

УДК 618.33-33-007:611.8]-056.7

В. М. Запорожан, д-р мед. наук, проф.,
В. Г. Марічереда, канд. мед. наук, доц.,
О. М. Куліш,
П. Каваллі¹, проф.

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *MTHFR* І *MTRR* У ФОРМУВАННІ ВРОДЖЕНИХ ДЕФЕКТІВ НЕРВОВОЇ ТРУБКИ ПЛОДА У ПІВДЕННОМУ РЕГІОНІ УКРАЇНИ

*Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна,
¹Відділення цитогенетики Інституту Оспітальєри, Кремона, Італія*

УДК 618.33-33-007:611.8]-056.7

В. Н. Запорожан, В. Г. Марічереда, О. М. Куліш, П. Каваллі
**РОЛЬ ПОЛІМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *MTHFR* И *MTRR* В ФОРМИРОВАНИИ
ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТОВ НЕРВНОЙ ТРУБКИ ПЛОДА В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ УКРАИНЫ**
*Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина,
Отдел цитогенетики Института Оспитальери, Кремона, Италия*

В данной работе рассмотрены проблемы формирования врожденных дефектов нервной трубки плода, а именно представлены результаты исследования полиморфизмов 677С→Т гена *MTHFR* и 66А→G гена *MTRR* у женщин Южного региона Украины, беременности которых были ассоциированы с дефектами нервной трубки плода. Приведены частоты генотипов, аллелей и компаундов *MTHFR/MTRR*.

Ключевые слова: полиморфизм, 677С→Т *MTHFR*, 66А→G *MTRR*, дефекты нервной трубки.

UDC 618.33-33-007:611.8]-056.7

V. M. Zaporozhan, V. G. Marichereda, O. M. Kulish, P. Cavalli
**ROLE OF *MTHFR* AND *MTRR* GENES POLYMORPHISMS IN THE FORMATION
OF NEURAL TUBE DEFECTS OF FETUS IN THE SOUTHERN UKRAINE**
*The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine,
The Cytogenetics Department of the Ostalieri Institute, Kremona, Italy*

The article presents the problem of congenital neural tube defects in fetus such as 677С→Т *MTHFR* and А66→G *MTRR* genes polymorphisms in women of Southern Ukraine who had pregnancies associated with neural tube defects of fetus. The genotypes, alleles and compounds of *MTHFR* and *MTRR* frequencies are given.

Key words: polymorphism, 677С→Т *MTHFR*, 66А→G *MTRR*, neural tube defects.

Вроджені дефекти нервової трубки (ВДНТ) плода є актуальною медико-соціальною проблемою, що пов'язана з вагомим внеском у структуру перинатальної смертності та інвалідизації дітей з дитинства. Частота їх продовжує залишатися стабільно високою, від 0,2 до 2,0 на 1000 народжених живими, з відсутністю тенденції до зниження, не дивлячись на дослідження у цій галузі та впровадження сучасних засобів діагностики і профілактики [1–4].

Незважаючи на відсутність єдиної теорії виникнення, більшість дослідників вважають ВДНТ мультифакторіальним захворюванням, тобто обумовленим впливом багатьох факторів — як спадкових, так і факторів навколишнього середовища [5]. Численні дослідження доводять, що найбільш значущими молекулярними маркерами ВДНТ плода є фолієва кислота

та гомоцистеїн; сьогодні дефіцит фолієвої кислоти в організмі матері на тлі зростання рівня гомоцистеїну визнають однією з основних причин даної патології [6–8]. Надлишок гомоцистеїну призводить до різноманітних порушень в організмі вагітної жінки, у тому числі, до функціональних змін ендотеліоцитів, ремоделювання гладком'язових клітин артеріальних судин, активації деяких факторів гемостазу [9–11]. Зазначені властивості гомоцистеїну прямо чи опосередковано модулюють функцію білків, причетних до формування ВДНТ плода [12].

Метою дослідження стало вивчення ролі генетично детермінованих особливостей метаболізму фолієвої кислоти та метіоніну, а саме вивчення внеску поліморфізмів генів *MTHFR* та *MTRR* у формування вроджених дефектів нервової трубки плода у Південному регіоні України.

