УДК 616.831-009.11-053.2:577.21

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА С3435Т ГЕНА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ 1-ГО ТИПА С ДВИГАТЕЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПРИ ДЕТСКОМ ЦЕРЕБРАЛЬНОМ ПАРАЛИЧЕ

Борзилов Е.Е.[1, 2], Полоников А.В.[1], Трубникова Е.В.[1], Курцева Е.С.[2], Толбатова Н.О.[3], Анцупова Г.В.[2]

[1] ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра биологии, медицинской генетики и экологии, г. Курск, 305041, ул. К. Маркса, 3, тел./факс: (4712)58-81-47. E-mail: medbiol@kursknet.ru.
[2] ОБУЗ «Курская областная детская больница № 2».
[3] ОБУЗ «Областной перинатальный центр» г. Курска.

Обследовано 126 детей с церебральным параличом (ЦП) и 126 здоровых детей русской национальности, проживающих на территории Курской области. На примере полиморфизма С3435Т гена *MDRI* исследована вовлеченность генов ферментов антиоксидантной защиты в патогенез ЦП и их влияние на тяжесть двигательных нарушений у больных с данной патологией. Образцы ДНК детей генотипировались по полиморфизму С3435Т гена *MDRI* методом ПЦР-ПДРФ. Стратифицированный анализ с учетом тяжести двигательных нарушений согласно классификации GMFCS–E&R позволил выявить ассоциацию гомозиготного вариантного генотипа 3435 ТТ с повышенным риском развития ЦП с тяжелыми двигательными нарушениями (OR=2,54 (95%CI 1,08-6,01), p=0,03). Таким образом, было установлено, что полиморфизм С3435Т может являться важным модификатором степени тяжести двигательных нарушений у детей с ЦП.

Ключевые слова: детский церебральный паралич, мультифакториальное заболевание, детоксикация, антиоксидантная система.

CONNECTION OF C3435T POLYMORPHISM OF MULTI-DRUG-RESISTANCE GENE WITH MOVEMENT DISORDERS AMONG CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY

Borzilov E.E.[1, 2], Polonikov A.V.[1], Trubnikova E.V.[1], Kurtseva E.S.[2], Tolbatova N.O.[3], Antsupova G.V.[2]

[1] Kursk state medical university, department of biology, medical genetics and ecology, Kursk, 305041, K. Marks's str., 3, tel./fax: (4712)58-81-47 E-mail: medbiol@kursknet.ru
[2] Kursk regional children's hospital №2
[3] Kursk regional perinatal center

126 children with cerebral palsy (CP) and 126 healthy children were recruited for the study. Both tested groups of children were of Russian nationality, citizens of Kursk region. The involving of antioxidant protection enzyme genes in pathogenesis of CP and their influence on degree of movement disorders was estimated on the example of polymorphism C3435T of *MDRI* gene. Extracted DNA was genotyped for C3435T polymorphism of *MDRI* gene by PCR-RFLP. Stratification analysis with the regard of movement disorders degree according to GMFCS-E&R revealed the association of homozygous mutant genotype 3435 TT with the raised risk for CP with heavy movement disorders (OR=2,54 (95%CI 1,08-6,01), p=0,03). Thus, it was shown that C3435T polymorphism may be considered as an important modification factor for the degree of movement disorders among children with CP.

Key words: infantile cerebral palsy, multifactorial disease, detoxification, antioxidant system.

