

УДК 616.8-00:611.832

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ И РИСК РАЗВИТИЯ
ДЕФЕКТОВ НЕРВНОЙ ТРУБКИ В КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Н.М. Алдашева, С.Дж. Боконбаева, Е.М. Мамбетсадыкова, Х.М. Сушанло

Изучен полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в полных (отец, мать, ребенок) и неполных семьях (мать, ребенок), в которых ребенок имел порок невральнoй трубки в виде спинно-мозговых грыж или в сочетании с другими ВПР.

Ключевые слова: фермент MTHFR; полиморфизм; генотип; дефекты нервной трубки.

GENETIC POLYMORPHISM OF MTHFR AND RISK
OF NEURAL TUBE DEFECTS IN KYRGYZ POPULATION

N.M. Aldasheva, S.Dzh. Bokonbaeva, E.M. Mambetsadykova, Kh.M. Sushanlo

The article considers methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) gene polymorphism in traditional (father, mother, child) and incomplete (mother, child) families, in which the child had any neural tube defect as spinal hernias or in combination with other malformation.

Keywords: MTHFR enzyme; sense mutations; polymorphism; genotype, neural tube defect.

Дефект нервной трубки – одна из наиболее распространенных врожденных аномалий, составляющая до трети от всех врожденных пороков развития (ВПР) [1–3]. Многочисленные исследования последних лет демонстрируют влияние нарушений обмена фолатов и метионинового цикла в патогенезе многих пороков развития, в том числе и ДНТ. Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) в метаболизме фолатов играет ключевую роль. Существует ряд аллельных вариантов гена MTHFR, приводящих к тяжелой недостаточности фермента. Наибольшее практическое значение имеют два полиморфизма гена MTHFR: C677T и A1298C. В ряде исследований было выявлено, что мутация 677T снижает активность фермента MTHFR. Так, у гомозигот по полиморфному аллелю активность фермента *in vitro* снижена на 70 %, а у гетерозигот – на 35 % [4].

A1298C полиморфизм гена MTHFR также снижает активность фермента, но в меньшей степени, чем C677T. Согласно некоторым исследованиям, индивидуумы, являющиеся компаунд-гетерозиготами по аллелям 677T и 1298C (генотип 677CT/1298AC), имеют снижение активности фермента на 40–50 % и биохимический профиль, схожий с профилем гомозиготных носителей аллеля 677T [4].

Большое число исследований посвящено взаимосвязи полиморфизма генов фолатного обмена с пороками развития плода, в частности с дефектами нервной трубки. Однако результаты этих исследований противоречивы и неоднозначны [5–8]. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение роли полиморфизмов A1298C и C677T и их комбинации как риск фактора ДНТ в кыргызской популяции.

Материал и методы. Для проведения генетического исследования ассоциации полиморфизмов C677T (прямой праймер -5' – TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA-3', обратный праймер -5'- AGGACGGTTCGGTGAGAGTG-3') и A1298C (прямой праймер -5'- CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC-3', обратный праймер - 5'- CATGTCCACAGCATGGAG-3') гена MTHFR нами проведены генетические исследования в 20 полных семьях (отец, мать, ребенок) и 10 неполных семьях (мать, ребенок), в которых ребенок имел порок невральнoй трубки, чаще всего в виде изолированной СМГ или в сочетании с другими ВПР – основная группа. 46 детей без ВПР, рожденных от 2-й и более беременности, и их мамы (n = 47) составили контрольную группу. ДНК выделялась из клеток крови с использованием набора для экстракции ДНК NucleonBACC3

Таблица 1 – Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов С677Т и А1298С гена МТНFR больной и контрольной группы у матерей

Локус	Аллели и генотипы	Больные (мама), n = 30 (%)	Контроль (мама), n = 47 (%)	χ^2	p	ОШ	ДИ 95%
А1298С гена МТНFR	А	42 (70)	81 (0,86)	4,99	0,025	0,37	(0,17–0,84)
	С	18 (30)	13 (14)			2,67	(1,19–5,97)
	АА	13 (43,3)	34 (72)	7,30	0,026	0,29	(0,11–0,77)
	АС	16 (53,3)	13 (28)			2,99	(1,14–7,81)
	СС	1 (3,3)	0	5,32	0,021	4,83	(0,19–122,6)
	АС + СС	17 (57)	13 (28)			3,42	(1,30–8,97)

Таблица 2 – Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов С677Т и А1298С гена МТНFR больной и контрольной группы у родителей