Матеріали та методи дослідження

Для рандомізованого дослідження типу «випадок-контроль» зі 100 жінок з обтяженим за ВДНТ плода акушерським анамнезом були обрані 42 жінки, що народили дитину з ВДНТ або перервали вагітність у зв'язку з виявленням ВДНТ плода за скринінг-тестами та при ультразвуковому дослідженні протягом 2000–2010 рр., у яких не вдалося встановити факт впливу чинників зовнішнього середовища, захворювань і станів, здатних викликати розвиток ВДНТ плода, але не пов'язаних із поліморфізмом генів фолатного циклу й обміну метіоніну. Аненцефалія плода виявлена у 14 (33,3 %) жінок, енцефалоцеле — у 2 (4,8 %), spina bifida — у 26 (61,9 %). У 2 (4,8 %) випадках вада була множинною, у 40 (95,2 %) — ізольованою. 3-поміж обстежених жінок 18 (42,9 %) мали принаймні одну здорову дитину, у 24 (57,1 %) досліджувана вагітність була єдиною. Обтяжений за невиношуванням акушерський анамнез мали 4 (9,5 %) жінки. У жодної жінки не було підтвердженого факту наявності ВДНТ серед родичів. Середній вік жінок становив — (26,60±4,47) року.

Тривалість вагітності, асоційованої з ВДНТ плода, у 20 (47,6 %) жінок становила 12–21 тиж., у 8 (19,1 %) — 22–36 тиж.; у 14 (33,3 %) вагітність була доношеною і завершилася у 13 (31 %) випадків пологами через природні статеві шляхи і в 1 (2,4 %) випадку — шляхом кесаревого розтину. Антенатальна загибель плода констатована у 5 (11,9 %) випадках. У 23 (54,7 %) жінок проведено переривання вагітності за медичними показаннями у зв'язку з виявленням за скринінг-тестами та/або при ультрасонографії ВДНТ плода. За статтю розподіл плодів був однаковим — по 21 (50 %) випадку. Генотипування *MTHFR* (діагностика гомо- та гетерозиготності за алелем 677Т і А1298С) та *MTRR* (діагностика гомо- та гетерозиготності за алелем А66G) проводилося методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (Real-time PCR) [12] за допомогою ампліфікації фрагментів генів *MTHFR*, *MTRR*, які містять поліморфний нуклеотид, з подальшим рестрикційним аналізом продукту ампліфікації та контролем проходження реакції рестрикції за модифікованим методом P. Frosst et al. [12].

У результаті молекулярно-генетичного дослідження встановлено гомозиготний дикий тип 677С/С гена *MTHFR* у 20 (47,6 %) обстежених жінок, гетерозиготний тип 677С/Т — у 17 (40,5 %) випадках, а у 5 (11,9 %) жінок групи обстеження констатовано 677С→Т мутацію гена *MTHFR* (гомозиготний генотип 677С/С). При вивченні 1298А→С поліморфізму гена *MTHFR* гомозиготний дикий тип 1298А/А виявлено у 19 (45,2 %) жінок, гетерозиготний тип 1298А/С — у 17 (40,5 %). У 6 (14,3 %) обстежених жінок

встановлено гомозиготний за мутантним алелем 1298С/С генотип *MTHFR*. Що стосується 66А→G поліморфізму гена *MTRR*, то гомозиготний дикий тип 66А/А констатовано у 6 (14,3 %) жінок, гетерозиготний 66А/G — у 24 (57,1 %) випадках, гомозиготний за мутантним алелем 66G/G генотип *MTRR* виявлено у 12 (28,6 %) жінок із ВДНТ плода в анамнезі. Комбінацію гомозиготного типу мутації за 677С→Т поліморфізмом гена *MTHFR* та 66А→G поліморфізмом гена *MTRR* мали 4 (9,5 %) жінки. Частоту генотипів і алелів за поліморфізмами С677Т і А1298С гена *MTHFR* та А66G гена *MTRR* серед жінок групи обстеження наведено у табл. 1.

