 1). Для разделения полученных фрагментов выполняли электрофорез в агарозном геле.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 22. Для сравнения частот генов и генотипов в изучаемых группах применяли критерий  $\chi^2$  и точный тест Фишера. Рассчитывали отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частоты аллелей и генотипов по полиморфизмам *DNMT3B* rs2424913, *DNMT3B* rs1569686, *DNMT3L* rs2276248 и *DNMT3L* rs2070565 в анализируемых группах представлены в таблице 2.

Распределение генотипов и частоты аллелей по полиморфизму *DNMT3B* -149C>T (*rs2424913*) как в общей группе пациенток с РПБ, так и в обеих подгруппах достоверно отличались от таковых в группе здоровых женщин. Более того, риск РПБ, СПБ и ППБ значимо увеличивался при наличии гомозиготного генотипа по минорному аллелю *T* (OR и 95%CI: 4.44, 1.48 — 13.32; 4.78, 1.61 — 14.21; 4.10, 1.35 — 12.43 соответственно). Вместе с тем по остальным полиморфизмам различий между исследуемыми группами обнаружено не было.

Роль ДНК-метилтрансфераз, динамика и функции метилирования ДНК в эмбриональных стволовых клетках и на ранних стадиях развития детально изучены у мышей и в меньшей степени у человека. Существуют данные, указывающие, что *de novo* метилтрансфераза *DNMT3B* у эмбрионов человека и в ооцитах играет ключевую роль в формировании паттернов метилирования и необходима

**Таблица 2.** Частоты генотипов и аллелей (%) по полиморфизмам *DNMT3B* *rs2424913*, *DNMT3B* *rs1569686*, *DNMT3L* *rs2276248* и *DNMT3L* *rs2070565* в изучаемых группах

Генотип и аллель	Контроль (N=56)	РПБ (N=100)	СПБ (N=50)	ППБ (N=50)
<i>DNMT3B</i> <i>rs2424913</i>				
CC	55.4	30.0*	30.0*	30.0*
CT	39.2	57.0*	56.0*	58.0*
TT	5.4	13.0*	14.0*	12.0*
C	75.0	58.5*	58.0*	59.0*
T	25.0	41.5*	42.0*	41.0*
<i>DNMT3B</i> <i>rs1569686</i>				
GG	39.2	35.0	30.0	40.0
GT	42.9	49.0	56.0	42.0
TT	17.9	16.0	14.0	18.0
G	60.6	59.5	58.0	61.0
T	39.4	40.5	42.0	39.0
<i>DNMT3L</i> <i>rs2276248</i>				
TT	94.6	90.9	90.0	91.7
CT	5.4	9.1	10.0	8.3
CC	0	0	0	0
T	97.3	95.4	95.0	95.8
C	2.7	4.6	5.0	4.2
<i>DNMT3L</i> <i>rs2070565</i>				
GG	12.5	6.0	10.0	2.0
GA	71.4	81.0	76.0	86.0
AA	16.1	13.0	14.0	12.0
G	48.2	46.5	48.0	45.0
A	51.8	53.5	52.0	55.0

**Примечание.** \* $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем.

для наступления беременности, особенно для ранних стадий эмбриогенеза [12]. Представляет интерес ряд исследований, показавших, что данный фермент участвует в поддержании и динамичном ремоделировании паттернов метилирования ДНК в дифференцированных клетках [11]. Также обнаружено, что *DNMT3L* увеличивает активность *DNMT3B* в 1.5-3 раза [14]. Все это позволяет искать корреляцию между полиморфизмами генов метилтрансфераз и спонтанными абортами на ранних сроках беременности.

Нами установлено, что наличие гомозиготного генотипа *TT* по полиморфизму *DNMT3B* -149C>T достоверно повышает риск РПБ. Мы полагаем, что для этого необходим также вклад со стороны отца (генотипы *CT* или *TT*), но этот вопрос требует дальнейшего изучения. Следовательно, полученные нами данные согласуются с результатами других исследований, свидетельствующих о значимой роли *DNMT3B* для эмбриогенеза. Более того, известно, что до 50% эмбрионов, потерянных на ранних сроках, имеют хромосомные аномалии [1], а нарушения в метилировании материнского генома могут влиять на структуру хроматина и способствовать хромосомной нестабильности и нерасхождению хромосом во время мейоза [3]. *DNMT3B* также играет важную роль в регуляции дифференцировки моноцитов и макрофагов в фетоматеринском пространстве [10]. Таким образом, аллель *T* полиморфизма *DNMT3B* -149C>T не только повышает риск онкологических заболеваний [13], но и может быть использован в качестве маркера генетической предрасположенности к РПБ и привычному невынашиванию беременности.

