

ЗАВРШЕН ЕЛАБОРАТ ЗА ПРОЕКТ

ЗАЧЕСТЕНОСТ НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА MTHFR ГЕНОТ КАЈ ПАЦИЕНТИ СО КОНГЕНИТАЛНИ АНОМАЛИИ АСОЦИРАНИ СО РАСЦЕПИ НА СТРУКТУРИ

НАУЧНА ОБЛАСТ:Клиничка генетика

ПОТЕСНО ПОДРАЧЈЕ:Педијатрија, Развојна генетика

КАТЕДРА-НОСИТЕЛ НА ПРОЕКТОТ:Катедра за хумана генетика

ДРУГИ КАТЕДРИ УЧЕСНИЦИ ВО ИСТРАЖУВАЊЕТО:Катедра за педијатрија,
Катедра за имунологија

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ:Проф. д-р Елена Шукарова-Ангеловска и Проф. д-р
Александар Петличковски

УЧЕСНИЦИ ВО ПРОЕКТОТ: Виш Н.Сов. Виолета Анастасовска, Доц. д-р Мери
Киријас, Ас. д-р Гордана Илиева, Милица Пешевска, Оливија Ефинска-Младеновска, Проф.д-р
Костадина Кузевска-Манева, Доц. д-р Николина Здравевска, Проф д-р Дејан Трајков, Олгица
Сибиновска

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ:3 години

Апстракт

Напредокот на генетските техники доведе до расветлување на значаен број на причини за конгениталните аномалии. Диференцијацијата на ембрионот е комплексен процес со кој се обезбедува создавање на специјализирани и разновидни структури неопходни за функционирање на човекот. Базичниот концепт во ембриологијата вклучува повеќе последователни и взаемно поврзани процеси – клеточна пролиферација, диференцијација, зголемување на морфолошката хетерогеност, се до формирање на обрасци во форма на поодделни ткива и органи. За одвивање на овие процеси, неопходна е координација меѓу развојните гени и надворешната средина. Дефицитот на фолната киселина, а во последно време и полиморфизмите на гените поврзани со фолатниот метаболизам се фактори обвинети за конгенитални аномалии асоцирани со затварање на одредени ембрионални структури.

Во оваа студија направена е корелација меѓу полиморфизмите (677C-T, 1298A-C) на MTHFR генот кај пациенти со повеќе конгенитални аномалии кои се поврзани со расцепи на одредени структури на ембрионот, и истите се споредени со контролна група испитаници. Анализирани се 40 семејства (деца со аномалии и нивните мајки) и 50 индивидуи како контролна група. Исто така направена е корелација меѓу присатните полиморфизми во афицираната група и параметрите на фолатниот метаболизам (хомоцистеин, фолна киселина, витамин B12). Студијата покажа дека не постои значајна разлика во преваленцата на MTHFR полиморфизмот помеѓу двете групи. Исто така, не постои јасна поврзаност помеѓу проучуваните полиморфизми на MTHFR и метаболизмот на фолати кај децата и нивните мајки. Сепак, зачестеноста на патолошката промена на постоењето на алелот T во полиморфизмот MTHFR C677T беше значително зголемена и кај децата и мајките во однос на контролната група.

Клучни зборови: MTHFR полиморфизми, конгенитални аномалии

Abstract

Advances in genetic techniques had shed light on a significant number of congenital anomalies. Embryo differentiation is a complex process that creates specialized and diverse structures necessary for human functioning. The basic concept in embryology include several successive and interrelated processes - cell proliferation, differentiation, morphological heterogeneity, up to the patterns formation in forming of the tissues and organs. To provide such processes, coordination between developmental genes and the external environment is necessary. Folic acid deficiency, and recently discovered polymorphism of genes associated with folate metabolism are factors that could provoke congenital anomalies associated with the closure of a particular embryonic structure.

In this study, a correlation between the polymorphisms (677C-T, 1298A-C) of MTHFR gene in patients was made between patients with multiple congenital anomalies and normal population. The study population covers 40 families (children with anomalies and their mothers) and 50 individuals as a control group. Correlation between polymorphic markers and parameters of folate metabolism (homocysteine, folic acid, vitamin B12) was made in the group of the affected children and their mothers as well. The study showed that there is no significant difference in prevalence of MTHFR polymorphism between the two groups. Also there is no clear association among the studied polymorphisms of MTHFR and folate metabolism in children. However, the frequency of the pathologic change of existence of the T allele in the MTHFR C677T polymorphism was a significantly increased both cleft infants and mothers relative to the control group.

Key words: MTHFR polymorphism, congenital anomalies

Вовед

Развојот на плодот од зачнувањето па се до крајот на бременоста следи строго дефинирани - временски и просторно- обрасци на формирање и обликување на сите делови и органи на фетусот. Воглавно, плодот е добро заштитен од матката и околните структури, сепак интерреакцијата меѓу плодот и надворешната околина во смисла на постоење на тератогени и/или протективни фактори е потврдена во низа студии.

Конгениталните аномалии се јавуваат со инциденца од 2-5% од сите новородени. Тие претставуваат најголем причинител за ембрионалната и феталната смрт, како и растечки фактор на доенечката смртност во развиените земји и земјите во развој. При постоење на конгенитална аномалија кај една индивидуа се загрозува квалитетот на животот на истата, претставува сериозен долготраен хендикеп за нејзините родители, а во исто време претставува оптоварување на целиот здравствен систем во инвестиција за нивно згрижување. Новите постигнувања во генетиката и молекуларните технологии (секвенционирање, компаративна геномска хибридизација) посочија низа гени и нивни варијанти кои упатуваат кон изменета ембриогенеза. Податоците од литературата во моментот се недоволни, нецелосни, а понекогаш и контрадикторни во утврдување на причинско-последичните односи во корелацијата гени-околински фактори и заслужуваат понатамошна евалуација.

Оптималниот раст и развој на ембрионот е зависен од голем број внатрешни и надворешни фактори, како и нивна меѓусебна корелација. Една од добро познатите интерреакции меѓу генетската основа содржана во ембрионалната ДНК и околинските фактори е дефицитот на фолната киселина во тек на првите недели на бременоста и појавата на низа конгенитални аномалии асоцирани со несоодветно затворање на некои од ембрионалните структури. Првите сознанија за оваа асоцијација потекнуваат од време на Втората светска војна, каде, заради сериозен нутритивен дефицит е забележана зачестена појава на одредени конгенитални аномалии. Од друга страна, епидемиолошките студии покажаа дека фортификацијата на храната со микронутритивни (меѓу кои и витамините) значајно ја намалија инциденцијата на појава на расцепи на структурите и органите кај новородените деца. Денес генерално е прифатено дека дефицитот на фолната киселина, како и употребата на антифолатни лекови (алкохол) во текот на бременоста е обвинет за потенцијален директен или индиректен ризик фактор за одредени аномалии, вклучувајќи дефекти на невралната туба, кардиопатии, расцепи на усна и непце и др.

