

Г.О. Яновська¹, О.Я. Гречаніна^{1,2}, Ю.Б. Гречаніна²
¹Харківський міжобласний медико-генетичний центр –
 центр рідкісних (орфанних) захворювань,
²Харківський національний медичний університет,
 м. Харків, Україна

АСОЦІАЦІЯ КЛІНІЧНИХ ОЗНАК ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ЦНС ТА ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G

Резюме. Найбільш частою причиною перинатальної патології нервової системи є гіпоксично-ішемічні ушкодження (ГІУ) ЦНС. На процеси, що супроводжують гіпоксію, мають вплив епігенетичні механізми регуляції активності генів. Серед них важливе місце займає фолатний цикл, залучений до метилування ДНК.

Мета роботи: вивчити вплив генетичного поліморфізму генів фолатного циклу на характер перебігу ГІУ ЦНС.

Матеріали та методи: обстежено 55 новонароджених з ГІУ ЦНС. Проведено дослідження поліморфних варіантів генів MTHFR C677T, MTRR A66G та MTR A2756G методом алель-специфічної ПЛР.

Результати. Дослідження поліморфних варіантів генів MTHFR C677T, MTRR A66G та MTR A2756G у обстежених дітей виявило наявність асоціацій цих поліморфізмів із особливостями перебігу ГІУ ЦНС. Так, генотип 677CT гену MTHFR асоційований із пренатальною гіпотрофією (30,4% випадків у порівнянні із 7,1% при 677CC генотипі, $p = 0,035$), а також із розвитком гідроцефального синдрому у віці після року (44,5%, $p = 0,032$). Мутантні алелі гену MTRR та алель 2756AG гену MTR знижували вірогідність пренатальної гіпотрофії. Її частота за наявності нормальної гомозиготи гену MTRR складала 45,5%, за наявності алелю 66AG – 8% ($p = 0,018$), алелю 66GG – 10,5% ($p = 0,043$). Встановлений зв'язок між поліморфними варіантами гену MTRR та судомами у новонароджених з ГІУ ЦНС: судоми були у 44% дітей з генотипом 66AG ($p = 0,043$) та у 58% з генотипом 66GG ($p = 0,01$), на відміну від 9% за наявності нормальної гомозиготи.

Висновки. Робота демонструє наявність впливу поліморфних варіантів генів MTHFR C677T, MTRR A66G на перебіг ГІУ ЦНС, доцільність їх дослідження при наявності перинатальної гіпоксії.

Ключові слова: перинатальний; гіпоксично-ішемічне ушкодження; поліморфні варіанти генів; фолатний цикл.

ВСТУП

Найбільш частою причиною перинатальної патології нервової системи є гіпоксично-ішемічні ушкодження (ГІУ) ЦНС. Вони є серед основних причин інвалідизації та дезадаптації дітей [1, 2]. На процеси, що супроводжують перинатальну гіпоксію, мають вплив епігенетичні механізми регуляції активності генів. Серед них важливе місце займає фолатний цикл, залучений до метилування ДНК [3]. Метилування впливає на такі фундаментальні процеси життєдіяльності клітини, як регуляція експресії генів і підтримка стабільності геному, відіграє важливу роль у формуванні та підтримці епігенетичної мінливості [4]. Ключовим ферментом фолатного циклу є метилентетрагідрофолат-редуктаза (MTHFR), який переводить фолієву кислоту в її активну форму 5 – метилтетрагідрофолат. Фер-

мент метіонін-синтаза (MTR) забезпечує відновлення метіоніну із гомоцистеїну. В процесі перетворення відбувається окислення кобаламіну і фермент MTR переходить у неактивний стан, але його функція відновлюється в процесі метилування за участю метіонінсинтази-редуктази (MTRR).

Вітчизняні вчені Гречаніна О. Я., Гречаніна Ю. Б., Гусар В. А. та ін. дослідили вплив генів фолатно-метіонінового циклу на маніфестацію багатьох спадкових та хронічних мультифакторіальних захворювань, а також описали їх роль в пренатальному програмуванні. Найважливішими тригерами, що призводять до порушення епігенезу є харчування, інфекції, стрес [3, 5, 6].

