

©В. М. Запорожан, В. Г. Марічереда, О. М. Куліш

**ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА, ЩО КОДУЄ ТРАНСПОРТЕР ВІДНОВЛЕНИХ ФОЛАТІВ RFC1, ТА ВРОДЖЕНІ ДЕФЕКТИ НЕРВОВОЇ ТРУБКИ ПЛОДУ***Одеський національний медичний університет*

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА, ЩО КОДУЄ ТРАНСПОРТЕР ВІДНОВЛЕНИХ ФОЛАТІВ RFC1, ТА ВРОДЖЕНІ ДЕФЕКТИ НЕРВОВОЇ ТРУБКИ ПЛОДУ Дослідження ролі поліморфізму генів фолатного обміну матері у формуванні вроджених дефектів нервової трубки плоду, проведені в різних країнах, показали суперечливі результати. До теперішнього часу ведеться пошук генів - кандидатів у розвитку даної патології плоду. Ми провели аналіз асоціації 80G→A поліморфізму гена транспортера відновлених фолатів RFC1 матері з дефектами нервової трубки плоду. Отримані дані свідчать про значний вплив генотипу 80A / A RFC1 на рівні фолієвої кислоти сироватки та гомоцистеїну плазми, що свідчить про потенційну роль 80G→A RFC1 матері в порушенні процесу закриття невральної трубки ембріона.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ КОТОРЫЙ КОДИРУЕТ ТРАНСПОРТЕР ВОССТАНОВЛЕННЫХ ФОЛАТОВ RFC1 И ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТОВ НЕРВНОЙ ТРУБКИ ПЛОДА Исследования роли полиморфизма генов фолатного обмена матери в формировании врожденных дефектов нервной трубки плода, проведенные в разных странах, показали противоречивые результаты. До настоящего времени ведется поиск генов – кандидатов в развитии данной патологии плода. Мы провели анализ ассоциации 80G→A полиморфизма гена транспортера восстановленных фолатов RFC1 матери с дефектами нервной трубки плода. Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии генотипа 80A/A RFC1 на уровне фолиевой кислоты сыворотки и гомоцистеина плазмы крови, что указывает на потенциальную роль 80G→A RFC1 матери в нарушении процесса закрытия невральная трубки эмбриона.

THE REDUCED-FOLATE CARRIER RFC-1 GENE POLYMORPHISM AND CONGENITAL NEURAL TUBE DEFECTS some studies have shown conflicting findings in linking polymorphic variation in folate-related genes to the risk of neural tube defect (NTD) pregnancy. Recent evidence points to maternal genotype being important in determining NTD risk. We examined 80G→A polymorphism in reduced folate carrier gene (RFC1) in women for association with fetal neural tube defects in Southern Ukraine. Significant effect of RFC1 80A/A polymorphism on plasma folate and homocysteine levels was detected.

**Ключові слова:** дефекти нервової трубки, плід, поліморфізм, RFC-1

**Ключевые слова:** дефекты нервной трубки, плод, полиморфизм, RFC-1

**Key words:** neural tube defects, fetus, polymorphism, RFC-1

**ВСТУП.** При дефіциті фолієвої кислоти в організмі жінки порушується обмін амінокислот, знижується швидкість біосинтезу РНК та ДНК, що чітко проявляється у стані тканин з інтенсивним діленням (слизові оболонки, шкіра, кров, ембріон, що розвивається), у тому числі порушується утворення мієліну. Саме тому зміни у метаболізмі фолієвої кислоти здатні індукувати формування вроджених дефектів невральної трубки (ВДНТ) плоду. Цьому підтвердження - ряд епідеміологічних досліджень, проведених у різних країнах, які показали, що прийом жінками фолієвої кислоти у периконцепційний період дозволяє попередити до 50-75% випадків формування ВДНТ [1]. Механізми, що лежать в основі даних порушень, можуть включати в себе генетичні, середові, нутритивні чинники [2]. Емпіричні дані досліджень кількох етнічних груп населення показали, що генетичні фактори тісно пов'язані з розвитком ВДНТ, перш за все – поліморфізми генів, що кодують ферменти, необхідні для обміну фолієвої кислоти в організмі жінки [3]. Проте, деякі дефекти нервової трубки є фолат-резистентними (Сорр, 1998). Молекулярне підґрунтя основної різниці між фолат-чутливими і фолат-резистентними на сьогоднішній день не відоме [4]. Враховуючи значну роль у метаболізмі фолієвої кислоти, значна частина досліджень присвячена вивченню генетичних варіантів гена метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) та гена, що кодує фермент метіонін-сінта-