Локус	Аллели и генотипы	Больные (мама + папа), n = 50 (%)	Контроль (мама), n = 47 (%)	χ^2	p	ОШ	ДИ 95%
А1298С гена МТНFR	А	70 (70)	81 (86)	6,44	0,011	0,37	(0,18–0,77)
	С	30 (30)	13 (14)			2,67	(1,29–5,51)
	АА	23 (46)	34 (72)	8,31	0,016	0,32	(0,14–0,76)
	АС	24 (48)	13 (28)			2,41	(1,03–5,63)
	СС	3 (6)	0	5,89	0,015	7,00	(0,35–139,4)
	АС+СС	27 (54)	13 (28)			3,07	(1,32–7,17)

Таблица 3 – Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов С677Т и А1298С гена МТНFR больной и контрольной группы у детей

Локус	Аллели и генотипы	Больные (дети), n = 30 (%)	Контроль (дети), n = 46 (%)	χ^2	p	ОШ	ДИ 95%
А1298С гена МТНFR	А	41 (68)	76 (83)	3,41	0,065	0,45	(0,21–0,98)
	С	19 (32)	16 (17)			2,20	(1,02–4,73)
	АА	12 (40)	33 (72)	9,67	0,0079	0,26	(0,1–0,69)
	АС	17(57)	10 (22)			4,71	(1,72–12,88)
	СС	1 (3)	3 (6)	6,32	0,012	0,49	(0,05–4,99)
	АС + СС	18 (60)	13 (28)			3,81	(1,44–10,07)

(“Amersham Pharmacia Biotech”, Швеция). Определение полиморфизма гена С677Т МТНFR осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров и последующей рестрикцией полученных ПЦР продуктов ферментом Hinf I. В результате рестрикции образовывались рестрикционные фрагменты: СС 198 п. н.; ТТ 175 + 23 п. н., СТ 198 + 175+23 п. н., которые разделялись с помощью электрофореза в 3%-ном агаровом геле. Сканирование геля и анализ полученных результатов осуществлялись гель-документирующей системой GelDocIT (UVP, Великобритания).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы STATISTICA 6,0 и пакета стандартных программ GraphPadPrismv. 5.0.

Результаты и их обсуждение. Сравнение генотипов и аллелей полиморфизма С677Т в основной группе и группе контроля не выявляет

достоверной разницы ни у детей, ни у их родителей.

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма А1298С в основной и контрольной группах приведено в таблицах 1–3. Среди матерей основной группы достоверно чаще встречались мутантные АС- и СС-генотипы, а в контрольной группе – АА-генотип ($\chi^2 = 7,3$; $p < 0,05$). Гомозиготный мутантный генотип СС был выявлен лишь у одной мамы и двух отцов больных детей и не был выявлен ни в одном случае среди матерей контрольной группы. Среди детей основной группы достоверно чаще встречались АС- и СС-генотипы, а “дикий” генотип АА – в контрольной группе ($\chi^2 = 9,67$; $p < 0,01$). Мутантная аллель “с” как у мам, так и у детей также достоверно чаще встречалась в основной группе ($\chi^2 = 6,67$, $p < 0,01$).

Среди всех обследованных детей установлены 6 из 9 возможных гаплотипических вариантов гена МТНFR по исследуемым полиморфизмам, а среди

Таблица 4 – Распределение комбинированных генотипов и ОШ полиморфизмов С677Т, А1298С гена МТНFR у родителей

Комбинация генотипов С677Т, А1298С гена МТНFR	Больные (мама + папа), n = 50 (%)	Контроль (мама), n = 47 (%)	ОШ (ДИ 95%)	χ^2/p
С677С/ А1298А	8 (0,16)	17 (0,36)	Ref.	
С677С/ А1298С	13 (0,26)	5 (0,11)	5,52 (1,46–20,91)	5,26/0,022
С677С/ С1298С	1 (0,02)	0 (0,00)	-	-
С677Т/ А1298А	15 (0,30)	15 (0,32)	2,12 (0,70–6,41)	1,15/0,28
С677Т/ А1298С	10 (0,20)	7 (0,15)	3,04 (0,84–10,92)	1,98/0,16
С677Т/ С1298С	2 (0,04)	0 (0,00)	-	-
Т677Т/ А1298А	0 (0,00)	2 (0,04)	-	-
Т677Т/ А1298С	1 (0,02)	1 (0,02)	2,12 (0,12/38,51)	0,08/0,79
Т677Т/ С1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-

