Частота генетических маркеров фолатного цикла у новорожденных с задержкой внутриутробного развития

А.Н. Ни, Т.Ю. Фадеева, Т.Г. Васильева, С.Н. Шишацкая

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»; ГАУЗ «Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи», Владивосток

The frequency of genetic markers of the folate cycle in newborns with intrauterine growth retardation

A.N. Ni, T.Yu. Fadeeva, T.G. Vasilyeva, S.N. Shishatskaya

Pacific State Medical University, Vladivostok; Regional Clinical Center of Specialized Medical Care, Vladivostok

Представлены результаты исследования частоты генетических маркеров фолатного цикла у 24 новорожденных с гипотрофическим, гипопластическим типами задержки внутриутробного развития. Изучены полиморфные системы гена метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR* C677C, C677T, T677T; гена метионинсинтазы *MTR* A2756A, A2756G, G2756G; гена метионинсинтазы-редуктазы *MTRR* G66G, G66A, A66A. В результате проведенного анализа была установлена ассоциация возникновения задержки внутриутробного развития у новорожденных с полиморфизмом T677T гена *MTHFR*, G2756G гена *MTR* и A66A гена *MTRR*, особенно это актуально при гипотрофическом варианте задержки развития плода и у мальчиков. Выявление групп риска, проведение генетического анализа обмена фолиевой кислоты позволяют подобрать эффективный комплекс профилактики задержки внутриутробного развития.

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

The article presents the results of an investigation of the frequency of genetic markers of the folate cycle in 24 neonates with the hypotrophic or hypoplastic types of intrauterine growth retardation (IUGR). The investigators examined the polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene, such as S677S, C677T, and T677T, the methionine synthase (*MTR*) gene, such as A2756A, A2756G, and G2756G, and the methionine synthase reductase (*MTRR*) gene, such as G66G, G66A, and A66A. The analysis established an association of the occurrence of IUGR in neonates with *MTHFR* T677T, *MTR* G2756G, and *MTRR* A66A polymorphisms; this is especially relevant in the hypotrophic type of IUGR and in boys. Identification of risk groups and genetic analysis of folic acid metabolism allow the choice of an effective package of measures to prevent IUGR.

Key words: fetus, newborn, intrauterine growth retardation, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* genes, folate cycle.

Задержка внутриутробного развития плода является объективным критерием неблагоприятного течения беременности, процесса созревания различных органов и систем, функциональных, адаптационных возможностей детского организма в раннем неонатальном периоде, в процессе роста и развития ребенка в последующие годы. Задержка внутриутробного развития плода формируется под воздействием многочисленных факторов: материнских, плацентарных, социально-биологических, генетических [1]. Несмотря на активизацию исследований в данной области, внедрение современных методов пренатальной диагностики, частота задержки внутриутробного развития плода остается высокой. Особенно актуальна эта проблема в Дальневосточном федеральном округе, где ее частота превышает средние показатели по стране в 1,5–2 раза [2, 3]. Доказана важ-

ная роль в формировании плода нутритивного статуса, уровня обеспеченности отдельными микро- и макроэлементами [4, 5]. При этом подчеркивается особая роль фолиевой кислоты, которая участвует в качестве кофактора в большом количестве клеточных реакций, в их делении, в синтезе нуклеиновых кислот, ДНК. Дефицит фолиевой кислоты ассоциирован с невынашиванием беременности, формированием врожденных пороков развития нервной системы у плода, макроцитарной анемии, гипотрофии у детей, задержки их психомоторного развития [6–8]. Биохимические, клеточные эффекты фолиевой кислоты осуществляются через каскад генетически детерминированных ферментативных реакций, роль которых в формировании задержки внутриутробного развития плода изучена недостаточно [9].

Цель исследования — обосновать патогенетические подходы к диагностике задержки внутриутробного развития плода на основе изучения отдельных аспектов нарушения фолатного обмена у детей.

