Оригинальная статья

Применение генетико-демографических подходов к оценке риска рождения детей с расщелинами губы и неба

Текуцкая Е.Е.

ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Краснодар

Поступила в редакцию 25 апреля 2015 г., Принята в печать 12 мая 2015 г.

© 2015, Текуцкая Е.Е.
© 2015, Психосоматические и интегративные исследования

Резюме:
Выявлены соотношения вклада отдельных факторов в этиологию врожденных пороков развития челюстно-лицевой области. Полученные данные необходимы для оценки и прогнозирования риска рождения детей с такими дефектами в популяциях и отдельных семьях, а также для развития профилактических мер, направленных на снижение частоты врожденных пороков развития. В этой связи предпринято комплексное изучение врожденных пороков челюстно-лицевой области у населения Краснодарского края, включающее анализ генетических факторов (изучены однонуклеотидные полиморфизмы двух генов FOXE1 и MHFTR, кодирующих фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, который участвует в фолатном обмене), генетико-демографических (брачная структура, возраст матери) и средовых (биологическое носительство токсичных тяжелых металлов).

Ключевые слова: врожденные пороки развития челюстно-лицевой области, брачная структура, однонуклиотидные полиморфизмы, содержание свинца, кадмия, цинка, меди.

Библиографическая ссылка: Текуцкая Е.Е. Применение генетико-демографических подходов к оценке риска рождения детей с расщелинами губы и неба. Психосоматические и интегративные исследования 2015; 1: 0104.

Original article

Application of the genetically demographic Approaches to the assessment of risk of the birth of children With lip and sky crevices

Tekutskaya E.E.

FSBEI HPE «Kuban state university» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Krasnodar

Received on 25 April 2015, Accepted on 12 May 2015

© 2015, Tekutskaya E.E.
© 2015, Psychosomatic and Integrative Research

Summary:
Ratios of separate factors' contribution to the etiology of congenital developmental anomalies of maxillofacial area are revealed. The obtained data are necessary for assessment and forecasting of risk of the birth of children with such defects in populations and separate families, and also for development of preventive measures directed to frequency reduction of the congenital developmental anomalies.
In this regard complex studying of congenital defects of maxillofacial area is done among the population of Krasnodar Krai, which includes the analysis of genetic factors (single nucleotide polymorphisms (SNP) of the two genes of FOXE1 and MHFTR which code the enzyme participating in folate exchange), genetically demographic factors (marriage structure, age of mother) and environmental factors (biological carriage of toxic heavy metals).

Keywords: congenital developmental anomalies of maxillofacial area, marriage structure, single nucleotide polymorphisms (SNP), content of lead, cadmium, zinc, copper.

Cite as Tekutskaya E.E. Application of the genetically demographic Approaches to the assessment of risk of the birth of children With lip and sky crevices. Psychosomatic and Integrative Research 2015; 1: 0104.

Введение

Мутации у человека возникают постоянно как в процессе обычных физиологических функций организма, так и в результате дополнительных воздействий на наследственные структуры физических, химических и биологических факторов. Достоверно установлено, что широко применяемые в промышленности и сельском хозяйстве бензин, фенолы, хлоропрен, инсектициды и гербициды, а также свинец и пары ртути обладают эмбриотоксическими свойствами. В эксперименте почти все эти вещества приводят к развитию врожденных пороков у значительного количества потомства.

Накопление мутаций, которое увеличивает генетический груз, создает угрозу генетической безопасности населения. Известно, что генетический груз популяции – накопление неблагоприятных и вредных, а зачастую и летальных, мутаций в результате загрязнения окружающей среды является одной из угроз биологическому будущему человечества [1].

Современная медицина позволяет «откорректировать» фенотипические проявления многих наследственных патологий, создать адаптивную среду для генотипов, которые в более жестких условиях были бы элиминированы естественным отбором, и тем самым повышает их приспособленность и способствует передаче генов наследственных заболеваний следующим поколениям. Этот феномен получил название «дисгенный эффект медицины» [1].