За даними Ment LR, Adén U, Lin A, поліморфні варіанти MTHFR підвищують ризик

внутрішньочерепних крововиливів при наявності перинатальної гіпоксії [7], інші автори (Kezurer N, Galron D, Golan HM) вказують, що дефіцит MTHFR призводить до підвищеної сприйнятливості мозку до неонатального стресу [8]. Більш висока частота 66GG і 66AG алелей поліморфізму MTRR A66G спостерігалась у жінок з прееклампсією [9, 10], яка є фактором ризику гіпоксичного ушкодження. Дослідження Marseglia L.M., Nicotera A., Salpietro V. et al. називають С677Т і А1298С поліморфізми гену MTHFR серед факторів ризику неонатальної енцефалопатії внаслідок перинатального гіпоксично-ішемічного інсульту, а також шлуночкової дилатації через помірну втрату об'єму білої речовини [11]. Однак роль поліморфних варіантів генів MTHFR та MTRR в етіопатогенезі ГІУ ЦНС ще остаточно не встановлена.

МЕТА РОБОТИ

Вивчити вплив генетичного поліморфізму генів фолатного циклу MTHFR C677T, MTRR A66G та MTR A2756G на частоту та характер перебігу ГІУ ЦНС.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Обстежено 55 дітей з ГІУ ЦНС. Дослідження поліморфних варіантів генів системи фолатного циклу MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G проводилось методом алель-специфічної ПЛР в реальному часі на апараті StratageneM*3005P, фірми Agilent Technologies. Статистична обробка даних проведена за допомогою програми статистичного аналізу Statistica 6. Для порівняння частот показників в групах використовувався точний критерій Фішера. Відмінності між порівнюваними величинами вважались значущими при $p < 0,05$.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ
ОБГОВОРЕННЯ**

Порівняння частот алельних сполучень поліморфних варіантів генів MTHFR C677T та MTRR A66G у дітей із ГІУ ЦНС та в популя-

ційній вибірці та у дітей з ГІУ ЦНС не виявили достовірних відмінностей (табл. 1).

Популяційні частоти цих генів були уточнені групою вчених – О. Я. Гречаніна, Ю. Б. Гречаніна, В.А. Гусар (Україна), R. Matalon (США), за результатами безвибіркового обстеження 200 новонароджених Харківської області [6].

Але відомо, що зниження активності ферментів фолатного циклу і недостатність кофакторів супроводжується порушенням метилювання, недостатність метильних груп може впливати на епігенетичний статус [4, 12], а звідси – впливати на метаболічні процеси, що змінюються при гіпоксичному ушкодженні. Ми припустили наявність залежності між особливостями перебігу ГІУ ЦНС та поліморфними варіантами MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G внаслідок впливу на метаболічні події, що супроводжують перинатальну гіпоксію. Було вивчено зв'язок між алельними сполученнями досліджених поліморфних варіантів генів та особливостями перебігу ГІУ ЦНС.

Серед патологічних станів в гострому періоді ГІУ ЦНС в обстеженій групі найбільш частими були церебральне пригнічення – 38 (69%), судоми – 23 (42%), гідроцефальний синдром (ГС) у 11 (20%), ВЧК – у 10 (18,2%). У 24 (43,6%) новонароджених стан ускладнився розвитком набряку головного мозку. 10 дітей (18,2%) народились із пренатальною гіпотрофією, постнатальна гіпотрофія відмічалась у 13 (23,6%) дітей. Анемія спостерігалась у 12 (21,8%) дітей.

Розрахунки показали, що алель 677СТ гену MTHFR був асоційований із підвищенням частоти пренатальної гіпотрофії (табл. 2), яка спостерігалась у 30,4% випадків гетерозиготності за поліморфізмом C677T та у 7,1% випадків за наявності нормального алелю ($p = 0,035$).

Вивчення вірогідних зв'язків між особливостями перебігу ГІУ та поліморфними варіантами MTRR A66G (табл. 3) виявило асоціацію між наявністю поліморфних варіантів та неонатальними судомами.

