

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЗАДЕРЖКЕ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ПЛОДА

Ни А. Н.¹, Фадеева Т. Ю.¹, Васильева Т. Г.², Зернова Е. С.¹, Шишацкая С. Н.¹

¹ГБОУ ВПО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток;

²ГАУЗ Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи, Владивосток, e-mail:kate-zernova@mail.ru

Представлены результаты исследования частоты генетических маркёров фолатного цикла у 24 новорождённых с гипотрофическим, гипопластическим типами задержки внутриутробного развития (ЗВУР). Изучены полиморфные системы гена метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR* С677С, С677Т, Т677Т; гена метионинсинтазы *MTR* А2756А, А2756Г, G2756G; гена метионинсинтазы-редуктазы *MTRRR* G66G, G66А, А66А. В результате проведенного анализа была установлена ассоциация возникновения ЗВУР у новорождённых с полиморфизмом Т677Т гена *MTHFR*, G2756G гена *MTR* и А66А гена *MTRR*, особенно это актуально при гипотрофическом варианте задержки развития плода и у мальчиков. В результате исследования установлена сила детерминации – низкая для А66А гена *MTRR*, средняя – для полиморфизма 677Т гена *MTHFR*. Определение полиморфизмов С677Т гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR*, А66А гена *MTRR* можно рассматривать в качестве объективного критерия риска формирования ЗВУР. Выявление групп риска, проведение генетического анализа обмена фолиевой кислоты позволяют подобрать эффективный комплекс профилактики ЗВУР.

Ключевые слова: фолатный цикл, новорожденный, задержка внутриутробного развития, гены *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*.

PATHOGENETIC ASPECTS OF METABOLIC FOLIC ACID DURING INTRAUTERINE GROWTH RETARDATION OF THE FETUS

Ni A. N.¹, Fadeeva T. Y.¹, Vasilyeva T. G.², Zernova E. S.¹, Shishackaya S. N.¹

¹Pacific State Medical University, Vladivostok,

²Regional Clinical Center of specialized types of medical care, Vladivostok, e-mail: kate-zernova@mail.ru

The article presents the results of a study of genetic markers frequency folate cycle in 24 neonates with hypotrophic, hypoplastic types of intrauterine growth retardation. Systems studied polymorphic gene *MTHFR* (metylenetetrahydrofolate reductase): S677S, C677T, T677T; gene *MTR* (methionine synthase): A2756A, A2756G, G2756G; gene *MTRR* (methionine synthase reductase): G66G, G66A, A66A. The result of the analysis were established association of occurrence of intrauterine growth retardation neonates with gene polymorphism T677T *MTHFR*, G2756G *MTR* gene and gene A66A *MTRR*, especially important when hypotrophic variant of intrauterine growth retardation and boys. The study found the power of determination - low to A66A *MTRR* gene, the average – for the *MTHFR* gene polymorphism 677T. Determination of gene polymorphisms C677T *MTHFR*, A2756G gene *MTR*, *MTRR* A66A gene can be regarded as an objective criterion the risk of formation of intrauterine growth retardation. Identifying risk, genetic analysis of folic acid metabolism allows selecting an effective set of preventive of intrauterine growth retardation fetus.

Keywords: folate cycle, newborn, intrauterine growth retardation. genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*.

Одним из неблагоприятных осложнений течения беременности является задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР). Последнее время наблюдается тенденция к росту количества детей, рожденных с признаками ЗВУР. По данным ВОЗ число новорожденных с задержкой развития колеблется от 31,1 % в Центральной Азии до 6,5 % в развитых странах Европы.

Задержка внутриутробного развития плода является многодисциплинарной проблемой не только неонатологии, но и педиатрии в целом. В литературе имеется большое

количество исследований, указывающих на то, что дети, рожденные с признаками задержки внутриутробного развития плода, значительно чаще отстают в физическом и психомоторном развитии, чем дети с нормальными антропометрическими данными. Кроме того, у них выше показатели заболеваемости и смертности.