Фолатите претставуваат неопходни кофактори во процесот на трансферот и утилизацијата на монокарбонските групи и се вклучени во биосинтезата на основните градивни елементи на ДНК и РНК (1). Учествувајќи во процесот на метилација, фолатите имаат улога на донори на монокарбонските единици во процесот на биосинтезата на ДНК, и имаат важна улога во регулацијата на геномската експресија, транскрипција и моделирање на хроматинската структура. Активноста на фолатите во интраклеточната размена на јони е директна (имајќи антиоксидативен ефект преку интерреакција со ензимот eNOS-ендотелијална азотна оксидативна синтаза) и индиректна преку намалувањето на вредностите на хомоцистеинот и обезбедување на соодветна метилација.

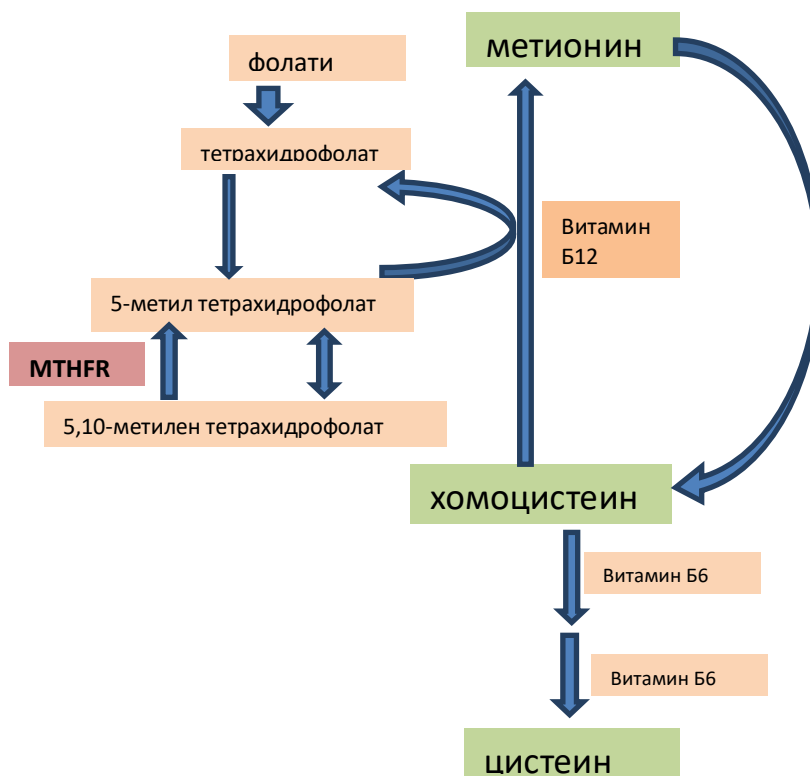
Негативните ефектите на фолатниот дефицит врз ембрионалниот развој се должи на повеќе докажани причини (2), но се уште во литературата постојат неусогласени ставови во однос на патофизиолошкиот механизам за дисорганизација (несоодветна клеточна пролиферација, диференцијација и миграција) на ембрионалните структури. Пред се, пре и периконцептуалните нивоа на фолатите можат да го изменат образецот на метилација на развојните гени во плодот, а со тоа и да влијаат на нивната активност (3). Обезбедувањето на

метил група од страна на фолната киселина користи во посттранслационата метилација на аминокиселините аргинин и хистидин на високо конзервираниот регулаторен домен кој учествува во организацијата на цитоскелетот при диференцијација на невралното ткиво (4), особено во просторниот распоред на пролиферираните клетки и нивната атхезија.

Хомоцистеин е неесенцијална аминокиселина и е интермедијарен продукт на во метаболизмот на метионинот. Тој се метаболизира од метионинот преку три независни алтернативни патишта: реметилација; трансметилација до метионин и иреверзибилен процес на транс-сулфуризација до цистеин. Реметилацијата на хомоцистеинот е потпомогната со фолатите како кофактор, а исто така и со витаминот Б12 како коензим во реакцијата. Од друга страна, намалувањето на количината на хомоцистеинот е потпомогната со неговата конверзија до цистатионин (а потоа до цистеин) со помош на витаминот Б6.

Зголемувањето на вредноста на хомоцистеинот се случува во неколку клучни состојби – ретка, автозомно рецесивна состојба на хомоцистинурија што е резултат на ензимски дефицит на цистатионин или метионин синтетаза; и состојба на хомоцистинемија при дефицит на витамини, пред се, фолати, а во одредени состојби и витамин Б12 и витамин 6 (графикон 1).

Хомоцистеин е аминокиселина која инкорпорира сулфурни молекули и служи како маркер на монокарбонскиот метаболизам. Со оглед на фактот дека монокарбонскиот метаболизам обезбедува трансфер на метил-групите, обезбедува и интегритет и биосинтеза на пурините и пиримидините долж молекулата на ДНА, а со тоа и обезбедување на соодветен епигенетски механизам на активирање на одредени гени на ДНА.



Графикон 1: Метаболичен пат на хомоцистеинот и негова зависност од фолатите, витаминот Б12 и витаминот Б6.

Овој процес на активација на одредени развојни гени во раниот интраутерин период во точно одредено време, со точно избјадарена количина на генскиот продукт е клучен фактор за успех во целокупниот процес на ембриогенезата.

Зголемувањето на вредноста на хомоцистеинот во овој критичен период оневозможува соодветен трансфер на метил групите и нивно инкорпорирање во молекулата на цитозинот долж молекулата на ДНА, а со тоа и несоодветно епигенетско програмирање. Од друга страна повисокото ниво на хомоцистеинот влијае врз оксидативните процеси и создава слободни радикали кои имаат токсично дејство врз клеточните структури.

Нивото на хомоцистеин во плазмата сè повеќе се препознава како фактор на ризик за болести и се смета за предиктор за потенцијални здравствени проблеми како што се кардиоваскуларните болести и Алцхајмеровата болест. Од друга страна, потврдено е дека високите вредности на хомоцистеинот (предизвикани од недостатокот на фолна киселина) има негативен ефект на ембрионалните структури: недоволна количина создадени клетки на ниво на местата на спојување на ембрионалните структури, недоволна трансформација одредени типови на клетки (невроепителијални клетки на невралната туба), несоодветна пролиферација на клетките од ендокардијалните перниција и друго (5,6,7).

По воведувањето на масовната фортификација на храната со микроелементи и витамини, забележано е дека и покрај соодветната суплементација кај бремените жени, повторно постојат маркери за несоодветен фолатен метаболизам а со тоа и низа конгенитални аномалии. Докажано е дека варијантите во геномот кои учествуваат во фолатниот метаболизам влијаат врз појавата на конгенитални аномалии: кардиопатии (8,9), дефекти на неврална туба (10,11), несиндромските расцепи на уста и непце (12,13) и др.