Характеристика детей и методы исследования

Обследованы 24 новорожденных с задержкой внутриутробного развития (основная группа исследования). Диагноз задержки внутриутробного развития поставлен на основании сопоставления клинико-анамнестических данных с показателями биофизи-

© Коллектив авторов, 2015

Ros Vestn Perinatol Pediat 2015; 3:63–66

Адрес для корреспонденции: Ни Антонина Николаевна — д.м.н., проф. кафедры педиатрии, иммунологии и аллергологии Тихоокеанского государственного медицинского университета

Фадеева Татьяна Юрьевна — асп. той же кафедры

Шишацкая Светлана Николаевна — к.м.н., доц. той же кафедры

Васильева Татьяна Геннадьевна — д.м.н., зав. Краевой детской консультативной поликлиникой Краевого клинического центра специализированных видов медицинской помощи

690002 Владивосток, пр. Острякова, д. 2

ческого профиля плода в динамике прогрессирования беременности [10, 11]. При этом использовались данные ультразвукового исследования: фетометрии, плацентографии, определения физиологических параметров, включающего в себя регистрацию дыхательных движений, двигательной активности, тонуса плода, определение количества околоплодных вод (ультразвуковой аппарат Aloca 1700 с конвексным абдоминальным трансдюсером 3,5 МГц, оснащенный акушерской программой). У новорожденных форму задержки внутриутробного развития диагностировали (дополнительно) по данным соматометрии в сравнении с должностными параметрами для гестационного возраста с использованием соответствующих центильных таблиц. Гипопластический вариант (равномерное отставание плода в длине и массе тела с первых недель гестации) был выявлен у 8 детей. Гипотрофический (снижение массы при нормальной длине тела) – у 16 новорожденных.

У всех пациентов исследовали генотип 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 рестриционных фрагментов [12, 13]. Полученные данные сравнивали с аналогичными показателями здоровых новорожденных (контрольная группа), прошедших обследование в ГУ «НИИ медицинской генетики» ТНЦСО РАМН Томска [14]. Были изучены полиморфные системы гена *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктаза): С677С, С677Т, Т677Т; гена *MTR* (метионинсинтаза): А2756А, А2756Г, G2756G; гена *MTRR* (метионинсинтаза-редуктаза): G66G, G66А, А66А.

Оценку полученных результатов и комплексный анализ данных проводили методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической (M), ее ошибки (m), доверительного коэффи-

циента Стьюдента (t) при заданном уровне значимости (p) и степени достоверности. Сравнительный анализ изучаемых показателей в разных группах проводился с использованием непараметрического метода Фишера. Статистическую обработку материала выполняли с помощью специализированных пакетов прикладных программ для исследований Excel 2003 и Statistica 6.0 for Windows [15]. Различия для всех видов анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении генетического исследования была установлена вариабельность частоты генов фолатного цикла у новорожденных с задержкой внутриутробного развития (см. таблицу). В структуре полиморфизмов гена *MTHFR* превалировал с гетерозиготный генотип изученного полиморфизма С677Т – 62,5%. Сочетание С677С и Т677Т составило соответственно 25 и 12,5%. При сравнительном анализе с показателями контрольной группы выявлено, что при задержке внутриутробного развития чаще, чем у здоровых новорожденных, регистрировались генотипы СТ ($p < 0,001$), ТТ ($p < 0,05$), но реже – СС ($p < 0,001$). Частота аллелей гена *MTHFR* различалась в группах пациентов. Новорожденные с задержкой физического развития в 1,3 раза реже имели аллель 677С, чем пациенты контрольной группы (56,25 и 72,3% соответственно; $p < 0,01$), но при задержке внутриутробного развития в 1,6 раза чаще выявляли мутацию 677Т (43,7 и 27,7% соответственно; $p < 0,01$).

Частота генотипов *MTR* у новорожденных основной группы распределилась следующим образом. А2756А – 54,2%, А2756Г – 37,5%, G2756G – 8,3% в контроле – соответственно 58,3% ($p > 0,05$), 38% ($p > 0,05$), 3,7% ($p < 0,05$). Распространенность аллелей *MTR* была практически одинаковой во всех группах исследования. При задержке внутриутробного развития аллель 2756А составил 72,9% (у здоровых детей – 77,3%), 2756G – 27,05% (у здоровых – 22,7%).