Причины, приводящие к развитию задержки внутриутробного развития плода, многообразны. Принято различать три основные группы факторов риска: материнские, плацентарные, плодовые, а по другим данным четыре: материнские, плацентарные, социально-биологические и наследственные (генетические) [7].

Несмотря на активное изучение факторов, ассоциированных с формированием задержки внутриутробного развития плода, многие вопросы рассматриваются неоднозначно и остаются нерешенными. Это обусловлено полиэтиологичностью данного состояния, многочисленными сложными патогенетическими механизмами, лежащими в её основе [7]. Важную роль в этом отводят нарушениям метаболического, нутритивного статуса матери и будущего ребёнка, уровня обеспеченности их отдельными микро- и макроэлементами [3, 6].

Актуальность изучаемой проблемы обусловлена прежде всего тем, что восприимчивость к различным заболеваниям сердечно-сосудистой системы, аллергическим заболеваниям, патологии желудочно-кишечного тракта и другим социально-значимым болезням в будущем детерминируется не только взаимодействием между генами и окружающей средой, но и дополняется новыми данными о ключевой роли эпигенетического репрограммирования [8].

Открытые в последнее время важнейшие генетические факторы многих мультифакториальных состояний, таких как дефекты фолатного обмена, тромбофилия, нарушения системы детоксикации, иммунологическая несостоятельность, могут выступать в качестве ведущих причин тяжелой акушерской патологии, что ассоциируется с задержкой внутриутробного развития плода, тяжёлым гестозом, невынашиванием беременности.

При этом подчёркивается особая роль фолиевой кислоты, которая участвует в качестве кофактора в большом количестве клеточных реакций, в их дифференцировке, жизнеобеспечении [1, 2].

Ключевым ферментом фолатного цикла является метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), который переводит фолиевую кислоту в ее активную форму 5-метилтетрагидрофолат.

В последние годы акушерскую патологию, включая задержку внутриутробного развития плода, привычные выкидыши, гестозы, преждевременную отслойку нормально расположенной плаценты, хроническую плацентарную недостаточность, связывают с мутацией гена фермента MTHFR.

Существует ряд аллельных вариантов этого гена, вызывающих тяжелую недостаточность фермента, но большинство из этих вариантов редки. Практическое значение имеют два полиморфизма: С677Т в экзоне 4 и А1298С в экзоне 7.

Установлена прямая связь полиморфизма 677Т гена МТНFR с уровнем гомоцистеина в крови, с его фетотоксическим, тератогенным эффектом [1], аллель 2757G гена метионинсинтазы ассоциируется с риском нарушения белкового обмена у плода, формированием различных хромосомных аномалий, полиморфизмы гена метионинсинтазы-редуктазы связаны с нарушением процесса метилирования ДНК и синтеза нуклеиновых кислот [5].

Таким образом, полиморфизм генов, ответственных за обмен фолиевой кислоты, может негативно сказываться на росте и делении клеток плода и плаценты. При сочетании неполноценных функционально ослабленных аллелей на фоне действия неблагоприятных (провоцирующих) факторов внешней среды такие полиморфизмы могут играть важную роль в патологии беременности и нарушении эмбрионального развития.

Несмотря на это, многие патогенетические аспекты ассоциации нарушений фолатного обмена и задержки внутриутробного развития плода изучены недостаточно. Поэтому дальнейшие исследования в этой области особенно актуальны.

Цель нашего исследования – установить дополнительные факторы риска развития нарушений фолатного обмена при различных формах задержки внутриутробного развития плода.

Материал и методы исследования

Диагноз задержки внутриутробного развития (ЗВУР) выставлен на основании общепринятых критериев диагностики, результатов анализа биофизического состояния плода в динамике прогрессирования беременности [9]. Учитывались следующие данные: рождение плода с массой менее 10-го перцентиля, относительно показателей, характерных для данного гестационного срока; морфологический индекс зрелости, отстающий на 2 и более недель от истинного гестационного возраста [7].