Многократное уменьшение дорепродуктивной смертности – результат социального прогресса и успехов здравоохранения. Если в прошлом против этих врожденных пороков развития (ВПР) действовал довольно сильный естественный отбор, то в настоящее время, вследствие прогресса медицины и появления эффективных методов хирургической коррекции дефектов в раннем возрасте, происходит ослабление действия отбора. Дети с ВПР не только выживают, но и в будущем имеют возможность вступить в брак, иметь потомков, которым они передадут свои гены, что может привести к постепенному накоплению в популяции мутаций, обусловливающих развитие данных ВПР.

Факторы загрязнения окружающей среды и факторы образа жизни (стресс, табакокурение, алкоголизм, профвредности и пр.) могут ассоциироваться с ВПР как из-за появления мутаций de novo, так и из-за тератогенных эффектов – нарушения внутриутробного развития эмбриона в результате неблагоприятных воздействий в период беременности матери. Факторы образа жизни могут усиливать оценки риска для развития ВПР у носителей редких мутаций по различным задействованным генам [2, 3, 4].

В результате полногеномных ассоциативных исследований в семьях с детьми с ВПР челюстно-лицевой области (ЧЛО) в Европе и в мире был выявлен в целом сходный спектр генов (около 15 генов), расположенных на разных хромосомах, которые вовлечены в появление ВПР. Многие из этих генов – транскрипционные факторы, влияющие на уровень экспрессии других генов. Спектр мутаций в этих генах может носить этноспецифический характер, поэтому исследование необходимо проводить в конкретном регионе, только тогда оно может быть наиболее эффективным [3].

Расщелины губы и неба являются результатом нарушения нормального эмбрионального процесса развития плода. Изолированные расщелины, т.е. не в составе разнообразных синдромов, составляют до 70 % от общего числа документированных расщелин губы и неба. Расщелины губы и неба (или по определению некоторых исследователей несращения) являются пристальным объектом медицинской науки. Помимо мониторинга, лечения и реабилитации детей с данными ВПР ЧЛО всегда параллельно шло изучение причин и механизмов этой патологии [5].

Определенную роль в этиологии мультифакториальных патологий может играть интегральная структура генотипа (уровень гетерозиготности по совокупности локусов), обусловленная структурой браков (имбридинг или аутбридинг). Из числа демографических факторов, влияющих на возникновение врожденных пороков развития, наиболее генетически значимым является возраст матери при рождении ребенка.

Объекты и методы исследования

Сведения о детях с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области и их матерях получены из диспансерной компьютерной базы данных, созданной на кафедре детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии Кубанского государственного медицинского университета.

Проведено анкетирование 140 семей с больными и 130 семей со здоровыми детьми, составлена компьютерная база данных (включающая всех больных детей, состоявших на диспансерном учете с 1985 г.). Анкетирование включало сбор генетико-демографических данных о пациенте, его родителях и других предках (дата рождения, место рождения и жительства, национальная принадлежность), а также данные о профессиях родителей, вредных условиях работы и об их вредных привычках (курение, наркомания, алкоголизм). На основе этих данных проанализированы возраст матери при рождении больного ребенка и структура браков в предшествующих поколениях.

Из собранных образцов крови с помощью наборов реактивов фирмы «Изоген» (Москва) выделены ДНК, а затем методом ПЦР-ПДРФ проведен анализ распространения двух однонуклеодидных полиморфизмов – SNP (single nucleotide polymorphisms) C677T и A1298C гена MTHFR с использованием рестриктаз HinfI и MboII, соответственно как описано в [6]. Рассматриваемые SNP ассоциируются, как установлено в ряде исследований, с формированием врожденных расщелин губы и неба [7]. Аналогичные данные собраны для контрольной группы здоровых детей.

Определение содержания токсичных тяжелых металлов и микроэлементов в цельной крови и сыворотке крови проводилось методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе «Perkin-Elmer-360» с использованием графитовой кюветы HGA-500 согласно рекомендациям, изложенным в материалах [8] и модифицированным в работе [9].

Также было проведено определение содержания тяжелых металлов в цельной крови детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области, верифицированных в соответствии с МКБ-10 (коды Q35–Q37), и их родителей. Дети проживали на территориях Краснодарского края с различным уровнем загрязнения среды обитания согласно данным авторов [10].