за-редуктазу (MTRR) [5]. Проте, на наш погляд, цікавими є дослідження Shang Y., 2008 та Guo L., 2011, які вважають новим перспективним напрямом у вивченні патогенетичних механізмів розвитку ВДНТ плоду звернення уваги науковців до гена, що кодує транспортер відновлених фолатів (reduced-folate carrier 1; SLC19A1 - RFC-1) [6, 7]. Зважаючи на те, що RFC-1 виконує функцію транспорту 5-метилтетрагідрофолата до клітини, цілком імовірно, що поліморфізм гена RFC-1 (локус 21q22.3) є потенціальним фактором ризику порушення процесу закриття невральної трубки в ранньому ембріональному періоді через порушення абсорбції фолатів всередину клітини. Зокрема, Shang Y. та співавтори виявили суттєву різницю у генотипі і частотах алелів 80G→A RFC-1 між групою ВДНТ і групою контролю (p=0,008 і p=0,017 відповідно) [6]. Враховуючи вищенаведене, метою даного дослідження було обране вивчення асоціації ВДНТ плоду з 80G→A поліморфізмом гена RFC-1 і потенціального впливу даного поліморфізму на рівні фолієвої кислоти сироватки крові та гомоцистеїну плазми у жінок з обтяженим за ВДНТ акушерським анамнезом.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Обстежено 42 жінки, що мають в анамнезі вагітність, асоційовану з ВДНТ плоду, віком від 19 до 28 років, середній вік – 26,16 ± 2,52 років. Критеріями виключення з дослідження були інсулін-залежний цукровий діабет, прийом ліків – антагоністів фолієвої кислоти, паління, гіпертермія

та прийом гарячих ванн на ранніх термінах вагітності, вплив радіоактивного випромінювання, токсичних речовин та інші фактори, що здатні порушувати процес закриття невральної трубки ембріону, але не пов'язані з поліморфізмом генів фолатного обміну.

Визначення рівня фолієвої кислоти в сироватці крові проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням набору реагентів та калібраторів ELECSYS виробника «Roche Diagnostics» (Швейцарія). Пацієнтки утримувалися від прийому їжі, напоїв з вечора попереднього дня. Забір матеріалу проводили вранці натще після венепункції 4 мл крові у вакуумні пробірки типу «Vacutest®» з свіжою K2 EDTA 7,2 мл. Умови зберігання: не більше 3 днів при  $t=2-8^{\circ}\text{C}$ . Референтні значення:  $> 5,21$  нг/мл.

Рівень гомоцистеїну плазми крові визначали за допомогою імунохемилюмінесцентного аналізу (ІХЛА); набір реагентів та калібраторів - виробника «Spinreact» (Іспанія). Вимоги до забору матеріалу: 6 мл крові вранці натще (напередодні - виключення жирної їжі) у вакуумні пробірки типу «Vacutest®», що містять Gel + Clot Act. без антикоагулянту, відразу після забору - центрифугування 10 хв. при 3000 об/хв. (800-1600g). Доставка у лабораторію - у термосі на льоду. Умови зберігання: не більше 3 днів при  $t=2-8^{\circ}\text{C}$ . Референтні значення: 4,0 – 15,4 мкмоль/л.

Геномну ДНК отримували з клітин периферичної крові з використанням стандартної фенол-хлороформної екстракції. RFC-1 80G→A поліморфізм був визначений за допомогою ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція з визначенням поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів). ПЛР проводили в загальному об'ємі 25 мкл, включаючи 0,3 мкмоль/л праймера 5-AGC GTC ACC TTC GTC CC і 5-TCC CGC GTG AAG TTC TTG, 0,2 ммоль/л кожна дНТП, 2,5 мкл  $10 \times \text{Taq}$  буфер, і 1 Taq-полімераза. Програма ПЛР складалася з першого кроку - денатурації 5 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , а потім 35 циклів -  $94^{\circ}\text{C}$  (30 с),  $59^{\circ}\text{C}$  (30 с) і  $72^{\circ}\text{C}$  (25 с). Продукти ПЛР розщеплювали Naell (Fermentas, Литва), аналіз здійснювався шляхом гель-електрофорезу у 3% агарозному гелі. Алель G - 126 bp і 104 bp фрагменти, алель A - залишався нерозрізаним (230 bp).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Аненцефалія плоду мала місце у 14 жінок (33,3 %), енцефалоцеле – у 2 (4,8 %), spina bifida – у 26 (61,9 %) жінок. У 2 випадках (4,8 %) вада була множинна, в 40 (95,2 %) – ізольована. Перебіг вагітностей, асоційованих з ВДНТ плоду, ускладнювався загрозою переривання вагітності ( $n=15$ ; 35,7 %), затримкою розвитку плоду ( $n=6$ ; 14,3 %) та залізодефіцитною анемією ( $n=17$ ; 40,5 %).