При этом использовались данные ультразвукового исследования (УЗИ аппарат «Алоса 1700» с конвексным абдоминальным трансдюсером (3,5 МГц), оснащённый акушерской программой): фетометрии; плацентографии с определением двигательной активности, тонуса плода, количества околоплодных вод. В неонатальном периоде всем детям была проведена соматометрия с использованием центильных таблиц физиологических параметров, имеющих градацию по периодам гестационного возраста [7]. Нами было обследовано 24 новорождённых ребенка со ЗВУР (основная группа). Гипопластический вариант

(симметричный тип) ЗВУР был верифицирован у 8 детей, гипотрофический (асимметричный вариант) – у 16 новорождённых детей.

Всем обследованным новорожденным пациентам было проведено исследование генотипов фолатного цикла. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов пуповинной крови стандартным методом при помощи протеиназы К с последующей фенольной экстракцией и осаждением этанолом. Анализ полиморфных вариантов специфических участков генома проводился с использованием методов полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [4, 10]. Полученные данные сравнивали с аналогичными показателями здоровых новорожденных (контрольная группа), прошедших обследование в ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦСО РАМН г. Томск. В ходе работы были изучены полиморфные системы гена *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктаза): С677С, С677Т, Т677Т с интерпретацией частоты генотипов: С/С – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме, С/Т – гетерозиготная форма полиморфизма и Т/Т – мутантный вариант полиморфизма, связанный с увеличением риска заболевания; гена *MTR* (метионинсинтаза): А2756А, А2756G, G2756G (АА – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме, АG – гетерозиготная форма полиморфизма, GG – мутантный вариант полиморфизма, связанный с увеличением риска заболевания, в гомозиготной форме); гена *MTRR* (метионинсинтаза-редуктаза): G66G, G66А, А66А(GG – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме, АG – гетерозиготная форма полиморфизма, АА – мутантный вариант полиморфизма, связанный с увеличением риска заболевания, в гомозиготной форме). Оценку результатов и комплексный анализ полученных данных проводили методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической (M) её ошибки (m), доверительного коэффициента Стьюдента (t) при заданном уровне значимости (p) и степени достоверности. Сравнительный анализ изучаемых показателей в разных группах проводился с использованием непараметрического метода Фишера. Статистическая обработка материала проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ для исследований «Excel-2003» и «Statistica 6.0» for Windows. Различия для всех видов анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении генетического исследования полиморфных систем генов фолатного цикла у новорожденных детей с различными типами ЗВУР были получены следующие результаты, представленные в таблице.

Ранжирование генотипов *MTR* у новорождённых основной группы показало, что частота генотипа А2756А существенно не отличалась от контрольных значений и составила 54,2 % относительно 58,3 % в контроле. Гетерозиготная форма полиморфизма А2756G с

одинаковой частотой диагностировалась в обеих группах сравнения (37,5 % и 38,0 %, соответственно; $p > 0,05$). Однако мутантный генотип полиморфизма *MTR* в гомозиготной форме (G2756G) в 2,2 раза чаще встречался у пациентов со ЗВУР относительно контрольной группы (8,3 % и 3,7 %, соответственно; $p < 0,05$). При этом не была установлена достоверность различий частоты аллелей *MTR* в группах исследования. Аллель 2756A выявлена у 72,95 % больных детей (в контроле – 77,3 % пациентов), 2756G зарегистрирована у 27,05 % новорожденных по сравнению с контрольной группой, где 2756G определялась у 22,7 % обследованных пациентов.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфизма *MTR*G2756G с частотой формирования задержки внутриутробного развития плода. Вероятно, это обусловлено многочисленными биохимическими эффектами на уровне клеток, межорганными взаимосвязями, детерминированными данным геном и усиливающимися при дефиците витамина В₁₂. В проведённых ранее исследованиях доказана ассоциация мутантного полиморфизма *MTR* с развитием внутриутробной гипоксии, хронической фетопланцитарной недостаточности, нарушением синтеза белка, нуклеиновых кислот. И в первую очередь это обусловлено нарушением метаболизма гомоцистеина с развитием системных проявлений тромбофилии [1,5].