© 2014, LLC Science and Innovations, Saratov, Russia

Результаты и обсуждение результатов

Возраст матери при рождении ребенка

Анализ возрастного распределения матерей, родивших детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области в период с 1978 по 2009 г. (N = 999) показал, что для всей группы средний возраст матери составляет 25,99 ± 0,18 лет (σ = 5,72). Для матерей, родивших детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области в 2002–2009 гг. средний возраст составляет 26,38 ± 0,27 лет (σ = 5,73).

В ходе исследований выяснено, что риск рождения ребенка с врожденным пороком развития возрастает для матери старше 35 лет, особенно значительно – для матери старше 40 лет (рис. 1).

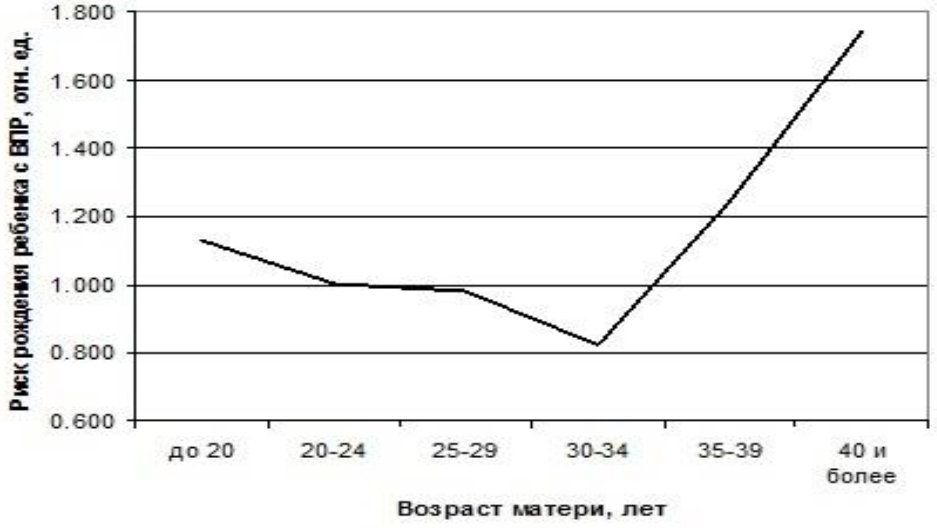

Рис. 1 Относительный риск рождения ребенка с ВПР ЧЛО в зависимости от возраста матери (ординаты кривой показывают, во сколько раз частота рождения детей с ВПР ЧЛО в каждом возрастном диапазоне матери превышает среднепопуляционную величину)

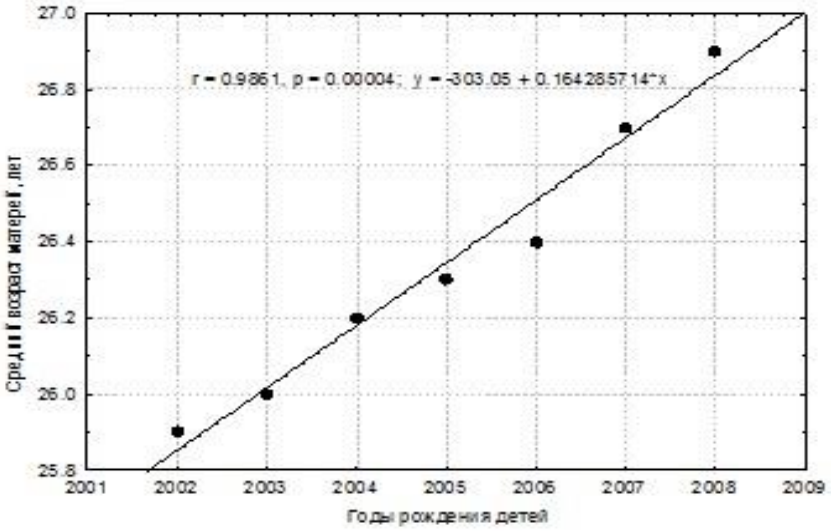

Рис. 2 Динамика изменения среднего возраста матерей в Краснодарском крае в зависимости от года рождения детей

Небольшое увеличение риска отмечается и для очень молодых матерей (моложе 20 лет). Следовательно, возраст матери действительно является в Краснодарском крае фактором риска рождения ребенка с врожденным пороком развития челюстно-лицевой области.