Таблиця 1

Частоти алельних сполучень генів MTHFR C677T, MTRR A66G при гіпоксично-ішемічному ушкодженні ЦНС та в популяційній вибірці

Поліморфізм		MTHFR C677T			MTRR A66G		
Алельне сполучення		CC	CT	TT	AA	AG	GG
ГІУ ЦНС n = 55	n	28	23	4	11	25	19
	%	51	41,8	7,2	20	45,5	34,5
Популяційна вибірка, n = 200	n	104	82	14	43	86	71
	%	52	41	7	21,5	43	35,5
P			0,51	0,56		0,46	0,55

Зв'язки між алельними сполученнями гену MTHFR C677T та особливостями перебігу гіпоксично-ішемічного ушкодження ЦНС

ОЗНАКА (ОГ, n = 55)	Дітей	MTHFR C677T, алельні сполучення					
		677CC n = 28		677CT n = 23		677TT n = 4	
		%	%	%	p	%	p
Гіпотрофія пренатальна	18,2	7,1	30,4	0,035*	0	0,76	
Гіпотрофія постнатальна	23,6	21,4	26	0,474	25	0,65	
Судоми неонатальні	42	42,9	43,5	0,59	25	0,46	
ВЧК	18,2	17,9	21,7	0,50	0	0,488	
Церебральне пригнічення	69	60,7	82,6	0,080	50	0,542	
Набряк головного мозку у новонародженого	43,6	39,3	47,8	0,372	25	0,515	
ГС у новонародженого	20	14,3	26,1	0,241	25	0,51	
Анемія	12	21,4	26,1	0,64	0	0,228	

Примітки: 1) * – статистично значуща різниця ($p \leq 0,05$);
 2) головний мозок;
 3) ВЧК – внутрішньочерепний крововилив;
 4) ГС – гідроцефальний синдром.

Таблиця 3

Зв'язки між алельними сполученнями гену MTRR A66G та особливостями перебігу гіпоксично-ішемічного ушкодження ЦНС

ОЗНАКА (ОГ, n = 55)	Дітей	MTRR A66G, алельні сполучення					
		66AA n = 11		66AG n = 25		66GG n = 19	
		%	%	%	p	%	p
Гіпотрофія пренатальна	18,2	45,5	8	0,018*	10,5	0,043*	
Гіпотрофія постнатальна	23,6	36,4	16	0,178	26,3	0,43	
Судоми неонатальні	42	9	44	0,043*	58	0,010*	
ВЧК	18,2	18	16	0,61	21	0,62	
Церебральне пригнічення	69	82	60	0,187	73,7	0,485	
Набряк головного мозку у новонародженого	43,6	45,5	32	0,342	52,6	0,5	
ГС у новонародженого	20	9	16	0,185	5,3	0,1	
Анемія	12	9	2 4	0,291	2 6,3	0,26	

Примітки: 1) * – статистично значуща різниця ($p \leq 0,05$);
 2) головний мозок;
 3) ВЧК – внутрішньочерепний крововилив;
 4) ГС – гідроцефальний синдром.

Судоми мали місце у 44 % новонароджених із алелем 66AG ($p = 0,043$), та у 58 % із алелем 66GG ($p = 0,010$) гену MTRR, в той час як за наявності нормального алелю їх частота склала 9 %.

Крім того, поліморфні варіанти гену MTRR A66G була асоційована із зменшенням вірогідності пренатальної гіпотрофії: її частота за наявності нормальної гомозиготи склала 45,5 %, при наявності гетерозиготи 8 % ($p = 0,018$), патологічної гомозиготи (алель 66GG) – 10,5 % ($p = 0,043$).

Проведено аналіз асоціацій між поліморфними варіантами гену MTR A2756G та перебігом ГІУ ЦНС (табл. 4). В процесі розрахунків виявлено, що алель 2756AG був асоційований із зниженням частоти пренатальної гіпотрофії у новонароджених ($p = 0,036$), яка зустрічалась у 28,6 % дітей з нормальним алелем.