В структуре полиморфизмов гена *MTHFR* доминировали дети с гетерозиготным генотипом изученного полиморфизма С677Т. Они составили 62,5 % среди обследованных новорождённых с ЗВУР (в контроле – 40,7 %; $p < 0,001$). Нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме С677С имели 25,0 % детей основной группы относительно контроля – 52,0 % ($p < 0,001$). Мутантный вариант полиморфизма Т677Т был выявлен у 12,5 % пациентов (контроль – 7,3 %; $p < 0,05$). Таким образом, было установлено, что при ЗВУР достоверно чаще, чем у здоровых новорождённых, регистрировались генотипы СТ, ТТ, но реже – СС. Частота аллелей гена *MTHFR* отличалась в группах пациентов. Новорождённые с задержкой физического развития в 1,3 раза реже имели аллель 677С, чем пациенты контрольной группы (56,25 % и 72,3 % обследованных пациентов, соответственно; $p < 0,01$), но при задержке внутриутробного развития в 1,6 раза чаще выявляли мутацию 677Т (43,75 % и 27,7 % новорожденных, соответственно; $p < 0,01$).

Вероятно, в основе отдельных причин развития ЗВУР лежат эпигенетические адаптивные изменения в процессе метилирования ДНК, нуклеиновых кислот, обусловленные нарушением фолатного цикла, нарушением белкового обмена [8]. Выявленная частота мутантных вариантов полиморфизма в гомозиготной форме, вероятно, свидетельствует о наличии у женщин, родивших детей со ЗВУР, генетически запрограммированных рисков неблагоприятного исхода беременности. С эти связаны риски

преждевременных родов, хронической фетоплацентарной недостаточности, гипергомоцистеинемии, тромбофилии, хронической внутриутробной гипоксии плода, тяжёлого гестоза [1]. На внутриутробное развитие ребёнка влияет не только материнский, но и плодный генотип [9]. Всё вышесказанное является одной из многих причин, лежащих в основе патогенеза формирования ЗВУР.

В процессе анализа акушерского анамнеза женщин, родивших детей с ЗВУР, нами была установлена высокая распространённость среди них табакокурения (66,7 %). По отдельным данным [2] в III триместре беременности уровень гомоцистеина в крови у курящих женщин в 1,5 раза выше, чем у некурящих ($p < 0,005$), уровень фолиевой кислоты в крови ниже в 3 раза ($p < 0,005$), а витамина В₁₂ – на 20 % ($p < 0,05$). Однако ассоциация частоты полиморфизмов генов, ответственных за обмен фолиевой кислоты, с курением будущей матери чётко не установлена. Можно предположить, что высокий риск фетального табачного синдрома среди обследованных нами детей с задержкой внутриутробного развития, вероятно, ассоциирован с реализацией патологических процессов у генетически предрасположенных (наличие мутантных полиморфизмов) пациентов на фоне гиповитаминоза В₁₂ и пониженного уровня фолиевой кислоты.

Частота генотипов и аллелей генов фолатного цикла у новорожденных

Группы	Генотипы								
Контрольная группа – здоровые новорожденные (n=300)	MTHFR; %			MTR; %			MTRR; %		
	CC	CT	TT	AA	AG	GG	GG	GA	AA
	52,0	40,7	7,3	58,3	38,0	3,7	30,0	52,3	17,7
Новорожденные с ЗВУР (n=24)	25,0	62,5	12,5	54,2	37,5	8,3	17,4	47,8	34,8
Группы	Генотипы								
Контрольная группа – здоровые новорожденные (n=300)	MTHFR; %			MTR; %			MTRR; %		
	C=72,3 T=27,7			A=77,3 G=22,7			G=56,2 A=43,8		
	MTHFR; %			MTR; %			MTRR; %		
Новорожденные с ЗВУР (n=24)	C=56,25 T=43,75			A=72,95 G=27,05			G=41,3 A=58,7		

При оценке влияния полиморфизма генов фолатного обмена на развитие вариантов задержки внутриутробного развития плода отмечена более высокая частота встречаемости полиморфизма С677Т гена *MTHFR* (52,4 %), А2756G гена *MTR* (28,6 %), А66А гена *MTRR* (30,0 %) у новорождённых с гипотрофическим вариантом задержки развития. Кроме того, полиморфный вариант С677Т гена *MTHFR* (42,6 %), А2756G гена *MTR* (23,8 %), А66А гена *MTRR* (35,0 %) чаще диагностировался у новорождённых мужского пола. Корреляционный анализ установил, что изучаемые полиморфизмы оказывают существенное влияние на частоту формирования задержки внутриутробного развития и степень ее тяжести. При этом были выявлены соответствующие корреляции относительно полиморфизма 677Т гена *MTHFR* ($r +0,62$; $r + 0,54$, $p < 0,05$, соответственно); А66А гена *MTRR* ($r +0,34$; $r +0,36$, $p < 0,05$).