Враховуючи отримані дані щодо частоти поліморфізмів *MTHFR* С677Т і *MTRR* А66G, ми дослідили частоту їх компаундів (табл. 2).

Таблиця 1

Частота генотипів і алелів за поліморфізмами С677Т і А1298С гена *MTHFR* та А66G гена *MTRR* серед жінок із вродженими дефіцитами нервової трубки плода в анамнезі

Ген	Локус	Генотипи й алелі	абс.	%
<i>MTHFR</i>	С677Т	СС	20	47,6
		СТ	17	40,5
		ТТ	5	11,9
		С	57	67,9
		Т	27	32,1
	А1298С	АА	19	45,2
		АС	17	40,5
		СС	6	14,3
		А	55	65,5
		С	29	34,5
<i>MTRR</i>	А66G	АА	6	14,3
		AG	24	57,1
		GG	12	28,6
		А	36	42,9
		G	48	57,1

Таблиця 2

Частота розподілення компаундів поліморфізмів С677Т *MTHFR* / А66G *MTRR* у вибірці пацієнток

Компаунди С677Т/А66G	Кількість осіб	Частота, %
С677Т гетеро/А66G гетеро	11	26,2
С677Т гетеро/А66G гомо	4	9,5
С677Т гомо/А66G гетеро	1	2,4
С677Т гомо/А66G гомо	4	9,5
N/N	4	9,5
С677Т N/А66G гетеро	12	28,6
С677Т N/А66G гомо	4	9,5
С677Т гетеро/А66G N	2	4,8
С677Т гомо/А66G N	—	—

У досліджуваній вибірці частота компаундів С677Т гетеро/А66G гетеро (26,2 %) і С677Т N/А66G гетеро (28,6 %), а також С677Т гетеро/А66G гомо (9,5 %), С677Т гомо/А66G гомо (9,5 %), N/N (9,5 %) і С677Т N/А66G гомо (9,5 %) виявилася приблизно однаковою.

У дослідженні не було виявлено жодного випадку подвійної гомозиготності за 677 і 1298 сайтами *MTHFR* та гетерозиготного носійства мутації за одним із сайтів одночасно з гомозиготним носійством за іншим. На наш погляд, це можна пояснити тим, що мутантні алелі за 677 та 1298 сайтами *MTHFR* не можуть одночасно знаходитися на одній хромосомі через явище неврівноваженого зчеплення. Також не виявлено жодного випадку подвійної гомозиготності за 1298С алелем гена *MTHFR* та 66G алелем гена *MTRR*. Компаунд-гетерозиготами С677Т гетеро/А1298С гетеро та А1298С гетеро/А66G гетеро виявилася однакова кількість жінок — 8 (19 %).

Необхідно звернути увагу на той факт, що досліджені поліморфізми генів не пояснюють усіх випадків розвитку ВДНТ плода у жінок, у яких було виключено можливість впливу набутих чинників і наявність захворювань, здатних призводити до розвитку даної патології плода. У ролі таких факторів можуть виступати спадкові чинники, зокрема функціональні поліморфізми за генами, що безпосередньо реагують на чинники зовнішнього середовища, генами рецепторів фолатів, генами білків-транспортів фолатів [13; 14]. Втім, для перевірки даного припущення є необхідним додаткове дослідження. Тому вважаємо за доцільне подальше вивчення ролі поліморфізмів генів *CBS*, *MTHFD1*, *RFC1*, *Pax3*, *neurofibromin1*, *grainyhead-like-3*, *FOLR1*, *FOLR3* з сімейства *PAX*, *T*, *PDGFRA*, *BRCA1* та інших у розвитку ВДНТ плода, а також вивчення частоти мутантних алелів зазначених генів у популяції Південної України з метою відпрацювання індивідуального, патогенетично обґрунтованого підходу до профілактики даної патології плода у матерів із генетичною схильністю.

Висновки

1. Найчастішими дефектами нервової трубки плода у вибірці жінок Одеського регіону є спинномозкова грижа (52 %) плода попереково-крижової локалізації та аненцефалія (44 %); у переважній більшості випадків ВДНТ мають ізольований характер (96 %).