Наступним етапом нашого дослідження була оцінка результатів катамnestичного спостереження дітей. У віці 1–2 роки затримка в розвитку (статокінетичного та / або психічного)

спостерігалась у 40,7 % дітей, у 14,8 % дітей був ГС, судоми мали місце у 11%, ДЦП у 11 % дітей. Дані стани можна визначити як несприятливі наслідки ГІУ ЦНС. Ми дослідили вплив поліморфних варіантів генів MTHFR C677T, MTRR A66G, та MTR A2756G на розвиток цих станів.

Пошук впливу поліморфних варіантів гену MTHFR C677T на частоту несприятливих наслідків ГІУ (табл. 5) виявив, що діти з генотипом 677CT мали підвищену вирогідність розвитку ГС в більш старшому віці. Він мав місце у 44,4 % дітей з 677CT генотипом, на відміну від 14,8 % за наявності 677CC генотипу ($p = 0,032$).

Таблиця 4

Зв'язок між алельними сполученнями гену MTR A2756G та особливостями перебігу гіпоксично-ішемічного ушкодження ЦНС

ОЗНАКА (ОГ, n = 52)	Дітей	Алельні сполучення гену MTR A2756G				
		2756AA n = 35	2756AG n = 12		2756GG n = 5	
	%	%	%	P	%	p
Гіпотрофія пренатальна	18,2	28,6	0	0,036*	0	0,217
Гіпотрофія постнатальна	23,6	20	16,7	0,585	40	0,311
Судоми неонатальні	42	34,3	58	0,131	60	0,264
ВЧК	18,2	23	8,3	0,259	20	0,689
Пригнічення ЦНС	69	74	50	0,117	10	0,258
Набряк ГМ у новонародженого	43,6	48,6	25	0,138	60	0,50
ГС у новонародженого	20	25,7	0	0,052	0	0,258
Анемія	12	25,7	16,7	0,418	20	0,63

Примітки: 1) * – статистично значуща різниця ($p \leq 0,05$);
 2) головний мозок;
 3) ВЧК – внутрішньочерепний крововилив;
 4) ГС – гідроцефальний синдром.

Таблиця 5

Зв'язки між алельними сполученнями гену MTHFR C677T та несприятливими наслідками гіпоксично-ішемічного ушкодження ЦНС

Несприятливі наслідки ГІУ ЦНС	MTHFR C677T (ОГ, n = 49)				
	C677C n = 27	C677T n = 18		T677T n = 4	
	%	%	p	%	P
Затримка в розвитку	40,7	44,4	0,523	25	0,493
Судоми	11	16,7	0,456	25	0,44
Гідроцефальний синдром	14,8	44,4	0,032*	50	0,16
ДЦП	11	22,2	0,275	25	0,4

Примітка: * – статистично значуща різниця ($p < 0,05$)

Це корелює з даними літератури про помірну втрату об'єму перивентрикулярної білої речовини та шлуночкову дилатацію при наявності MTHFR C677T поліморфізму [11].

Достовірно значущих зв'язків між особливостями перебігу ГІУ ЦНС та поліморфними варіантами MTRR A66G і MTR A2756G не було виявлено.

ВИСНОВКИ

Робота демонструє наявність впливу поліморфних варіантів генів MTHFR C677T,

MTRR A66G на перебіг ГІУ, доцільність їх дослідження при наявності перинатальної гіпоксії. Встановлено, що генотип 677CT гену MTHFR асоційований із пренатальною гіпотрофією ($p = 0,035$). Знижували вирогідність пренатальної гіпотрофії генотипи 66AG ($p = 0,018$) та 66GG ($p = 0,043$) гену MTRR, та генотип 2756AG гену MTR ($p = 0,036$). Встановлено асоціацію між судомами у новонароджених і наявністю мутантного алелю гену MTRR – генотипів 66AG ($p = 0,043$) та 66GG ($p = 0,01$).