В результате проведенного анализа была установлена ассоциация полиморфизмов Т677Т гена *MTHFR*, G2756G гена *MTR* и А66А гена *MTRR* с частотой формирования ЗВУР. Наше исследование показало, что данные генотипы чаще были зарегистрированы при гипотрофическом варианте течения ЗВУР, а также они чаще выявлялись у пациентов мужского пола.

Выводы

1. В результате проведенного исследования показано, что метаболические процессы, детерминированные генами фолатного обмена *MTHFR* и *MTRR*, играют важную роль в патогенезе формирования ЗВУР. По результатам нашего исследования установлена низкая сила детерминации для А66А гена *MTRR*, а также средняя сила для полиморфизма 677Т гена *MTHFR*.
2. Установлено, что задержка внутриутробного развития чаще всего формируется при наличии полиморфизмов аллельных генов С677Т у 62,5 % больных новорожденных и Т677Т гена *MTHFR* у 12,5 % наблюдавшихся пациентов, G2756G гена *MTR* у 8,3 % испытуемых новорожденных, А66А гена *MTRR* у 34,8 % родившихся младенцев.
3. Определение полиморфизмов С677Т гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR*, А66А гена *MTRR* можно рассматривать в качестве объективного критерия риска формирования ЗВУР, для обоснования патогенетических подходов в проведении своевременных превентивных мероприятий.

Список литературы

1. Ассоциация полиморфных аллелей генов фолатного обмена с привычным невынашиванием беременности / А. В. Поляков, С. М. Тверская, Т. С. Бескорвайная, С. В. Гудзенко // Проблемы репродукции. – 2006. – № 1. – С. 53-60.
2. Биохимические и генетические критерии фолатного метаболизма и нарушения эмбриогенеза человека / Е. Г. Деревянчук, Е. В. Машкина, К. А. Коваленко и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 4.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4738> (дата обращения: 29.02.2016).
3. Концентрация микроэлементов в системе «мать-плацента-плод» на территориях с различным уровнем антропогенной нагрузки / Е. К. Артемьева, Н. П. Сетко, В. Б. Сапрыкин, И. Р. Веккер // Микроэлементозы в медицине. – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 1-3.
4. Назаренко М. С. Частота полиморфизмов С677Т и А1298 С гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR) на раннем этапе индивидуального развития человека / М. С. Назаренко, В. П. Пузырев, И. Н. Лебедев // Генетика. – 2006. – V. 42, № 5. – P. 711-717.
5. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / И. Н. Фетисова, А. С. Добролюбов, М. А. Липин, А. В. Поляков // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – № 1. – С. 23-28.
6. Применение фолиевой кислоты для профилактики дефектов зарощения нервной трубки у плода / В. Г. Вахарловский, Д. В. Воронин, К. А. Соколов и др. // Журнал акушерства и женских болезней. – 2008. – № 2. – С. 4-11.
7. Шабалов Н. П. Основы перинатологии. – М.: МЕДпресс-информ, 2002. – 312 с.
8. Шуматова Т. А., Приходченко Н. Г., Оденбах Л. А., Ефремова И. В. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека / Т. А. Шуматова, Н. Г. Приходченко, Л. А. Оденбах, И. В. Ефремова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – P. 39-43.
9. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss / A. Lissak, A. Sharon, O. Fruchter et al. // Am J Obstet Gynecol. – 1999. – № 181. – P. 126-130.
10. Shi M. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2 // Birth Defects Res A ClinMolTeratol. – 2003. – V. 67, № 8. – P. 545-549.