Середній рівень фолієвої кислоти сироватки крові жінок склав  $6,7 \pm 3,83$  нг/мл, коливаючись у діапазоні від 1,9 до 17,4 нг/мл. Знижений рівень фолієвої кислоти (норма для невагітних жінок – більше 5,21 нг/мл) виявлено у 45,2 % ( $n=19$ ) випадків. Середній рівень гомоцистеїну плазми крові склав  $13,1 \pm 6,08$

мкмоль/л (діапазон 4,0-27,3 мкмоль/л; норма для невагітних жінок – 4,0 – 15,4 мкмоль/л). Фактично лише у 17 (40,5 %) жінок реєстрували нормальний рівень гомоцистеїну. Високий нормальний рівень гомоцистеїну визначено у 26,2 % ( $n=11$ ), гіпергомоцистеїнемію - у 33,3 % ( $n=14$ ) жінок.

Нами встановлено, що серед жінок, які мали в анамнезі аненцефалію плоду, зниження рівня фолієвої кислоти сироватки крові констатоване у 9 (64,3 %) випадках, що значно частіше в порівнянні з жінками, плоди яких мали спинномозкову килу або енцефалоцеле ( $n=10$ ; 35,7 %). Подібна тенденція спостерігається також у рівні гомоцистеїну плазми, адже гіпергомоцистеїнемія виявлена у 42,9 % жінок з групи аненцефалії плоду проти 28,6 % жінок з більш легкими формами ВДНТ плоду в анамнезі.

Слід відзначити тісний зв'язок між рівнем гомоцистеїну та фолієвої кислоти крові жінок з ВДНТ плоду в анамнезі, оскільки у переважній більшості випадків гіпергомоцистеїнемії ( $n=13$ ; 92,9 %) констатоване зниження рівня фолієвої кислоти у сироватці, що віддзеркалює можливу спільність патогенетичних механізмів змін їх рівня в організмі ( $r = -0,38$ ;  $p < 0,05$ ).

У результаті проведеного молекулярно-генетичного дослідження 80G→A поліморфізму гена RFC1 встановлено гомозиготний дикий тип у 9 (21,4 %), гетерозиготний тип – у 16 (38,1 %) жінок. У 17 (40,5 %) обстежених жінок виявлено гомозиготний за мутантним алелем генотип RFC1. Гомозиготними за вказаною мутацією виявилися 57,1 % жінок з аненцефалією плоду в анамнезі та 29,6 % жінок з спинномозковою килою плоду.

Серед жінок з генотипом 80A/A RFC1 знижений рівень фолієвої кислоти сироватки крові констатовано лише у 6 (35,5 %), проте гіпергомоцистеїнемія виявлена у 10 (58,8 %) жінок, що свідчить про існування внутрішньоклітинного дефіциту фолатів на фоні нормального вмісту фолієвої кислоти у сироватці крові.

**ВИСНОВКИ.** Таким чином, хоча більшість дослідників віддають перевагу у здатності індукувати розвиток ВДНТ плоду поліморфізму гена ключового ферменту фолатного циклу MTHFR, зокрема, мутації 677C→T, та ін., результати нашого дослідження вказують на зв'язок 80G→A поліморфізму гена RFC1 з формуванням даної патології плоду. Показано, що носійство мутантного гомозиготного генотипу 80A/A гена RFC1 асоціюється зі зниженим рівнем фолієвої кислоти у сироватці крові та, у більшій мірі, з гіпергомоцистеїнемією у жінок з ВДНТ плоду.

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Зважаючи на отримані дані та результати інших досліджень, вважаємо обраний напрямок перспективним для подальшого дослідження молекулярно-генетичних механізмів розвитку ВДНТ плоду. Враховуючи відсутність епідеміологічних досліджень стосовно поширеності гена RFC1 на території України, доцільно дослідити носійство мутантного 80A алеля гена RFC1 серед жінок в українській популяції.

### ЛІТЕРАТУРА

1. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the MRC Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 132-137.
2. Greene ND, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 113-129.
3. Stegmann K, Boecker J, Richter B, Capra V, Finnell RH, Ngo ET, et al. A screen for mutations in human homologues of mice exencephaly genes *Tfap2alpha* and *Msx2* in patients with neural tube defects. *Teratology* 2001; 63: 167-175.
4. Kappen C. Folate supplementation in three genetic models: implications for understanding folate-dependent developmental pathways. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;135C(1):24-30.
5. Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M (2003). "Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida". *J. Appl. Genet.* 44 (1): 111-3.
6. Shang Y, Zhao H, Niu B, Li WI, Zhou R, Zhang T, et al. Correlation of polymorphism of MTHFRs and RFC-1 genes with neural tube defects in China. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008; 82: 3-7.
7. Guo L, Zhao H, Pei YH, He QR, Li WI, Zhang T, Zheng XY, Zhou R, Xie J Single nucleotide polymorphisms of the maternal *Msx2* gene and their association with fetal neural tube defects in Han ethnic group in Shanxi Province, China. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(3):374-9.

Отримано 06.12.11