Покрај многу други фактори и комплексни механизми на содејство (14), најчесто се споменувани полиморфизмите кај низа гени асоцирани со фолатниот и хомоцистеинскиот метаболизам: гените за метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR), метионин синтетаза (MTR), метионин синтетаза редуктаза (MTRR) и метилен тетрафолат дехидрогеназа-1 (MTHFD1). Полиморфизмите на MTHFR генот како што се: 1129C-T, 677C-T, 1298A-C предизвикува термолабилност на генскиот продукт, а со тоа и недоволна функционалност (15). Крајна последица на овие полиморфизми би била поголема инциденција за појава на конгенитални дефекти и покрај соодветната суплементација со фолати кај оваа група на бремените жени.

Некои студии го поврзуваат постоењето на овие геномски варијации со појавата на срцеви аномалии и кај друга добро етаблирана генетска болест - тризомијата 21. Постојењето на кардиопатија само кај половината од сите деца со тризомија 21 е асоцирано со полиморфизмот на MTHFR гените (16).

Од друга страна, постојат сознанија за одредени варијанти во геномот за кои се знае дека имаат одредено протективно дејство и нивната присутност индицира намалена инциденца на конгениталните аномалии (17) потенцирајќи ја функцијата на генот.

Цели на студијата

1. Клиничка делинеација на синдромските од несиндромските конгенитални аномалии.
2. Утврдување на асоцијацијата на зачестеност на одредени полиморфизми на MTHFR генот и сродните гени со одредени конгенитални аномалии (расцеп на уста/непце, расцепи на неврална туба, кардиопатии) во македонската популација.

3. Утврдување на состојбата на фолатниот метаболизам на мајката како причина за појава на екстензивноста на поединечните конгенитални аномалии кај детето.
4. Одвојување на ризична група жени каде има фамилијарна зачестеност на анализираниите конгенитални аномалии со анализа на полиморфизмите во поширокото семејство.

Материјал и методи

Во студијата беа опфатени 40 семејства: деца со постоење на расцепи на структури и нивните мајки. Во студијата беа опфатени и мајките на децата со конгенитални аномалии за да се утврди меѓусебната асоцираност на полиморфизмите меѓу мајката и детето.

Студијата беше дизајнирана како ретроспективно-проспективна со траење од 3 години, при што беа опфатени деца (амбулантски или болнички) од Клиниката за детски болести и нивните мајки.

Инклузиони критериуми: анализираниите деца имаа некоја од следните конгенитални аномалии:

- несиндромски расцеп на усна/непце
- дефекти на неврална туба (миелоцела, менингомиелоцела, спина бифида)
- кардиопатии (комплексни и изолирани)

Ексклузиони критериуми:

- синдромско пореметување и постоење на мултималформативен синдром од друга етиологија (тератоген фактор, хромозомопатија, микроделеционен синдром).
- оние семејства каде постоеше податок за тератогеност-медикаментозен третман на мајката во тек на првите неколку месеци од бременоста.

Беа анализирани анамнестички податоци од време непосредно пред бременоста, податоци од бременоста, суплементација со фолати, како и фамилијарната зачестеност на појава на конгенитални аномалии во поширокото семејство.

Кај секое семејство (мајка и дете) беа анализирани

1) постоење на полиморфизам на MTHFR гените кај мајките и децата, и тоа MTHFR C677T и MTHFR A1298C. Добиените резултати беа поделени во однос на постоење на хомозиготна, хетерозиготна состојба кај секое поединечно семејство, како и на оние кои немаа ни еден од горенаведените полиморфизми.

2) Кај 33 семејства (мајка и дете) беше одредена концентрацијата на 3 елементи – фолати, хомоцистеин и Витамин Б12. Вредноста на истите беше корелирана со статусот на зиготноста на веќе анализираниите полиморфизми.

Како контролна група за одредување на полиморфизмите во популацијата беа опфатени 50 пациенти (мажи) од базата на податоци при Институтот за имунологија и хумана генетика кои немаат асоцираност со конгенитални аномалии-лично или во семејството.

Анализата на полиморфизмите беше спроведена со реверзна хибридизација. Беше користен комерцијално достапен комплет (CVD, ViennaLab, Vienna, Austria) при што се изведе анализа- мултиплекс ПВР (Полимеразно-верижна реакција) за амплификација на MTHFR генот со користење на биотинилирани прајмери. Ампликоните последователно се хибридизираа со проби фиксирани на нитроцелулозна лента. Со ензимска реакција се отчитуваа позитивните сигнали и се одреди генотипот на испитаникот.

Биохемиска анализа на концентрацијата на фолатите, Вит Б12 и хомоцистеинот во крвта на децата со конгенитални аномалии и нивните мајки е направена со помош на electrohemiluminescence(ECLIA) метод на апарат Roche - Cobas 601.

За статистичката обработка на добиените податоци беше користен статистичкиот програм IBM SPSS Statistics, version 21, при што беа користени дескриптивни и нумерички варијабли.

χ^2 тестот беше применет за да се утврди постоењето на статистички сигнификантна разлика во присуството на мутациите помеѓу мајките и децата од една страна и контролната група од друга страна.

ANOVA тестот беше изведен за тестирање на средните вредности за хомоцистеинот, фолатите и витаминот Б12 помеѓу групите: од една страна мајки хомозиготи а од друга мајки хетерозиготи за дадените мутации и мајки без мутации респективно и кај децата.

Резултати

А. Клиничка евалуација на децата со расцепи

Беше направена анализа на децата со расцепи во однос на клиничката презентација. Беа опфатени 92 деца со расцепи на структури, од кои 43% беа изолирани, додека 57% беа во склоп на одреден мултималформативен синдром(хромозомопатија или моногенетски). Оваа група во која беа идентификувани синдроми од типот на Kabuki, Di George, Van der Woude, поголеми и/или помали делеции на хромозомите, дистален тип на артрогрипоза; беа исклучени од понатамошна статистичка анализа со оглед на тоа што расцепот беше во склоп на синдромското пореметување.



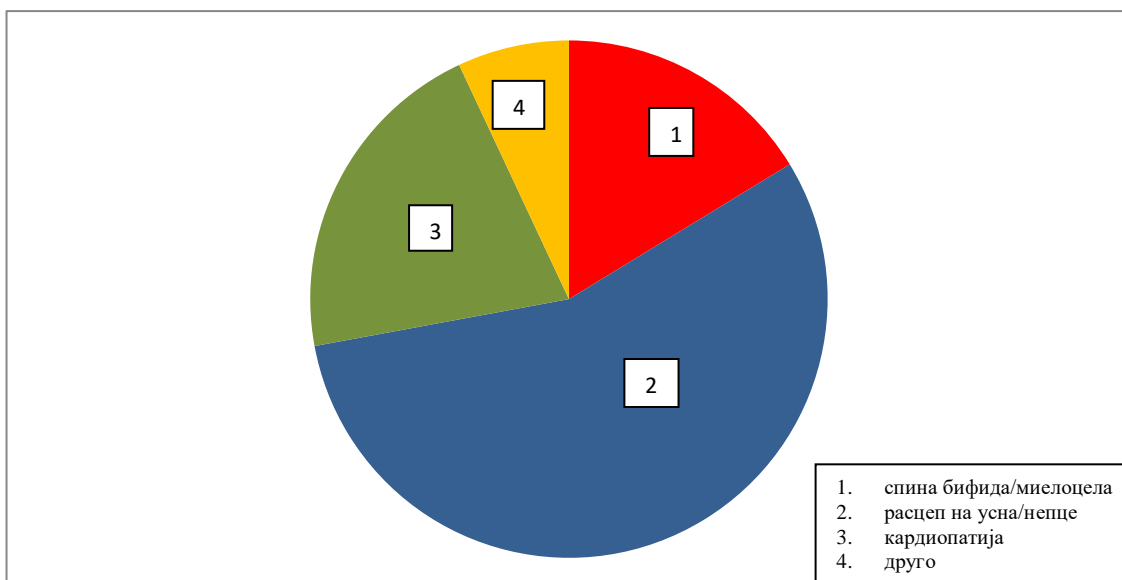
Графикон 2: сооднос меѓу синдромските и изолираните расцепи во групата од 92 анализирани деца