Введение. Детские церебральные параличи (ДЦП) – это гетерогенная группа клинических синдромов, общим для которых является не прогрессирующее нарушение двигательных функций и позы [3; 9]. Несмотря на несомненные успехи современной акушерской помощи и неонатологии, частота ДЦП остается высокой и составляет 1,5–3 больных на 1000 новорожденных [9]. В связи с тем что зачастую определить конкретную причину, вызвавшую нарушение развития центральной нервной системы не представляется

возможным, большинство исследователей относят ДЦП к мультифакториальному заболеванию (МФЗ) [3; 9]. В то время как роль перинатальных факторов риска в развитии ДЦП изучена весьма подробно, генетическим аспектам данной патологии уделяется не достаточно внимания. Работы по изучению токсических влияний на формирование ДЦП как МФЗ являются малочисленными и в большинстве случаев ограничиваются выявлением различных интоксикаций матери во время беременности, а также профессиональных вредностей. В этой связи представлялось важным применить к ДЦП токсикогенетическую концепцию МФЗ, предложенную нами ранее [4]. Оптимальными ДНК-маркерами для изучения токсикогенетической компоненты МФЗ являются полиморфизмы генов ферментов биотрансформации и антиоксидантной защиты. В различных исследованиях показана вовлеченность указанных генов в патогенез таких МФЗ, как бронхиальная астма, гипертоническая болезнь, мужское бесплодие [2], язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, а также многих других заболеваний. В нашей предыдущей работе была установлена тенденция к накоплению среди детей с ДЦП с легкими двигательными нарушениями гетерозиготного генотипа 158 ЕК гена флавин-содержащей монооксигеназы 3 типа [5], относящейся к 1-й фазе биотрансформации.

Цель исследования. Оценить на молекулярно-генетическом уровне вовлеченность 3-й фазы метаболизма ксенобиотиков (т.е. элиминации) в развитие ДЦП.

Материалы и методы. Материалом для клинического и молекулярно-генетического исследования послужила выборка из 126 не родственных детей с ДЦП и 126 условно здоровых детей. Все обследованные дети были русской национальности, уроженцы Курской области. Обследование больных ДЦП проводилось на базе МУЗ «Городская детская больница № 2» и санатория им. Феодосия Печерского. Обследование детей группы контроля проводилось во время плановых медосмотров в поликлиниках г. Курска. Группы здоровых и больных детей были сопоставимы по полу и возрасту.

Диагноз ДЦП устанавливался на основании неврологического статуса, данных анамнеза, сведений из медицинской документации (амбулаторная карта, история болезни). В соответствии с классификацией Gross Motor Function Classification System – Expanded and Revised (GMFCS – E&R) больные ДЦП были разделены на 5 классов в зависимости от возможности передвигаться в пространстве [6]. Учитывая немногочисленность исследуемой выборки, а также схожесть 1 и 2 классов, 4 и 5 классов GMFCS, указанные классы были объединены. Таким образом, больные ЦП оказались разделены на 3 группы: 1 – возможно самостоятельное передвижение в пространстве (76 детей); 2 – передвижение в пространстве возможно с использованием ручных средств передвижения (трости, «крабы») (24 детей); 3 – передвижение больного в пространстве за счет опоры собственных нижних конечностей

невозможно в связи с выраженностью двигательных нарушений (26 детей).

Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма С3435Т гена *MDRI* проводили методом ПЦР-ПДРФ согласно протоколу, описанному в литературе [7]. Результаты электрофоретического разделения в агарозном геле фрагментов ДНК, полученных после рестрикции продуктов гидролиза, содержащих полиморфизм С3435Т гена *MDRI,* представлены на рисунке 1.

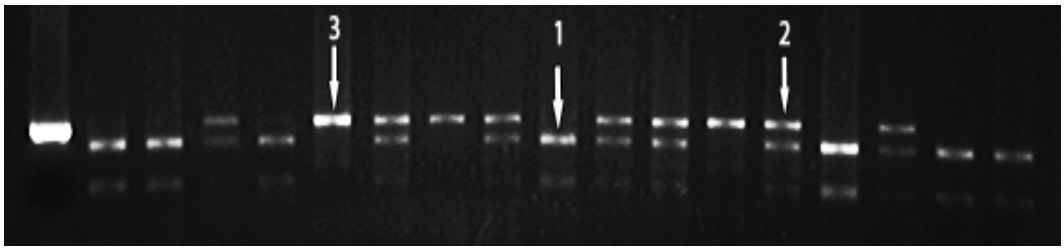

Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, содержащих полиморфизм С3435Т гена *MDRI:* 1 – 3435 СС («дикий» генотип); 2 – 3435 СТ (гетерозиготный генотип); 3 – 3435 ТТ (мутантный генотип).