По статистическим данным Краснодарстата в Краснодарском крае отмечено увеличение среднего возраста матерей (рис. 2), которое составило за период с 2001 по 2008 г. ровно 1 год. При сохранении такой тенденции можно ожидать некоторого роста частоты детей с данной патологией.

Брачная структура

В соответствии с генеалогическими данными анкет семьи были распределены по степени экзогамии на 6 категорий: от минимальной (все предки происходят из одной области) до максимальной (в родословной встречаются предки более двух национальностей).

Для детей русской национальности (этническая идентификация сделана со слов родителей) различие распределений между группами больных и здоровых статистически достоверно: степень экзогамии в семьях больных детей в среднем выше, чем у здоровых. Это свидетельствует о малой вероятности эффектов инбридинга в этиологии врожденных пороков развития челюстно-лицевой области в русских семьях Краснодарского края.

Почти у трети (32 %) «русских» детей с врожденным пороком развития челюстно-лицевой области в родословной встречаются предки разных национальностей (в контроле таких семей 27 %). Установлен более высокий и этнически разнообразный приток генов по отцовской линии (22 %) по сравнению с материнской линией (14 %) у русских детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области.

Доля семей с уровнем экзогамии выше 3 в группе больных составляет 27,4 %, в контроле – 8,7 %. Соответственно можно ожидать более высокого уровня генетического разнообразия в группе больных детей.

Полученные результаты позволяют предположить, что у детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области в Краснодарском крае могут быть выявлены мутации генов, вовлеченных в развитие расщелин губы и неба, которые распространены в разных этнических группах России и сопредельных стран, что соответствует факту проживания в Краснодарском крае представителей широкого спектра национальностей.

Распределение двух SNP гена MTHFR

В изученных выборках не наблюдали достоверных отклонений от равновесия Харди-Вайнберга. Не выявлено также достоверных различий по распределению генотипов обоих SNP между больными детьми и контролем.

В контроле по A1298C отмечена более высокая частота аллеля A и низкая аллеля C. Наблюдается также избыток гетерозигот у детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области, который, однако, не достиг достоверного уровня. Вероятно, при увеличении выборки можно будет судить об этих различиях более определенно.

У детей с врожденными пороками развития и в контрольной группе проведена проверка на достоверность различий между классами генотипов, не содержащими «плохих» аллелей, против классов генотипов, содержащих хотя бы один «плохой» аллель: C/C против C/T + T/T по SNP C677T и AA против A/C + C/C по SNP A1298C.

Данная проверка показала отсутствие достоверных различий по первому SNP ($\chi2$ = 0,2877; d, f = 1; P ≥ 0,05) и достоверные различия по второму SNP ($\chi2$ = 4,7120; d, f = 1; P ≤ 0,05).

Полученный результат указывает на роль второго SNP в развитии изученного спектра врожденных пороков развития в Краснодарском крае, что предполагает возможность использования маркеров SNP A1298C гена MTHFR в медико-генетическом консультировании для учета генетического риска рождения детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области.

В мире активно ведутся работы по поиску генетических маркеров и факторов образа жизни, вызывающих ВПР ЧЛО. Полногеномные ассоциативные исследования для семей с детьми с данными ВПР проведены как в масштабе Европы в выборке из 91 семьи, так и в масштабе всего мира в выборке из 820 семей (Mangold et al. 2009, Marazita et al. 2009). В результате этих исследований были выявлены несколько областей генома, где расположены гены, участвующие в формировании врожденных пороков развития челюстно-лицевой области (1q32, 2p13, 3q27-28, 9q21, 12p11, 14q21-24 и 16q24).