Анализата на анамнестичките податоци покажа постоење на тератогено дејство (употреба на антиепилептици од страна на една мајка; како и инсулино-зависен дијабетес кај друга), и овие две семејства беа исклучени од понатамошната анализа заради можно контрибуирачко дејство на тератогениот фактор.

Преостанатите 40 деца со несиндромски расцеп беа клинички евалуирани. Три од нив имаа повеќе од 1 аномалија, пред се расцеп асоциран со кардиопатија. Во најголем број во оваа група беа вклучени деца со расцеп на усна и/или непце (56%). Со оглед на малиот примерок, оваа група беше разгледувана во целост, без разлика на тоа дали расцепот бил едностран или двостран или дали бил само на една или на повеќе структури на усната празнина.

Групата на деца со кардиопатии опфати 9 деца (21%), по што по застапеност следеше групата на деца со спина бифида (16%).

Во групата за други расцепи следеше групата од 3 деца со присуство на омфалоцела, комплетна еписпадија и должински расцеп на шаката.



Графикон 3: дистрибуција на застапеноста на расцепите во склоп на групата на деца со изолирани расцепи

Б. Асоцијација на меѓу застапеноста на полиморфизмите MTHFR C677T и MTHFR A1298C меѓу групата мајки, групата деца со анормалии во однос на контролната група.

Децата со расцепи и нивните мајки беа поделени во две независни групи – група мајки и група деца. И во двете групи беа направени подгрупи: во едната подгрупа беа анализирани мајки/деца со хомозиготна мутација, каде и двата алели ја имаа мутацијата, а во втората група беа анализирани хетерозиготите (еден афициран алел) како и нормалните испитаници без ниту една мутација каде се очекува постоење на доволна количина на генскиот продукт.

а. За мутацијата MTHFR C677T

Застапеност на мутациите MTHFR C677T (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација) кај контролната група

		фреквенција	Процентуална застапеност %
контроли	хомозиготи	9	18,8
	Хетерозиготи/без мутации	39	81,2
	вкупно	48	100.0

Застапеност на мутациите MTHFR C677T (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација)кај мајките на деца со расцепи

		фреквенција	Процентуална застапеност %
мајки	ХОМОЗИГОТИ	14	35.9
	Хетерозиготи/без мутации	25	64.1
	вкупно	39	100.0

Вредноста на χ^2 тестот помеѓу мајките на деца со расцепи и контролната група испитаници во однос на присуството на мутации на MTHFR C677T изнесуваше $\chi^2 = 1,223$ ($p=0,874$), што не покажа статистички синификантна разлика ($p>0,05$).

Застапеност на мутациите MTHFR C677T (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација) кај деца со расцепи

		фреквенција	Процентуална застапеност %
деца	ХОМОЗИГОТИ	7	17.5
	Хетерозиготи/без мутации	33	82.5
	вкупно	40	100.0

Резултатите од χ^2 тестот ($\chi^2=2,509$;притоа $p=0,643$) за присуство на мутации на MTHFR C677T помеѓу децата со расцепи и контролната група испитаници укажуваат на тоа дека не постои статистички синификантна разлика меѓу групите ($p>0,05$).

б. Фреквенција на T алелот кај испитуваната и контролната група кај MTHFR C677T

алели	мајки		деца		контрола	
	фреквенција	%	фреквенција	%	фреквенција	%
TT	30	39.5	14	17.5	18	18.8
T	14	18.4	23	28.8	23	24.0
C	14	18.4	23	28.8	23	24.0
CC	18	23.7	20	25.0	32	33.3

Беше пресметан χ^2 тест во однос на застапеноста на тиминот (Т) наместо цитозинот (С) кај мутацијата МТНFR С677Т и во двете групи:

-мајки на деца со расцепи и контролната група: $\chi^2 = 119.680$ ($p < 0,01$)

-деца со расцепи и контролната група: $\chi^2 = 163.703$ ($p < 0,01$)

Rezultatite uka`uvaat na toa deka **postoi** statisti~ki sinifikantna razlika vo prisustvoto na timin i citozin i vo dвете ispituvani grupi.

в. За мутација МТНFR А1298С

Застапеност на мутациите МТНFR А1298С (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација) кај

контролната група

		фреквенција	Процентуална застапеност %
контроли	ХОМОЗИГОТИ	1	2,1
	Хетерозиготи/без мутации	47	97,2
	вкупно	48	100,0

Застапеност на мутациите МТНFR А1289С (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација) кај мајките

на деца со расцепи

		фреквенција	Процентуална застапеност %
мајки	ХОМОЗИГОТИ	4	10,3
	Хетерозиготи/без мутации	35	89,7
	вкупно	39	100,0

Направена е споредба меѓу застапеноста на мутациите на МТНFR А1298С, при што е добиена вредност на χ^2 тестот од 5,074 ($p = 0,079$). Ова укажува на тоа дека **не постои** статистички сигнификантна разлика помеѓу мајките на деца со расцепи и контролната група испитаници ($p > 0,05$).

Застапеност на мутациите MTHFR A1289C (хомозиготи*хетерозиготи и без мутација)кај деца со расцепи

		фреквенција	Процентуална застапеност %
мајки	хомозиготи	1	2.5
	Хетерозиготи/без мутации	39	97.5
	вкупно	40	100.0

Резултатите од χ^2 тестот (0,737), $p=0,692$; во постоењето на мутација на MTHFR A1289C помеѓу децата со расцепи и контролната група испитаници укажуваат на тоа дека **не постои** статистички синификантна разлика помеѓу двете групи испитаници ($p>0, 05$).

В. Анализа на вредностите на хомоцистеинот, фолатите и витаминот Б12 кај мајки хомозиготи за MTHFR полиморфизмите во споредба со вредностите кај мајките хетерозиготи и без полиморфизам.