Частота генотипов и аллелей генов фолатного цикла у новорожденных (в %)

Новорожденные, $n=300$ (Томск)									
Генотипы	<i>MTHFR</i>			<i>MTR</i>			<i>MTRR</i>		
	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	17,73
Частота аллеля (гена)	C=72,3 T=27,7			A=77,3 G=22,7			G=56,2 A=43,8		
Новорожденные с задержкой внутриутробного развития плода, $n=24$ (Владивосток)									
Генотипы	<i>MTHFR</i>			<i>MTR</i>			<i>MTRR</i>		
	CC	CT	TT	AA	AG	GG	GG	GA	AA
	25,0	62,5	12,5	54,2	37,5	8,3	17,4	47,8	34,8
Частота аллеля (гена)	C=56,25 T=43,75			A=72,95 G=27,05			G=41,3 A=58,7		

Были получены достоверные различия в частоте генотипов гена *MTRR* в группах сравнения. Так, С66G выявлялись у 17,4% детей с признаками задержки внутриутробного развития (в контроле — 30,0%; $p < 0,05$), С66А — у 47,8% новорожденных основной группы (против 52,3%; $p > 0,05$), А66А — 34,8% (против 17,7%; $p < 0,001$). При этом отмечено увеличение частоты мутантного аллеля 66А у новорожденных с синдромом задержки внутриутробного развития по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

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%) у новорожденных с гипотрофическим вариантом задержки развития. Кроме того, полиморфный вариант С677Т гена *MTHFR* (42,6%), А2756G гена *MTR* (23,8%), А66А гена *MTRR* (35%) чаще диагностировался у новорожденных мужского пола. Корреляционный анализ установил влияние изучаемых полиморфизмов 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 возникновения задержки внутриутробного развития у новорожденных с полиморфизмом Т677Т гена *MTHFR*, G2756G гена *MTR* и А66А гена *MTRR*, особенно это актуально при гипотрофическом варианте задержки внутриутробного развития и у мальчиков. По данным проведенных ранее исследований, было выявлено, что полиморфизм 677Т гена *MTHFR* связан с дефектами развития плода [6,14]. Наличие гомозиготной формы 677Т/Т приводит к почти десятикратному повышению риска высокого

уровня в крови гомоцистеина, дающего фетотоксический, тератогенный эффект. Аллель 2757G гена *MTR* ассоциирован с риском фетопланцитарной недостаточности, нарушения белкового обмена у плода, формированием хромосомных аномалий. Патологический полиморфизм гена *MTRR* приводит к нарушению процесса метилирования ДНК и синтеза нуклеиновых кислот [16]. Особенно негативный эффект всех указанных изменений генотипов проявляется у детей при наличии дефицита витамина В₁₂, при ассоциации изученных полиморфизмов [17].

Выводы

При задержке внутриутробного развития у новорожденных отмечается более высокая частота полиморфизмов С677Т (62,5%), Т677Т (12,5%) гена *MTHFR*, G2756G (8,3%) гена *MTR*, А66А (34,8%) гена *MTRR* относительно здоровых детей.

Установлено наиболее выраженное влияние на формирование задержки внутриутробного развития биохимических механизмов, контролируемых генами *MTHFR* и *MTRR*. При этом установлены корреляции средней (677Т гена *MTHFR*) и умеренной силы (А66А гена *MTRR*) между распространенностью полиморфизма и частотой формирования задержки внутриутробного развития, степенью ее тяжести.

Определение полиморфизмов С677Т гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR*, А66А гена *MTRR* может являться дополнительным критерием диагностики задержки внутриутробного развития плода, ее клинического типа, обоснования патогенетических подходов в проведении превентивных и лечебных мероприятий.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.» при поддержке гранта по Госконтракту № 16.512.11.2072.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабалов Н.П. Основы перинатологии. М: МЕДпресс-информ 2002; 312. (Shabalov N.P. Fundamentals of Perinatology. Moscow: MEDpress-Infom 2002; 312.)
2. Сенькевич О.А. Микроэлементный дисбаланс в формировании патологии маловесных новорожденных на Дальнем востоке: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Хабаровск 2009; 28. (Senkevich O.A. Trace element imbalances in the formation of pathological low birth weight infants in the Far East: Avtoref. Dis. ... Dr. med. sciences. Khabarovsk 2009; 28.)
3. Артемьева Е.К., Сетко Н.П., Сапрыкин В.Б., Веккер И.Р. Концентрация микроэлементов в системе «мать—плацента—плод» на территориях с различным уровнем антропогенной нагрузки. Микроэлементозы в медицине. М: КМК 2004; 5: 4: 1–3. (Artemyeva E.K., Setko N.P., Saprykin V.B., Vekker I.R. The concentration of trace elements in the «mother-placenta-fetus» in the territory with different levels of anthropogenic load. Microelementoses in medicine. Moscow: KMK 2004; 5: 4: 1–3.)
4. Громова О.А. Критерии выбора витаминных и минеральных препаратов. Здравоохранение Урала 2003; 6: 24: 49–53. (Gromova O.A. Criteria for selection of vitamin and mineral preparations. Zdravookhranenie Urala 2003; 6: 24: 49–53.)
5. Kugelman A., Reichman B. Postdischarge infant mortality among very low birth weight infants: a population – based study. Pediatrics 2007; 120: 4: 788–794.
6. Вахарловский В.Г., Воронин Д.В., Соколов К.А. и др. Применение фолиевой кислоты для профилактики дефектов зародка нервной трубки у плода. Журн акуш и жен бол 2008; 2: 4–11. (Vaharlovsky V.G., Voronin D.V., Sokolov K.A. et al. The use of folic acid for the prevention of Neural tube defects in the fetus. Zhurn akush i zhen bol 2008; 2: 4–11.)
7. Поляков А.В., Тверская С.М., Бескорвайная Т.С., Гудзенко С.В. Ассоциация полиморфных аллелей генов фолатного обмена с привычным невынашиванием беременности. Пробл репрод 2006; 1: 53–60. (Polyakov A.V.,