В ряде случаев установлены непосредственно и те гены, дефекты в которых обусловливают развитие ВПР ЧЛО. Это, например, гены IFR6 (1q32) (Jugessur et al., 2008; Rahimov et al., 2008) и FOXE1 (9q21) (Vieira et al. 2005), а в некоторых случаях выявлены предопределяющие генетические маркеры (конкретные SNP) (Venza et al., 2009). Среди установленных генов многие являются факторами транскрипции, а выявленные маркеры приводят к снижению экспрессии генов, нарушению структуры сайтов для прикрепления факторов транскрипции или к нарушению функционирования гена. Нами определены SNP двух генов FOXE1 и MHFTR, кодирующих фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, который участвует в фолатном обмене

Влияние факторов загрязнения окружающей среды

Проведенные исследования также показали наличие в цельной крови у детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области и их родителей токсичного тяжелого металла кадмия (II), обладающего выраженным мутагенным действием, по мнению авторов [11] и материалам ВОЗ.

В крови у 60 % обследованных матерей и у 45 % детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области кадмий (II) содержался в количестве 0,005 ± 0,001 мг/л, коэффициент корреляции составляет r = 0,74, что свидетельствует о наличии прямой корреляционной связи по данному показателю в парах мать – ребенок.

Присутствие свинца (II) в крови выявлено у всех обследуемых матерей и детей, полученные значения содержания этого тяжелого металла выше, чем в группе сравнения. Коэффициент корреляции r между содержанием свинца (II) в крови для пар ребенок – мать составляет 0,63.

Оценка уровней содержания исследуемых соединений в крови позволила установить, что в организме детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области регистрируются более высокие уровни токсикантов относительно показателей у детей группы сравнения и референтными концентрациями (табл. 1).

© 2015, LLC Science and Innovations, Saratov, Russia

По данным литературы [11], при содержании цинка в сыворотке крови матери ниже 1,3 мкМоль/л в 18 % случаев наступает цинкдефицитная эмбриопатия, основными проявлениями которой являются гидроцефалия, расщелина неба, искривления позвоночника и т.д.

Найденная концентрация цинка (II) в крови у обследованных групп позволяет однозначно утверждать об имеющемся дефиците этого важного эссенциального микроэлемента у 43 % матерей детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области.

Нами также определялась концентрация в сыворотке крови детей и их родителей жизненно необходимого эссенциального микроэлемента меди (II). Среднее содержание меди (II) в сыворотке крови у детей, матерей и в группе сравнения находится на уровне 0,93 ± 0,06 мг/дм3. Коэффициент корреляции r для меди (II) в парах ребенок – мать наиболее высокий и составляет 0,83.

Таблица 1

Сравнительная оценка содержания тяжелых металлов в крови детей с врожденными пороками развития челюстно-лицевой области, M ± m, мг/дм3

Химический элемент	Группа наблюдения (n = 60)	Группа сравнения (n = 20)	Референтный уровень	Значимость различий	
				P^1	P^2
Медь	0,966 ± 0,185	0,843 ± 0,107	0,9 – 1,5	0,037	0,043
Свинец	0,187 ± 0,009	0,127 ± 0,009	0,15	0,041	0,051
Цинк	5,050 ± 0,133	5,802 ± 0,440	6,0 – 8,0	0,044	0,058
Кадмий	0,004 ± 0,001	0	0	–	–

Примечание: P1 – показатели группы наблюдения и группы сравнения; P2 – показатели группы сравнения и референтного уровня

Прогрессивную роль в понимании патогенеза и выявлении причин врожденных пороков развития сыграло учение о критических периодах, а также учение о тератогенетических терминационных периодах [12, 13]. К основным механизмам тератогенеза на тканевом уровне относят гибель отдельных клеток и клеточных масс, замедление распада и рассасывания клеток.

До настоящего времени в должной мере не учитывается роль токсичных и эссенциальных микроэлементов в патогенезе. Между тем эссенциальные микроэлементы нормализуют каталитические, структурные и регуляторные функции многочисленных ферментов, обладают антиоксидантным действием, участвуют в метаболизме жирных кислот. В то же время некоторые токсичные тяжелые металлы, такие, как свинец и кадмий, могут способствовать течению патологических процессов в период дифференциации клеток и формообразования органов, поскольку угнетают синтез белка и обмен нуклеиновых кислот [11, 12].