а) вредности на дадените параметри кај мајките идецата со расцепи спрема референтните

Дескриптивни податоци за вредностите на хомоцистеинот, фолати и вит Б12 кај групата мајки

	N	Minimum	Maximum	Mean \bar{x}	Std. Deviation (SD)
хомоцистеин (umol/l)	33	5.6	11.8	7.797	1.4844
фолати (ng/ml)	32	5.2	18.9	11.488	4.0877
Вит Б12 (pg/ml)	32	201	991	611.19	230.815

Дескриптивни податоци за вредностите на хомоцистеинот, фолати и вит Б12 кај децата со расцепи

	N	Minimum	Maximum	Mean \bar{x}	Std. Deviation (SD)
хомоцистеин (umol/l)	39	5.6	14.1	8.082	2.1348
фолати (ng/ml)	39	4.1	17.9	10.738	3.7772
Витамин Б12 (pg/ml)	39	193	990	568.38	226.741

* Spored-minimalnata i maksimalnata vrednost na homocisteinot, folatite i vit. B12 kaj celokupnata grupa majki (хомозиготи, хетерозиготи и без мутации) и деца со расцепи вредностите се движат во рамките на референтните вредности.

б) one-way ANOVA testotbe{e

izvedenzatestirawenasrednitevrednostizahomocisteinot, folatitei vit.B12 pome|ugrupite:

1-majkihomozigoti

2.majki heterozioti i оние bez mutacija

полиморфизам MTHFR C677T

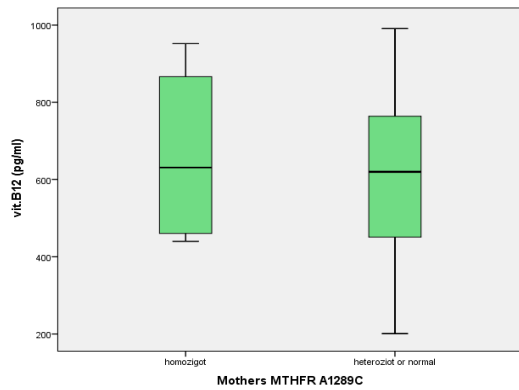
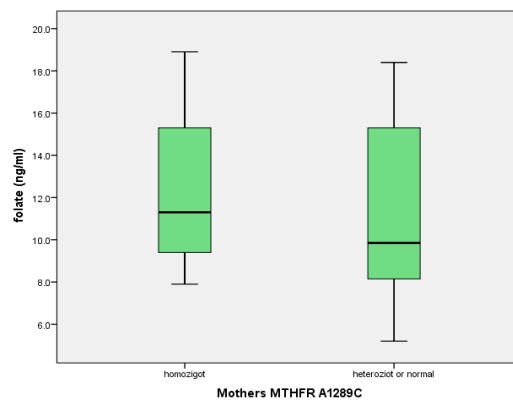
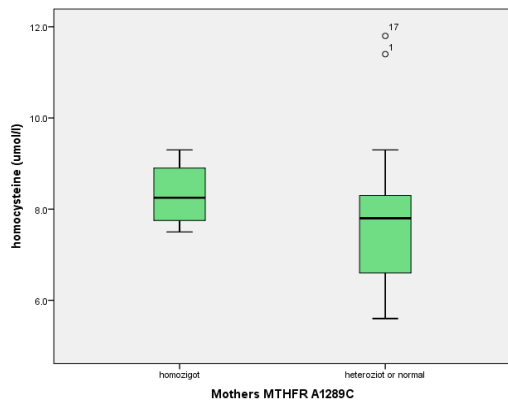
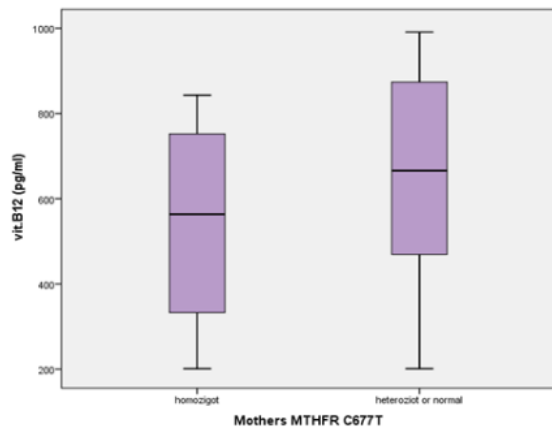
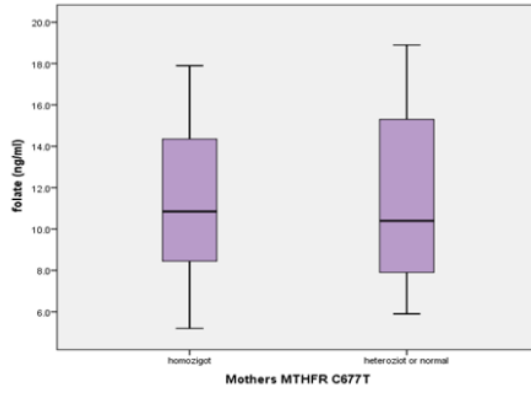
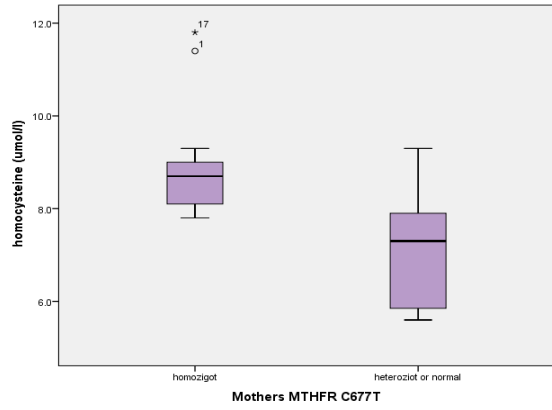
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
хомоцистеин ($\mu\text{mol/l}$)	Меѓу групите	27.949	1	27.949	20.358	.000
	Во склоп на групата	42.560	31	1.373		
	вкупно	70.510	32			
Фолати (ng/ml)	Меѓу групите	1.323	1	1.323	.077	.784
	Во склоп на групата	516.672	30	17.222		
	вкупно	517.995	31			
Витамин Б12 (pg/ml)	Меѓу групите	91466.408	1	91466.408	1.759	.195
	Во склоп на групата	1560076.467	30	52002.549		
	вкупно I	1651542.875	31			

полиморфизам MTHFR A1289C

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
хомоцистеин ($\mu\text{mol/l}$)	Меѓу групите	1.269	1	1.269	.568	.457
	Во склоп на групата	69.241	31	2.234		
	вкупно	70.510	32			
Фолати (ng/ml)	Меѓу групите	3.401	1	3.401	.198	.659
	Во склоп на групата	514.594	30	17.153		
	вкупно	517.995	31			
Витамин Б12 (pg/ml)	Меѓу групите	12510.161	1	12510.161	.229	.636
	Во склоп на групата	1639032.714	30	54634.424		
	вкупно I	1651542.875	31	1.269		

*Статистички сигнификантни разлики помеѓу двете групи мајки има само за вредностите на хомоцистеинот кај мајките хомозиготи во однос на мајките хетерозиготи и оние без мутација за полиморфизмот MTHFR C677T ($p < 0,05$). За другите биохемиски параметри (фолати и витамин Б12) непостои разлика. При анализа на полиморфизмот MTHFR A1289 C, не е најдена статистички сигнификантна разлика меѓу двете групи мајки и биохемиските параметри.