Результаты исследования и их обсуждение. Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при тестировании на равновесие Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в выборках больных ДЦП и здоровых детей использовали критерий χ^2 Пирсона. При количестве наблюдений в выборке менее 10 учитывали поправку Йетса на непрерывность. Уровень значимости принимали $p<0,05$.

Частоты генотипов полиморфизма С3435Т гена *MDRI* в объединенной группе пациентов находились в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($p>0,05$). В то же время среди детей с ДЦП отмечена тенденция к снижению уровня наблюдаемой гетерозиготности, не достигавшая уровня статистической значимости (Но=0,42, Не=0,49, $\chi^2=2,58$, $p>0,05$).

Различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма С3435Т гена *MDRI* между группами здоровых детей и больных церебральным параличом не выявлено (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма С3435Т гена *MDRI* в группах здоровых детей и больных церебральным параличом

Распределение частот аллелей исследуемого полиморфизма		
Исследуемые группы	3435С	3435Т
Больные ДЦП (n=125)	0,433	0,567

Здоровые (n=126)	0,409	0,591	
Критерий различий, χ^2 (p)	0,29 (0,59)		
Распределение частот генотипов исследуемого полиморфизма			
Исследуемые группы	3435CC	3435CT	3435TT
Больные ДЦП (n=126)	28 (22,2%)	53 (42,1%)	45 (35,7%)
Здоровые (n=126)	21 (16,7%)	61 (48,4%)	44 (34,9%)
Критерий различий, χ^2 (p)	1,24 (0,27)	1,03 (0,31)	0,02 (0,9)

Анализ частот генотипов здоровых детей и больных ДЦП в зависимости от возможности самостоятельно передвигаться показал, что среди больных детей с выраженными двигательными нарушениями имеет место статистически значимое увеличение частоты мутантного генотипа 3435 TT гена *MDRI* (OR=2,54; 95%CI 1,08-6,01) по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение частот генотипов полиморфизма C3435T гена *MDRI* среди больных ДЦП с учетом возможности самостоятельного передвижения и в группе здоровых детей

Исследуемые группы	**I группа (n=76)**			**II группа (n=24)**			**III группа (n=26)**		
	C/C	**C/T**	**T/T**	**C/C**	**C/T**	**T/T**	**C/C**	**C/T**	**T/T**
Больные ЦП, n (%)	19 (25)	33 (43,4)	24 (31,6)	7 (29,2)	11 (45,8)	6 (25)	2 (7,7)	9 (34,6)	15 (57,7)
Здоровые дети, n (%)	21 (16,7)	61 (48,4)	44 (34,9)	21 (16,7)	61 (48,4)	44 (34,9)	21 (16,7)	61 (48,4)	44 (34,9)
Критерий различий, χ^2 (p)	2,07 (0,15)	0,47 (0,49)	0,24 (0,63)	1,33 (0,25)	0,05 (0,82)	0,5 (0,48)	0,74 (0,39)	1,14 (0,29)	**4,71 (0,03)**

Отметим, что из 15 больных ДЦП, обладавших вариантным 3435 TT генотипом, 10 индивидов были недоношенными, и 5 детей рождены на сроке 38-40 недель.