- Tverskaya S.M., Beskorovainaya T.S., Gudzenko S.V. Association of polymorphic alleles of genes of folate metabolism with habitual miscarriage. *Probl reprod* 2006; 1: 53–60.)
8. *Доброхотова Ю.Э., Сухих Г.Т., Файзуллин Л.З. и др.* Роль гипергомоцистеинемии в генезе неразвивающейся беременности и начавшегося выкидыша. *Рус мед журн* 2005; 13: 17: 1110–1112. (Dobrokhotova J.E., Dry G.T., Faizullin L.Z. et al. The role of hyperhomocysteinemia in the genesis of developing pregnancy and miscarriage started. *Rus med zhurn* 2005; 13: 17: 1110–1112.)
 9. *Деревянчук Е.Г., Машкина Е.В., Коваленко К.А. и др.* Биохимические и генетические критерии фолатного метаболизма и нарушение эмбриогенеза человека. *Современные проблемы науки и образования* 2011; 4: www.science-education.ru/98-4738. (Derevyanchuk E.G., Mashkina E.V. Kovalenko K.A. et al. Biochemical and genetic criteria of folate metabolism and the violation of human embryogenesis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2011; 4: www.science-education.ru/98-4738.)
 10. *Кулаков В.И., Серов В.Н., Демидов В.Н. и др.* Алгоритм пренатального мониторинга. *Акуш и гин* 2000; 5: 56–59. (Kulakov V.I., Serov V.N., Demidov V.N. et al The algorithm of prenatal monitoring. *Akush i gin* 2000; 5: 56–59.)
 11. *Бескоровайна Т.С.* Влияние некоторых генетических факторов на нарушение репродукции у человека: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М 2005; 89. (Beskorovainaya T.S. Influence of some genetic factors on reproduction in humans violation: Avtoref. Dis. ... kand. med. sciences. Moscow 2005; 89.)
 12. *Lissak A., Sharon A., Fruchter O. et al.* Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 126–130.
 13. *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 Clin Mol Teratol* 2003; 67: 8: 545–549.)
 14. *Назаренко М.С., Пузырев В.П., Лебедев И.Н.* Частота полиморфизмов С677Т и А1298С гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) на раннем этапе индивидуального развития человека. *Генетика* 2006; 42: 5: 711–717. (Nazarenko M.S., Puzyrev V.P., Lebedev I.N. The frequency of polymorphisms C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate gene (MTHFR) at an early stage of development of the individual person. *Genetika* 2006; 42: 5: 711–717.)
 15. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М: МедиаСфера 2006; 312. (Rebrova O.U. Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA. Moscow: Mediasphere 2006; 312.)
 16. *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. *Тихоокеанский мед журн* 2013; 4: 39–43. (Shumatova T.A., Prikhodchenko N.G., Odenbach L.A., Efremova I.V. Role of the DNA methylation status in folate metabolism and in the development of pathological processes of humans. *Tikhookeanskiy med zhurn* 2013; 4: 39–43.)
 17. *Фетисова И.Н., Добролюбов А.С., Липин М.А., Поляков А.В.* Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека. *Вестник новых медицинских технологий* 2007; 1: 23–28. (Fetisova I.N., Dobrolubov A.S., Lipin M.A., Polyakov A.V. Polymorphism of genes of folate metabolism and human disease. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* 2007; 1: 23–28.)

Поступила 03.03.15