Тоа е претставено и на графиконот 4:



в) one-way ANOVA test

izvedenzatestirawenasrednitevrednostizahomocisteinot, folatitei vit.B12 pome|ugrupite:

- 1-деца со расцеп-homozigoti
2. деца сорасцеп -heterozioti i bez mutacija.

полиморфизам MTHFR C677T

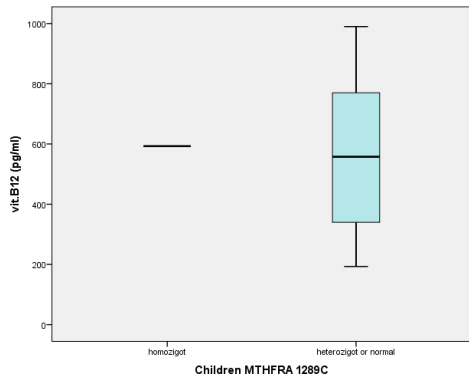
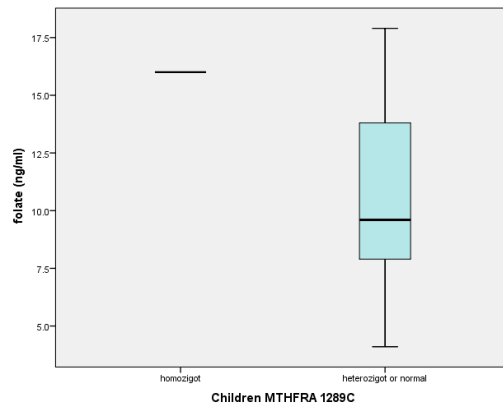
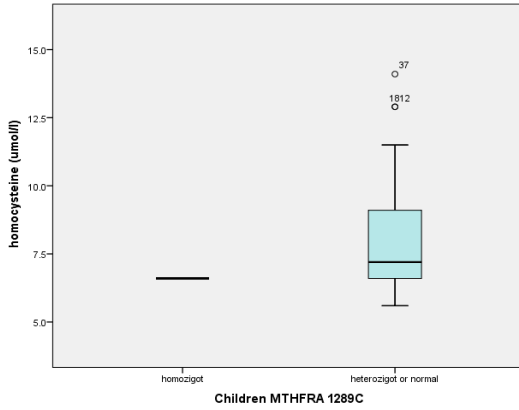
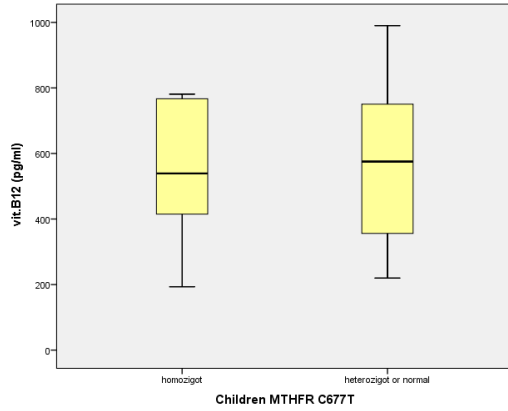
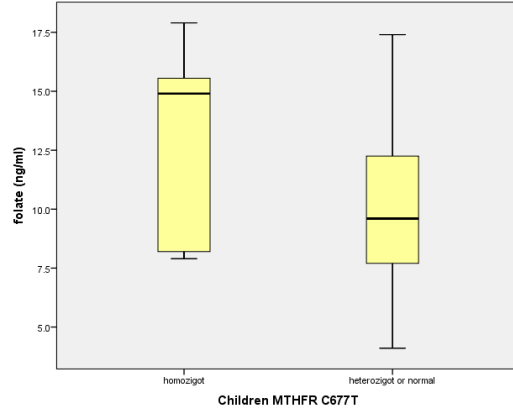
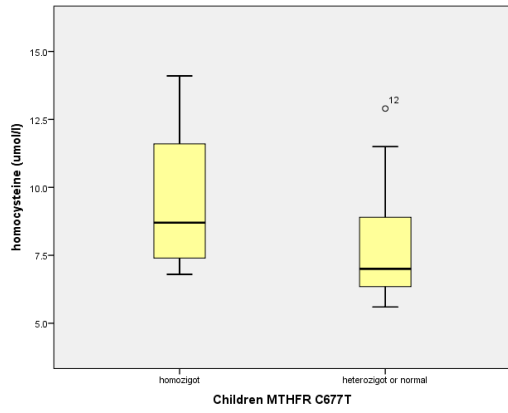
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
хомоцистеин (umol/l)	Меѓу групите	21.165	1	21.165	5.152	.029
	Во склоп на групата	152.012	37	4.108		
	вкупно	173.177	38			
Фолати (ng/ml)	Меѓу групите	29.564	1	29.564	2.134	.153
	Во склоп на групата	512.589	37	13.854		
	вкупно	542.152	38			
Витамин Б12 (pg/ml)	Меѓу групите	1800.499	1	1800.499	.034	.854
	Во склоп на групата	1951838.732	37	52752.398		
	вкупно I	1953639.231	38	21.165		

полиморфизам MTHFR A1289 C

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
хомоцистеин (umol/l)	Меѓу групите	2.254	1	2.254	.488	.489
	Во склоп на групата	170.923	37	4.620		
	вкупно	173.177	38			
Фолати (ng/ml)	Меѓу групите	28.412	1	28.412	2.046	.161
	Во склоп на групата	513.740	37	13.885		
	вкупно	542.152	38			
Витамин Б12 (pg/ml)	Меѓу групите	621.862	1	621.862	.012	.914
	Во склоп на групата	1953017.368	37	52784.253		
	вкупно I	1953639.231	38			

Статистички сигнификантни разлики помеѓу двете групи деца со расцепи-има само за вредностите на **хомоцистеинот** кај децата хомозиготи во однос на децата хетерозиготи и оние без мутација MTHFR C677T ($p < 0,05$). Само едно дете имаше хомозиготна мутација MTHFR A1289 C. За другите параметри (фолати и витамин Б12) не беше најдена статистички значајна разлика меѓу групите (графикон 5).

Графикон 5



Дискусија

1. Постојење на полиморфизми на МТНFR С677Т и МТНFRА 1289С кај испитуваната и контролната група

Преваленцата на појава на расцепи на примарните ембрионални структури е постојано иста, без оглед на употребата на современите имиџинг и молекуларни техники на откривање на конгениталните аномалии. Реализирани се голем број на студии кои укажуваат на одредени локуси во геномот на родителите кои се асоцирани со појавата на расцепи на структури кај нивните новородени деца (18,19). Некои од нив (5, 20, 21) упатуваат на региони кои влијаат врз фолатниот метаболизам, а со тоа и на развојот на плодот преку механизми на клеточна пролиферација, оксидативен стрес или апоптоза на оформените ембрионални структури.