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ми вважаємо доцільним вивчення інших поліморфних варіантів генів фолатно-метіонінового циклу у дітей з гіпоксично-ішемічним ушкодженням ЦНС.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бадалян ЛО. Детская неврология. Москва: МЕДпресс-информ; 2010. 608 с.
2. Фегисова ИН. Полиморфизм генов фолатного цикла и болезни человека. Вестник Ивановской медицинской академии. 2006; (1):77-82.
3. Гречанина ЕЯ. Эпигенетические болезни и дезадаптация. Пренатальное программирование здорового ребенка. In: Problems and perspectives in European education development: Proceeding of the International scientific and practical conference, 2016 Nov 20-27; Prague, Czech Republic. Prague: Prague Institute for Qualification Enhancement; 2016. p. 100-2.
4. Ванюшин БФ. Метилирование ДНК и эпигенетика. Генетика. 2006;42(9):1186-99.
5. Гречанина ОЯ, Гречанина ЮБ. Характер клінічних ознак пробандів – носіїв поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR та А66G МTRR Збірник наукових робіт наукового симпозиуму з міжнародною участю Клінічна генетика і перинатальна діагностика. 2012;(2. Дод.: Рідкісні (сирітські) спадкові хвороби: збірник наукових робіт наукового симпозиуму з міжнародною участю, 2012, Листоп. 20-21; Харків, Україна):7-18.
6. Гречанина ЮБ. Вивчення впливу поліморфізмів мтДНК та поліморфних варіантів генів С677Т МТНFR, А66GMTRR на клінічні прояви мітохондріальних дисфункцій [дисертація]. Одеса: Харк. нац. мед. ун-т, Одес. нац. мед. ун-т. 337с.
7. Ment LR, Adén U, Lin A, Kwon SH, Choi M, Hallman M, et al. Gene Targets for IVH Study Group. Gene-environment interactions in severe intraventricular hemorrhage of preterm neonates. *Pediatr Res.* 2014 Jan;75(1-2):241-50. doi: 10.1038/pr.2013.195. PubMed PMID: 24192699; PubMed Central PMCID: PMC3946468.
8. Kezurer N, Galron D, Golan HM. Increased susceptibility to mild neonatal stress in MTHFR deficient mice. *Behav Brain Res.* 2013 Sep 15;253:240-52. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.037. PMID: 23896051.
9. Maayan-Metzger A, Lubetsky A, Kuint J, Rosenberg N, Simchen MJ, Kuperman A, et al. The impact of genetic and environmental factors on homocysteine levels in preterm neonates. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Apr;60(4):659-62. doi: 10.1002/pbc.24352. PubMed PMID:23024114.
10. Seremak-Mrozikiewicz A, Bogacz A, Deka-Pawlik D, Klejewski A, Wolski H, Drews K, et al. The polymorphisms of methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) genes in pathogenesis of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017 Oct;30(20):2498-2504. doi:10.1080/14767058.2016.1254183. PubMed PMID: 27806663.
11. Marseglia LM, Nicotera A, Salpietro V, Giaimo E, Cardile G, Bonsignore M, et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms as antenatal risk factors of white matter abnormalities in two cohorts of late preterm and full term newborns. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:543134. 8 p. doi: 10.1155/2015/543134.
12. Запорожан ВМ, Бажора ЮІ, Чеснокова ММ, Левицька НА. Епігенетичні механізми регуляції роботи генів. *Інтегративна антропологія.* 2009;(2):4-11.

А. А. Яновская, Е. Я. Гречанина, Ю. Б. Гречанина.

АССОЦИАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦНС И ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МТНFR С677Т, МTRR А66G, МTR А2756G.

Резюме. Наиболее частой причиной перинатальной патологии нервной системы являются гипоксически-ишемические поражения (ГИП) ЦНС. На процессы, сопровождающие гипоксию, оказывают влияние эпигенетические механизмы регуляции активности генов. Среди них важное место занимает фолатный цикл, участвующий в метилировании ДНК.

Цель работы: изучить влияние генетического полиморфизма генов фолатного цикла на характер течения ГИП ЦНС.