2. Найбільш частим генетичним чинником формування ВДНТ плода у жінок Південного регіону України є 66A→G поліморфізм гена *MTRR* (частота мутантного алеля у вибірці сягає 57,1 %).

3. Одночасне знаходження мутантних алелів за 677 та 1298 сайтами гена *MTHFR* на одній хромосомі не встановлено.

4. Подальше дослідження поліморфних алелів генів фолатного метаболізму та циклу метіоніну необхідне для розуміння чинників розповсюдження спадково-обумовлених вроджених дефектів нервової трубки у популяції з метою відпрацювання нових підходів до їх ефективної профілактики.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Иванов В. И.* Дисрегуляционная наследственная патология / В. И. Иванов, Л. Я. Левина, Л. М. Константинова // Дисрегуляционная патология ; под ред. Г. Н. Крыжановского. – М., 2002. – Гл. IV. – С. 112–126.
2. *Kibar Z.* Toward understanding the genetic basis of neural tube defects / Z. Kibar, V. Capra, P. Gros // *Clinical Genetics*. – 2007. – Vol. 71, N 4. – P. 295–310.
3. *Применение* фолиевой кислоты для профилактики дефектов нервной трубки у плода / В. Г. Вахарловский, Д. В. Воронин, К. А. Соколов [и др.] // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2008. – Т. LVII, № 2. – С. 4–9.
4. *Cavalli P.* Inositol supplementation in pregnancies at risk of apparently folate-resistant NTDs / *Birth Defects Research. Part A* / P. Cavalli, S. Tedoldi, B. Riboli // *Clinical and Molecular Teratology*. – 2008. – Vol. 82, Issue 7. – P. 540–542.
5. *Northrup H.* Spina bifida and other neural tube defects / H. Northrup, K. A. Volcik // *Curr. Probl. Pediatr.* – 2000, Nov-Dec. – Vol. 30 (10). – P. 313–332.
6. *Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects* / S. S. Pacheco, C. Braga, A. Impieri de Souza, J. N. Figueiroa // *Revista de Saude Publica*. – 2009. – Vol. 43, N 4. – P. 63–70.
7. *Caffeine intake and risk of neural tube defects.* *Birth Defects Research. Part A* / P. Cavalli, U. Cavallari, V. Unfer, G. Tonni // *Clinical and Molecular Teratology*. – 2011. – Vol. 91, Issue 1. – P. 67.
8. *Молекулярна епідеміологія* : монографія / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, В. Й. Кресюн [та ін.] ; за ред. акад. НАМН України В. М. Запорожана. – О. : Одес. держ. мед. ун-т, 2010.
9. *Микитенко Д. О.* Формування фенотипу лікарської резистентності: теорія, методологія та прогноз / Д. О. Микитенко. – Херсон : ПП Вишесирський, 2008.
10. *Запорожан В. М.* Набуті та генетичні форми тромбофілії у патогенезі акушерської патології / В. М. Запорожан, В. І. Лінніков // *Інтегративна антропологія*. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 3–7.
11. *Medina M.* Poles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions / M. Medina, J. Uradiales, M. Amores-Sauches // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268 (14). – P. 3871–3882.
12. *Микитенко Д. О.* Роль гомоцистеїну в розвитку патології вагітних і природжених аномалій плода / Д. О. Микитенко, О. І. Тимченко // *Педіатрія, акушерство та гінекологія*. – 2009. – Т. 71, № 4. – С. 90–94.
13. *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase* / P. Frosst, H. J. Blom, R. Milos [et al.] // *Nat. Genet.* – 1995. – Vol. 10. – P. 111–113.
14. *Hassold T.* Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extrachromosome 21 / T. Hassold, S. Sherman // *Clin. Genet.* – 2000. – Vol. 57. – P. 95–100.
15. *Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism as Maternal Risk Factors for Down Syndrome* [Text] / C. A. Hobbs, S. L. Sherman, P. Yi [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 67. – P. 623–630.