Некои од полиморфизмите на methylenetetrahydrofolate reductase (МТНFR) генот имаат намалена способност за метаболизирање на фолатите, што во критичниот период на развој на плодот создава услови за појава на одредени конгенитални аномалии асоцирање со клеточно несврзување на одредени структури (усна/непце, рбет, срце, и т.н.). Особено за тоа се апострофирани МТНFR С677Т и МТНFRА 1289С полиморфизмите кои не обезбедуваат стабилност на ензимот, а со тоа влијаат врз намалувањето на актуелната концентрација на фолатите во одреден момент во развојот ембрионот, особено ако истите се присутни во минимална концентрација (9,10,12). Хомозиготните промени, каде и двата алела го содржат дадениот полиморфизам се претпоставува дека имаат многу поголем ефект врз метаболизмот на фолатите отколку хетерозиготните мутации каде се очекува да има остаточно делување на ензимот.

Застапеноста на хомозиготната форма ТТалелна МТНFR С677Т мутација во популацијата на испитаници (мајки, деца и контроли) во нашата серија изнесуваше 24%, што е повисока во однос на податоци од други популации (21). Сепак, за да се утврди точното присуство на овој полиморфизам во нашата популација потребна е анализа на поголема група испитаници без никакво оптеретување. Во нашата студија, присутноста на полиморфизмите на МТНFR С677Т беа процентуално повеќе застапени кај мајките на деца со расцеп во споредба со контролната група испитаници. Хомозиготна мутација беше најдена кај 35,9% од мајките на децата со расцепи за разлика од контролната група каде мутација на двата алела беше најдена кај 18% од контролната група. Сепак оваа разлика меѓу двете испитувани групи не беше сигнификантно значајна. Ваквите сознанија беа комплементарни со студијата на Boyles (22), Butali (23) и Verkleij-Nagooort (24), каде исто така нема потврда дека постоењето на овој полиморфизам е поврзан со расцепи на усна/непце, спина бифида ниту кардиопатии. Во студијата е направена стратификацијата на групата мајки чии деца имале расцеп на непце- со и без суплементација со фолати, не е најдена зависност од постоењето на МТНFR С677Т генотипот ниту во хомозиготна ниту во хетерозиготна форма.

Кај децата со расцепи хомозиготна мутација имаше кај 17,5% од испитаниците, што исто така беше сигнификантно незначајно во однос на контролната група.

Фреквенцијата на Т алелот во МТНFR С677Т полиморфизмот како патолошки беше сигнификантно поголем и кај децата со расцепи и кај мајките во однос на контролната група, што е комплементарно со иследувањето на Pi (21).

Што се однесува до полиморфизмот МТНFRА1289С, кај групата мајки е докажано присуство на хомозиготна мутација во 7,6%, додека во контролната група хомозиготна мутација

еприсатна кај 2%, што исто така има статистички несигнификантна разлика. Така, во нашата студија се отфрла хипотезата дадена кај Yu (17), каде е установено протективно дејство на оваа мутација во однос на настанувањето на расцепите. Како и да е, постоењето на овој полиморфизам во хомозиготна состојба во нашата популација е низок (4%), што бара иследување во поголема серија испитаници.

Некои студии (23) го асоцираат постоењето на поврзаноста на полиморфизмите на methylenetetrahydrofolate редуктазата со постоечки фактори од околината – консумирање алкохол, пушење пред и во тек на бременоста, што укажува на големо влијание на овие фактори врз фолатниот метаболизам. Анализана овие негативни фактори во асоцијација на постоечките полиморфизми не е направена во нашата студија.

2. Разлики во фолатниот метаболизам кај мајките и децата –носители на хомозиготен полиморфизам наспроти хетерозиготен/ нормален полиморфизам MTHFR C677T и MTHFR A1289C

Голем број на студии потврдуваат дека високата концентрација на хомоцистеин (хиперхомоцистеинемија-ННсу) е причина за низа здравствени потешкотии-невродегенеративни болести (25), забрзан процес на стареење(26), срцева инсуфициенција (27), состојби на прееклампсија (28), дијабетес (29) и многу други морбидни состојби. Меѓу другите, влијанието на фолатниот метаболизам е познато дека влијае врз ембрионалниот развој во најкритичниот развоен период (2, 6,7).

Според бројни студии, хомозиготната формана MTHFR C677T полиморфизмот (ТТ) има влијание врз вредноста на параметрите на фолатите: хомоцистеинот, фолната киселина и витаминот B12. Во целата група на мајки и деца со расцепине беше забележано големо отстапување од референтните вредности на фолатите и витаминот B12. Од сите испитувани параметри, статистички значајно отстапување во групата мајки хомозиготи во однос на мајки хетерозиготи (СТ) и оние без полиморфизам (СС) беше забележано само во однос на повисока вредност на хомоцистеинот. Тоа сепак укажува на промени во метаболизмот на фолатите кај групата мајки со ТТ полиморфизам во однос на оние мајки со СТ или СС полиморфизам. Статистичка сигнификантност во однос на постоење на хиперхомоцистеинемија беше забележана и кај групата деца со расцепи кои имаа ТТ полиморфизам на MTHFR C677T. Кај другите параметри (фолати, витамин B12) не беше забележана ваква сигнификантност ниту кај мајките ниту кај децата. Тоа се должи на фактот што што примерокот на крв кај нив беше земен во период од 9-20 месеци после концепцијата кога е најкритичниот период за настанување на расцепотод една страна, а и заради брзата изменливост на концентрацијата на овие параметри од друга. Ограничување на студијата е тоа што не е земена за анализа на биохемиските параметри на фолатниот метаболизам кај контролна група и истиот да се корелира со горенаведените податоци.

Во студијатане е детално обработен податокот за суплементација со фолна киселина кај испитуваните мајки во тек на бременоста. Потребно е спроведување на дополнителна проспективна студија на вредностите на фолатниот метаболизам на мајките во периодот на концепција со цел добивање на посоодветни податоци.

И покрај тоа што во нашата студија не е најдена јасна корелација меѓу инциденцијата и на двата полиморфизма, беше издвоена групата на мајки (14) кај кои беше детектирана хомозиготна состојба на полиморфизмот на MTHFR C677T и им беше препорачано употреба

на метилирана форма на фолна киселина со цел спречување на повторна појава на конгенитална аномалија во тек на следна бременост.

Заклучоци

Полиморфизмите на МТНFR генот МТНFR С677Т и МТНFR А1289С во испитуваната серија на деца со расцепи на структури и нивните мајки не покажаа јасна асоцијација со постоечката конгенитална аномалија кај децата. Други дополнителни фактори- одредени модифицирачки гени, или околински фактори вероватно влијаат врз појавата на аномалиите. Дополнителни студии се потребни са расветлување на постоењето на други подлежачки фактори.