Кроме того, большое влияние на возникновение врожденных пороков развития имеет дефицит эссенциальных микроэлементов, в частности цинка, меди и марганца [11]. Для человека наиболее изучено тератогенное действие дефицита цинка, которое связывают с торможением активности цинкзависимых ферментов синтеза ДНК, в результате чего извращается клеточный цикл и тормозится фаза дробления. Так, отмечается, что при содержании цинка в сыворотке крови матери ниже 1,3 мкмоль/л в 18 % случаев наступает цинкдефицитная эмбриопатия, основными проявлениями которой являются гидроцефалия, расщелина неба, губы и т.д.

В целом полученные данные согласуются с мнением авторов [2], которые отмечают, что любой фактор (генетический или средовой), способный снижать митотическую активность в ходе эмбриогенеза, например: ингибиторы синтеза ДНК, дефекты в транскрипционных факторах, снижение экспрессии генов, дефицит кислорода в тканях и органах (оксидативный стресс), может привести к развитию врождённых аномалий.

Заключение

Разработанная в ходе исследований технология оценки риска врожденных пороков развития челюстно-лицевой области сочетала генетико-демографический, молекулярно-генетический, эколого-генетический подходы и включала анализ следующих факторов: вклад мутаций широкого спектра генов, генотоксических факторов, факторов окружающей среды. По результатам исследования выявлено три фактора, связанных с повышенной частотой расщелин губы и неба: возраст матери выше 35 лет, более высокий уровень семейной экзогамии и повышенное содержание токсичных тяжелых металлов (свинца и кадмия) в биосредах детей с ВПР ЧЛО и их родителей.

Список литературы

1. Фогель Ф., Мотульский А. Генетика человека. Проблемы и подходы. М.: Мир, 1990; 366 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: 2004; 622 с.
3. Алтухов Ю.П., Курбатова О.Л. Проблема адаптивной нормы в популяциях человека. Генетика 1990; 26 (4): 583–598.
4. Курбатова О.Л. и др. Изменчивость морфофизиологических и генетико-демографических признаков в группе детей с врожденными расщелинами губы и неба. Генетика 2011; 47 (11): 1514−1522.
5. Шульженко В.И., Текуцкая Е.Е., Васильев Ю.А. Саливадиагностика и определение содержания микроэлементов в организме детей с аномалиями развития верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Успехи современного естествознания 2008; (5): 158.
6. Micheal Sh., Qamar R., Akhtar F., et al. MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and homocysteine levels in primary open angle and primary closed angle glaucoma. Molecular Vision 2009; 15: 2268−2278.
7. Shi Min, Caprau D., Paul Romitti P. 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 Reseach (Part A). Wiley-Liss, Inc. 2003; 67: 545−549.
8. Тиц Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: 1987; 432 с.
9. Текуцкая Е.Е., Бойчук Л.В. Влияние токсичных микроэлементов и элементодефицитных состояний на развитие патологии пищеварительной системы. Успехи современного естествознания 2005; (10): 262−265.
10. Шашель В.А., Нефедова Л.В., Тарасова Л.В. Медико-экологический атлас Краснодарского края. 2002.
11. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А. Микроэлементозы человека. М.:1991.
12. Лазюк Г.И. Тератология человека. Руководство для врачей. М.: 1991; 480 с.
13. Хлобыстова Т.В. Этиопатогенные аспекты классификации врожденных расщелин челюстно-лицевой области. Курск, 2006.

Авторы:

Текуцкая Е.Е. – кандидат химических наук, доцент кафедры радиофизики и нанотехнологий, ФГБОУ ВПО Кубанский государственный университет Министерства образования и науки РФ, г. Краснодар, почтовый адрес: 360040, г. Краснодар, ул. Тюляева 37/2, кв.46 тел. рабочий: 88612199566 тел. домашний: 89628560000, E-mail: tekytska@mail.ru