Материалы и методы: обследовано 55 новорожденных с ГИП ЦНС. Проведено исследование полиморфных вариантов генов МТНFR С677Т, МTRR А66G и МTR А2756G методом аллель-специфической ПЦР.

Результаты. Исследование полиморфных вариантов генов MTHFR C677T, MTRR A66G и MTR A2756G у обследованных детей выявило наличие ассоциаций этих полиморфизмов с особенностями течения ГИП ЦНС. Так, генотип 677CT гена MTHFR ассоциирован с пренатальной гипотрофией (30,4% случаев по сравнению с 7,1% при 677CC генотипе, $p = 0,035$), а также с развитием гидроцефального синдрома в возрасте 1-2 года (44,5%, $p = 0,032$). Мутантные аллели гена MTRR и аллель 2756AG гена MTR снижали вероятность пренатальной гипотрофии. Ее частота при наличии нормальной гомозиготы гена MTRR составляла 45,5%, при наличии аллеля 66AG – 8% ($p = 0,018$), аллеля 66GG – 10,5% ($p = 0,043$). Установлена связь между полиморфными вариантами гена MTRR и судорогами у новорожденных с ГИП ЦНС: судороги были у 44% детей с генотипом 66AG ($p = 0,043$) и у 58% с генотипом 66GG ($p = 0,01$), в отличие от 9% при наличии нормальной гомозиготы.

Выводы. Работа демонстрирует наличие влияния полиморфных вариантов генов MTHFR C677T, MTRR A66G на течение ГИП ЦНС, целесообразность их исследования при наличии перинатальной гипоксии.

Ключевые слова: перинатальный; гипоксически-ишемическое поражение ЦНС; полиморфные варианты генов; фолатный цикл.

A.A. Yanovska¹, Y.B. Grechanina², E. Ya. Grechanina^{1,2}

ASSOCIATION OF CLINICAL SIGNS OF HYPOXIC ISCHEMICALLY DAMAGES OF THE CENTER AND POLYMORPHIC OPTIONS OF MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G.

Summary. The most common cause of perinatal pathology of the nervous system is hypoxic-ischemic injury (GIU) of the central nervous system. The processes that accompany hypoxia are influenced by the epigenetic mechanisms of regulation of the activity of genes. Among them, the important role is taken by the folate cycle involved in the methylation of DNA.

Purpose: to study the influence of the genetic polymorphism of genes of the folate cycle on the nature of the course of GIU of the central nervous system.

Patients and methods. 55 newborn infants with GIU of the central nervous system were screened. The study of polymorphic variants of MTHFR C677T, MTRR A66G and MTR A2756G genes by allelic-specific PCR was conducted.

Results. The study of polymorphous variants of the MTHFR C677T, MTRR A66G and MTR A2756G genes in the examined children revealed the association of these polymorphisms with the features of the GIU of the central nervous system. Thus, the genotype 677ST of the gene MTHFR is associated with prenatal hypotrophy (30.4% of cases compared with 7.1% at 677CS genotype, $p = 0.035$), as well as with the development of hydrocephalic syndrome at the age of one year (44.5%, $p = 0.032$). The mutant alleles of the MTRR gene and the 2756AG allele of the MTR gene reduced the probability of prenatal hypothyroidism. Its frequency in the presence of a normal homozygote gene of MTRR was 45.5%, in the presence of the allele 66AG – 8% ($p = 0.018$), allele 66GG – 10.5% ($p = 0.043$). The established relationship between polymorphous variants of the MTRR gene and seizures in newborns with GIU of the central nervous system: convulsions were in 44% of children with the genotype 66AG ($p = 0.043$) and 58% with the genotype 66GG ($p = 0.01$), in contrast to 9% in the presence of normal homozygotes.

Conclusions. The work demonstrates the presence of the influence of polymorphous variants of genes MTHFR C677T, MTRR A66G on the course of GIU of the central nervous system, the feasibility of their research in the presence of perinatal hypoxia.

Key words: Perinatal; hypoxic-ischemic injury; polymorphic gene variants; folate cycle.

Надійшло до редакції 29.03.2018 р.
Підписано до друку 02.04.2018 р.