Таблица 5 – Распределение комбинированных генотипов и ОШ полиморфизмов С677Т, А1298С гена МТНFR у матерей

Комбинация генотипов С677Т, А1298С гена МТНFR	Больные (мама), n = 30 (%)	Контроль (мама), n = 47 (%)	ОШ (ДИ 95%)	χ^2/p
С677С/ А1298А	6 (0,20)	17 (0,36)	Ref.	
С677С/ А1298С	8 (0,27)	5 (0,11)	4,53 (1,06–19,41)	3,03/0,082
С677С/ С1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-
С677Т/ А1298А	7 (0,23)	15 (0,32)	1,32 (0,36–4,82)	0,01/0,92
С677Т/ А1298С	8 (0,27)	7 (0,15)	3,24 (0,82–12,83)	1,84/0,17
С677Т/ С1298С	1 (0,03)	0 (0,00)	-	-
Т677Т/ А1298А	0 (0,00)	2 (0,04)	-	-
Т677Т/ А1298С	0 (0,00)	1 (0,02)	-	-
Т677Т/ С1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-

Таблица 6 – Распределение комбинированных генотипов и ОШ полиморфизмов С677Т, А1298С гена МТНFR у детей

Комбинация генотипов С677Т, А1298С гена МТНFR	Больные (ребенок), n = 30 (%)	Контроль (ребенок), n = 46 (%)	ОШ (ДИ 95%)	χ^2/p
С677С/ А1298А	3 (0,10)	13 (0,28)	Ref.	
С677С/ А1298С	8 (0,27)	6 (0,13)	5,79 (1,12–29,86)	3,23/0,072
С677С/ С1298С	1 (0,03)	3 (0,06)	1,44 (0,11–19,23)	0,17/0,67
С677Т/ А1298А	6 (0,20)	14 (0,30)	1,86 (0,38–9,00)	0,15/0,70
С677Т/ А1298С	9 (0,30)	4 (0,09)	9,75 (1,74–54,55)	5,60/0,018
С677Т/ С1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-
Т677Т/ А1298А	3 (0,10)	6 (0,13)	2,17 (0,33–14,06)	0,11/0,74
Т677Т/ А1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-
Т677Т/ С1298С	0 (0,00)	0 (0,00)	-	-

родителей – 8 (таблицы 4–6). ТТсс-гаплотип, содержащий 4 мутантных аллеля, не наблюдался ни в одном случае, ни среди детей, ни среди родителей обеих групп. СТсс иТТас, содержащие 3 мутантных аллеля, не были выявлены как в контрольной, так и основной группах детей.

Обнаружена более высокая частота гаплотипа ССас как среди детей с ДНТ, так и их родителей.

Однако разница была достоверна только между родителями и контролем ($p < 0,01$). В группе детей достоверно чаще встречался гаплотип СТас ($\chi^2 = 5,60$; $p < 0,05$).

Как известно, в основе нарушений функциональной активности гена МТНFR лежат его полиморфизмы, наибольшее практическое значение из которых имеют С677Т и А1298С. Аллели

677Т и 1298С гена МТНFR связаны с пониженной активностью фермента МТНFR, что приводит к легкой гипергомоцистеинемии и нарушению процессов метилирования ДНК, которые могут вызвать развитие врожденных аномалий [9, 10]. На функциональные проявления полиморфизмов С677Т и А1298С могут оказывать влияние различные факторы – этногеографические особенности, окружающая среда, характер питания, образ жизни и многие другие. В связи с этим становятся понятными столь неоднозначные результаты исследований, проводимых в разных странах. Отсутствие ассоциативной связи полиморфизма С677Т с риском развития ДНТ в наших исследованиях совпадает с рядом исследований [8, 11, 12], хотя имеются работы с противоположным результатом [6, 13]. Полиморфизм А1298С изучен в меньшей степени в отношении риска развития ВПР, в том числе и ДНТ. В нашем исследовании была выявлена достоверная ассоциативная связь между А1298С-генотипом и риском развития ДНТ, что совпадает с исследованиями, проведенными среди казахской и турецкой популяций [7, 13]. Согласно нашим исследованиям, обнаружена более высокая частота гаплотипа ССас как среди детей с ДНТ, так и среди их родителей. Однако разница была достоверна только между группами родителей ($p < 0,01$). В группе детей достоверно чаще встречался гаплотип СТас ($\chi^2 = 5,60$; $p < 0,05$).