Асоцијацијата на постоењето на хомозиготен ТТ полиморфизам МТНFR С677Т, а особено постоењето на Т алелот кај оваапромена и кај мајките и кај децата укажува на постоење на одредено влијание на овој полиморфизам во фолатниот метаболизам кој бара подетална обработка во поголема популациона група.

Литература

1. Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab.* 2002 Apr;3(2):211-23.
2. Christensen B, Rosenblatt DS. Effects of folate deficiency on embryonic development. *Baillieres Clin Haematol.* 1995 Sep;8(3):617-37.
3. Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem.* 2009 Dec;20(12):917-26. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.008. Epub 2009 Sep 4.
4. Bjorklund NK, Gordon R. A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *Int J Dev Biol.* 2006;50(2-3):135-41.
5. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J: Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. 93, 15227–15232
6. Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, Van Iperen L, Lindemans J, Gittenberger-de Groot AC. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Dev Dyn.* 2003 Jun;227(2):301-8.
7. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, Bieda MC, Snyder FF, Gravel RA, Cross JC, Watson ED. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell.* 2013 Sep 26;155(1):81-93. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.002.
8. Long J, Lupo PJ, Goldmuntz E, Mitchell LE. Evaluation of heterogeneity in the association between congenital heart defects and variants of folate metabolism genes: conotruncal and left-sided cardiac defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011 Oct;91(10):879-84. doi: 10.1002/bdra.22849. Epub 2011 Aug 24.
9. Yuan Y, Yu X, Niu F, Lu N. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as a potential risk factor for congenital heart disease: A meta-analysis in Chinese pediatric population. *Medicine (Baltimore).* 2017 Jun;96(23):e7057.
10. Christensen, B., Arbour, L., Tran, P., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Platt, R., Gilfix, B. M., Rosenblatt, D. S., Gravel, R. A., Forbes, P., Rozen, R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 1999, 84: 151-157.
11. O'Leary, V. B., Mills, J. L., Pangilinan, F., Kirke, P. N., Cox, C., Conley, M., Weiler, A., Peng, K., Shane, B., Scott, J. M., Parle-McDermott, A., Molloy, A. M., Brody, L. C., Members of the

- Birth Defects Research Group. Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. *Molec.Genet.Metab.* 2005. 85: 220-227,.
12. Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the *MTHFR* gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet.* 2003 May;40(5):e64.
 13. Ali A, Singh SK, Raman R. MTHFR 677TT alone and IRF6 820GG together with MTHFR 677CT, but not MTHFR A1298C, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009 Jun;13(3):355-60.
 14. Joubert BR, den Dekker HT, Felix JF et al. Maternal plasma folate impacts differential DNA methylation in an epigenome-wide meta-analysis of newborns. *Nat Commun.* 2016 Feb 10;7:10577.
 15. Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet.* 1996 Jul 6;348(9019):58.
 16. Asim A, Agarwal S, Panigrahi I, Saiyed N, Bakshi S. MTHFR promoter hypermethylation may lead to congenital heart defects in Down syndrome. *Intractable Rare Dis Res.* 2017 Nov;6(4):295-298.
 17. Yu D, Zhuang Z, Wen Z, Zang X, Mo X. MTHFR A1298C polymorphisms reduce the risk of congenital heart defects: a meta-analysis from 16 case-control studies. *Ital J Pediatr.* 2017 Dec 4;43(1):108.
 18. Razaghi-Moghadam Z, Namipashaki A, Farahmand S, Ansari-Pour N. Systems genetics of nonsyndromic orofacial clefting provides insights into its complex aetiology. *Eur J Hum Genet.* 2019 Feb;27(2):226-234. doi: 10.1038/s41431-018-0263-7. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30254216; PMCID: PMC6336842.
 19. Mukhopadhyay N, Bishop M, Mortillo M, Chopra P, Hetmanski JB, Taub MA, Moreno LM, Valencia-Ramirez LC, Restrepo C, Wehby GL, Hecht JT, Deleyiannis F, Butali A, Weinberg SM, Beaty TH, Murray JC, Leslie EJ, Feingold E, Marazita ML. Whole genome sequencing of orofacial cleft trios from the Gabriella Miller Kids First Pediatric Research Consortium identifies a new locus on chromosome 21. *Hum Genet.* 2020 Feb;139(2):215-226. doi: 10.1007/s00439-019-02099-1. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31848685; PMCID: PMC6981325.
 20. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2002 May;39(5):368-9. doi: 10.1136/jmg.39.5.368. PMID: 12011160; PMCID: PMC1735125.
 21. Pi T, Liang YQ, Xia HY, Liu YQ, You LN, Zhu Z, Wang L, Gu X, Jin XF. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism in the pregnant women of Yunnan Province, China. *Medicine (Baltimore).* 2020 Nov 6;99(45):e22771. doi: 10.1097/MD.00000000000022771. PMID: 33157923; PMCID: PMC7647581.
 22. Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A.* 2008 Feb 15;146A(4):440-9. doi: 10.1002/ajmg.a.32162. PMID: 18203168; PMCID: PMC2366099.
 23. Butali A, Little J, Chevrier C, Cordier S, Steegers-Theunissen R, Jugessur A, Oladugba B, Mossey PA. Folic acid supplementation use and the MTHFR C677T polymorphism in orofacial clefts etiology: An individual participant data pooled-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2013 Aug;97(8):509-14. doi: 10.1002/bdra.23133. Epub 2013 May 13. PMID: 23670871; PMCID: PMC3745533.
 24. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and

- congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2007 May 1;143A(9):952-60. doi: 10.1002/ajmg.a.31684. PMID: 17431894.
25. Hama Y, Hamano T, Shirafuji N, Hayashi K, Ueno A, Enomoto S, Nagata M, Kimura H, Matsunaga A, Ikawa M, Yamamura O, Ito T, Kimura Y, Kuriyama M, Nakamoto Y. Influences of Folate Supplementation on Homocysteine and Cognition in Patients with Folate Deficiency and Cognitive Impairment. *Nutrients*. 2020 Oct 14;12(10):3138. doi: 10.3390/nu12103138. PMID: 33066591; PMCID: PMC7602498.
 26. Mooijaart SP, Gussekloo J, Frölich M, Jolles J, Stott DJ, Westendorp RG, de Craen AJ. Homocysteine, vitamin B-12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr*. 2005 Oct;82(4):866-71. doi: 10.1093/ajcn/82.4.866. PMID: 16210718.
 27. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(1):75-81. doi:10.1007/s10545-010-9177-4
 28. Zheng L, Huang J, Kong H, Wang F, Su Y, Xin H. The effect of folic acid throughout pregnancy among pregnant women at high risk of pre-eclampsia: A randomized clinical trial. *Pregnancy Hypertens*. 2020 Jan;19:253-258. doi: 10.1016/j.preghy.2020.01.005. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31987769.
 29. Chapman LE, Darling AL, Brown JE. Association between metformin and vitamin B₁₂ deficiency in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab*. 2016 Nov;42(5):316-327. doi: 10.1016/j.diabet.2016.03.008. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27130885.