Исследование, проведенное в Словении, показало, что аллель *G* и гомозиготный генотип *GG* по полиморфизму *DNMT3B* *rs1569686* достоверно чаще встречаются у женщин с привычным невынашиванием беременности [1], но в рамках нашего исследования подобной ассоциации у русских женщин обнаружено не было.

*DNMT3L* активно экспрессируется в зрелых ооцитах, во время сперматогенеза и в предимплантационном периоде, стимулируя активность *DNMT3B* и *DNMT3A* [14]. Несмотря на тот факт, что генные полиморфизмы *DNMT3L* *rs2276248* и *DNMT3L* *rs2070565* ассоциированы с нарушениями фертильности у мужчин и овариальным эндометриозом [2,8], подобной взаимосвязи с потерей беременности на раннем сроке нами обнаружено не было.

Полученные результаты позволяют полагать, что наличие аллеля *T* по полиморфизму *DNMT3B* -149C>T у женщин русской национальности может являться фактором, предрасполагающим к ранним репродуктивным потерям. Таким образом, данный

однонуклеотидный полиморфизм может быть использован в качестве маркера предрасположенности к потере беременности на ранних сроках, включая привычное невынашивание.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barisic A., Perez N., Hodzic A., Ostojic S., Peterlin B. A Single nucleotide polymorphism of DNA methyltransferase 3B gene is a risk factor for recurrent spontaneous abortion // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017. Vol. 78, N 6. doi: 10.1111/aji.12765.
2. Borghese B., Santulli P., Héquet D., Pierre G., de Ziegler D., Vaiman D., Chapron C. Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis // *Am. J. Pathol.* 2012. Vol. 180, N 5. P. 1781-1786.
3. Bozovic I.B., Stankovic A., Zivkovic M., Vranekovic J., Kapovic M., Brajenovic-Milic B. Altered LINE-1 methylation in mothers of children with Down syndrome // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, N 5. ID e0127423. doi: 10.1371/journal.pone.0127423.
4. Committee on Practice Bulletins – Gynecology. The American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin no. 150. Early pregnancy loss // *Obstet Gynecol.* 2015. Vol. 125, N 5. P. 1258-1267.
5. El Hachem H., Crepaux V., May-Panloup P., Descamps P., Legendre G., Bouet P.E. Recurrent pregnancy loss: current perspective // *Int. J. Womens Health.* 2017. Vol. 9. P. 331-345.
6. European Society of Human Reproduction and Embryology. Guideline on the management of recurrent pregnancy loss. URL: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>.
7. Gao M., He D., Meng F., Li J., Shen Y. Associations of DNMT3B -149C>T and -2437T>A polymorphisms and lung cancer risk in Chinese population // *World J. Surg. Oncol.* 2016. Vol. 14, N 1. ID 293.
8. Huang J.X., Scott M.B., Pu X.Y., Zhou-Cun A. Association between single-nucleotide polymorphisms of DNMT3L and infertility with azoospermia in Chinese men // *Reprod. Biomed. Online.* 2012. Vol. 24, N 1. P. 66-71.
9. Jevc Y.B., Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages // *J. Hum. Reprod. Sci.* 2014. Vol. 7, N 3. P. 159-169.
10. Kim S.Y., Romero R., Tarca A.L., Bhatti G., Kim C.J., Lee J., Elsey A., Than N.G., Chaiworapongsa T., Hassan S.S., Kang G.H., Kim J.S. Methylome of fetal and maternal monocytes and macrophages at the fetomaternal interface // *Am. Reprod. Immunol.* 2012. Vol. 68, N 1. P. 8-27.
11. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2018. Vol. 19, N 2. P. 81-92.
12. Petrusa L., Van de Velde H., De Rycke M. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies // *Mol. Hum. Reprod.* 2014. Vol. 20, N 9. P. 861-874.
13. Shen H., Wang L., Spitz M.R., Hong W.K., Mao L., Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62, N 17. P. 4992-4995.
14. Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H., Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, N 26. P. 8166-8172.
15. Tajima S., Suetake I., Takeshita K., Nakagawa A., Kimura H. Domain structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA methyltransferases // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. Vol. 945. P. 63-86.

Получено 08.02.19