Ген *MDRI* расположен на хромосоме 7q21.1 и кодирует Р-гликопротеин – фермент, относящийся к III фазе биотрансформации ксенобиотиков [7]. Одной из наиболее значимых мутаций в гене *MDRI* является замена последовательности нуклеотидов в позиции 3435 в 26-м экзоне (C3435T) [8]. Несмотря на то что данная мутация в гене MDRI не сопровождается изменением структуры кодируемого Р-гликопротеина, в различных исследованиях показано снижение генной экспрессии в 2-3 раза при наличии 3435 TT-генотипа [10]. Р-гликопротеин

экспрессируется в эпителиальных клетках печени, почках и кишечнике. Особенно важную роль играет выработка данного пептида в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, посредством чего регулируется поступление многих фармпрепаратов из крови в паренхиму головного мозга [10]. Но, несомненно, наиболее значимым местом выработки и одновременно точкой приложения данного фермента является субапикальная часть клеток эпителия сосудистых сплетений желудочков головного мозга, где Р-гп участвует в элиминации токсических продуктов метаболизма из крови в цереброспинальную жидкость [8]. Учитывая высокую частоту пери- и интравентрикулярных кровоизлияний среди недоношенных детей (31-55% при гестационном возрасте менее 35 недель [1]), можно предположить, что на фоне органических изменений в сосудистых сплетениях желудочков головного мозга возникает предпосылка к нарушению работы Р-гликопротеин опосредованного транспорта продуктов метаболизма. Очевидно, что недостаточность выведения эндогенных метаболитов в ликвор в условиях мощного оксидантного стресса создает условия для накопления и токсического воздействия ксенобиотиков на структуры головного мозга. В то же время интерпретировать полученные результаты необходимо с осторожностью, учитывая относительно небольшой объем исследованных выборок. Чтобы сделать окончательный вывод о вовлеченности гена *MDRI* в развитие ДЦП, необходимо проведение исследования на выборках значительно большего объема, а также исследование функционального анализа генной экспрессии гена *MDRI*.

Заключение. Таким образом, в группе больных ДЦП установлена ассоциация мутантного генотипа 3435 TT гена *MDRI* с риском развития тяжелых двигательных нарушений.

Список литературы

1. Ватолин К.В. Ультразвуковая диагностика заболеваний головного мозга у детей. – М. : Видар-М, 2000. – 136 с.
2. Изучение роли полиморфизмов Y113H и H139R гена микросомальной эпоксидгидролазы в детерминации идиопатического бесплодия и нарушений сперматогенеза у мужчин // А.В. Полоников, С.Л. Ярош, Е.В. Кохтенко [и др.] // Курский науч.-практич. вестн. «Человек и его здоровье». – 2009. – № 4. – С. 95-105.
3. Лильин Е.Т., Иваницкая И.Н. Современные представления об этиологии детского церебрального паралича // Российский педиатрический журнал. – 2002. – № 3. – С. 35-40.
4. Полоников А.В. Эколого-токсикогенетическая концепция мультифакториальных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения / А.В. Полоников, В.П. Иванов, М.А. Солодилова // Мед. генетика. – 2008. – № 11. – С. 3-20.

5. Связь полиморфизма E158K гена флавинсодержащей монооксигеназы-3 с тяжестью двигательных нарушений у детей с церебральным параличом / Е.Е. Борзилов, В.П. Иванов, А.В. Полоников и соавт. // Медицинская генетика. – 2010. – Т. 9. – № 10. – С. 35-38.
6. Content validity of the expanded and revised Gross Motor Function Classification System / R.J. Palisano, P. Rosenbaum, D. Bartlett, M.H. Livingston // Dev. Med. Child Neurol. – 2008. – Vol. 50. – № 10. – P. 744-750.
7. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects / I. Cascorbi, T. Gerloff, A. Johne [et al.] // Cl. Pharmacol. and Ther. – 2001. – Vol. 69. – P. 169–174.
8. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple bequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo / S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter [et al.] // Prnc. Nut1. Acud. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 3473-3478.
9. Krageloh-Mann, I. Cerebral palsy update / I. Krageloh-Mann, C. Cans // Brain & Development. – 2009. – Vol. 31. – P. 537–544.
10. Miller D.S. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy / D.S. Miller, B. Bauer, A.M.S. Hartz // Pharmacol. Rev. – 2008. – Vol. 60. – P. 196–209.

Рецензенты

Иванов Владимир Петрович, д.мед.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, заведующий кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Королев Владимир Анатольевич, д.биол.н., профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Курск.