Ранее было показано, что у лиц с комбинированной гетерозиготностью гена МТНFR активность фермента МТНFR снижается аналогично гомозиготному состоянию (677ТТ). При этом уровень гомоцистеина у этих лиц выше, чем у лиц, имеющих гетерозиготность только по С677Т, либо только по А1298С [4, 14]. Более частое обнаружение Стас-гаплотипа в основной группе детей согласуется с этим положением. ТТсс – гаплотип, содержащий 4 мутантных аллеля, не наблюдался ни в одном случае, ни среди детей, ни среди родителей обеих групп. СТсс и ТТас, содержащие 3 мутантных аллеля не были выявлены как в контрольной, так и основной группах детей. Это подтверждают гипотезу Isotalo et al. (2000) о том, что комбинированные мутации вызывают повреждение или гибель плода [15].

Таким образом, результаты нашего исследования выявили, что А1298С полиморфизм гена МТНFR является риск-фактором развития ДНТ в кыргызской популяции. Комбинированная гетерозиготность по обоим полиморфизмам является дополнительным обогащающим фактором.

В ряде работ было показано, что применение фолиевой кислоты женщинами в периконцепционный период может модифицировать проявления генетического полиморфизма. Это диктует необ-

ходимость продолжения исследований в этом направлении.

Литература

1. *Penchaszadeh V.B.* Preventing congenital anomalies in developing countries // *Community Genet.* 2002. Vol. 5. P. 61–69.
2. *Андреева Л.П.* Наследственные и врожденные болезни: вклад в детскую заболеваемость и инвалидность, подходы к профилактике / Л.П. Андреева, Н.П. Кулешов, Г.П. Мутовин и др. // *Педиатрия.* 2007. Т. 86. № 3. С. 8–14.
3. *Yaliwal L.V. and Desai R.M.* Methylenetetrahydrofolatereductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects // *Indian J HumGenet* 2012; 18: 122–124.
4. *Weisberg I.* A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolatereductase (МТНFR) associated with decreased enzyme activity / I. Weisberg, P. Tran, B. Christensen et al. // *Mol Genet Metab.* 1998. № 64 (3). P. 169–72.
5. *Shaw G.M., Rozen R., Finnell R.H. et al.* Maternal vitamin use. Genetic variation of infant methylenetetrahydrofolatereductase and a risk factor for spina bifida // *Am J Epidemiolog.* 1998. Vol. 148. P. 30–37.
6. *Van der Put N.M., Steegers-Theunissen R.P., Frost P. et al.* Mutated methylenetetrahydrofolatereductase as a risk factor for spina bifida // *Lancet.* 1995. Vol. 346. P. 1070–71.
7. *Boduroglu K., Alikasifoglu M., Anar B. et al.* Analysis of МТНFR 1298А > С in addition to МТНFR 677С > Т polymorphism as a risk factor for neural tube defects in the Turkish population // *The Turkish Journal of Pediatrics.* 2005; 47: 327–333.
8. *Mornet E., Muller F., Lenois -Furet A. et al.* Screening of the С677Т mutation on the methylenetetrahydrofolatereductase gene in French patients with neural tube defects // *Hum Gene.* 1997. № 100. P. 512–514.
9. *Rosenberg N.A.* Genetic structure of human population / N.A. Rosenberg, J.K. Pritchard, J.L. Weber et al. // *Science.* 2002. Vol. 298 (5602). P. 2381–2385.
10. *Rosenquist T.H.* Homo cysteine induces congenital defects of heart and neural tube: effect of folic acid / T.H. Rosenquist, S.A. Ratashak, J. Selhub // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. Vol. 93. P. 3111–3128.
11. *Boduroglu K., Alikasifoglu M., Anar B. et al.* Association of the 677С→Т mutation on the methylenetetrahydrofolatereductase gene in Turkish patients with neural tube defects // *J Child Neurol.* 1999. № 14. P. 159–161.
12. *Morrison K., Papapetrou C., Hol F.A. et al.* Susceptibility to spina bifida; an association study

- of five candidate genes // *Ann Hum Genet.* № 1998. № 62. P. 379–396.
13. Махмутова Ж.С. Популяционно-генетический анализ полиморфизма гена метилентетрафолат-редуктазы при дефектах нервной трубки в казахской популяции: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ж.С. Махмутова. М., 2007. 21 с.
14. Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rosen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity // *Mol. Genet Metab.* 1998. № 64. P. 169–172.
15. Isotalo F.A., Wells G.A., Donnelly J.G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolatereductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C Mutations // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 67. P. 986–990.