

УТВРЂИВАЊЕ СТЕПЕНА ГЕНЕТИЧКЕ ХОМОЗИГОТНОСТИ КОД БОЛЕСНИКА СА СПИНАЛНИМ ДИСРАФИЗМИМА

Сузана ЦВЈЕТИЋАНИН¹, Дејан НИКОЛИЋ², Ивана ПЕТРОНИЋ², Биљана ЈЕКИЋ¹,
Татјана ДАМЊАНОВИЋ¹, Драгана ЂИРОВИЋ², Владимир РАДЛОВИЋ², Татјана КНЕЖЕВИЋ²

¹Институт за хуману генетику, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд;

²Универзитетска дечја клиника, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Спинални дисрафизам настаје као последица непотпуне фузије средње линије ембрионалне тубе и одликује се широким ентитетом аномалија кичме. Полазећи од чињенице да су спинални дисрафизми генетички одређени, претпостављено је да увећана хомозиготност и смањена варијабилност код оболелих особа могу бити у корелацији с настанком ових поремећаја.

Циљ рада Узимајући у обзир искуства многих истраживача који су проучавали природу наслеђивања низа моногенетски и олигогенетски одређених квалитативних особина код људи, као циљ рада постављено је утврђивање степена генетичке хомозиготности помоћу тзв. хомозиготно-рецесивних особина (ХРО) код испитаника са спиналним дисрафизмима.

Метод рада Испитивање је вршено применом теста за утврђивање хомозиготно-рецесивних особина код људи (степен хомозиготности), ХРО- теста, који обухвата низ претежно квалитативних морфолошких и функционалних одлика.

Резултати Поређењем заступљености 15 ХРО у контролној групи, коју је чинило 50 испитаника, и групи оболелих особа, коју је чинило 35 испитаника, утврђено је да је просечан број ХРО $3,5 \pm 0,2$, односно $4,8 \pm 0,3$. Чак 11 оваквих особина се чешће јавља код болесника са спиналним дисрафизмима, од којих пет статистички значајно одступа.

Закључак Ово популационогенетичко истраживање је показало не само статистички значајне разлике у просечним вредностима генетичке хомозиготности, већ и разлике у начину расподеле испитаних особина, као и разлике у постојању специфичних комбинација ХРО код здравих и оболелих особа.

Кључне речи: спинални дисрафизми; ХРО-тест; генетичка хомозиготност

УВОД

Оштећења нервне цеви (спинални дисрафизми) су сложени поремећаји с мултифакторском етиологијом, која укључује како генетичке, тако и утицаје средине. Спинални дисрафизам настаје као последица непотпуне фузије средње линије ембрионалне тубе и одликује се широким ентитетом аномалија кичме.

Како су генетичка истраживања рађена на појединим породицама, то су и закључци о типу наслеђивања овог поремећаја различити. Неки истраживачи сматрају да су спинални дисрафизми одређени аутозомно доминантно, док други сугеришу рецесивно наслеђивање [1-3]. Истраживања појединих аутора, пак, упућују на то да се ови поремећаји наслеђују рецесивно везано за Х-хромозом [4-6], док Њутн (*Newton*) и сарадници [7] у својим радовима изражавају сумњу у овакав начин одређивања обољења. Цитогенетска истраживања изведена деведесетих година двадесетог века показују да спинални дисрафизми могу бити последица структурних аберација хромозома: дупликација, делеција и транслокација [8-10].

Генски локуси за које је досад утврђено да су повезани са спиналним дисрафизмима су: *6q27*, *17q11.2-q12*, *1p13* (*Online Mendelian Inheritance in Man* – *ОМИМ* број 182940), као и *1q43*, *14q24*, *5p15.3-p15.2* (*ОМИМ* број 601634).

Полазећи од чињенице да су спинални дисрафизми генетички одређени, претпостављено је да увећа-

на хомозиготност и смањена варијабилност код оболелих особа могу бити у корелацији с настанком ових поремећаја.

Утврђивање генетичке хомозиготности код човека је веома деликатан задатак, јер се за релативно мали број биохемијских одлика зна место гена чији алели одређују одговарајуће процесе. Међутим, за низ морфолошко-физиолошких особина, на основу њиховог наслеђивања и типа варијабилности, утврђено је да се испољавају као квалитативне одлике, при чему је вероватно да се могу налазити под контролом једног или малог броја гена. Истраживања која су испитивала расподелу и заступљеност бројних, јасно испоњених рецесивних особина показала су значајне разлике у постојању ових особина код различитих група испитаника (међупопулациона и унутарпопулациона поређења, на пример, оболелих и здравих особа, спортиста и неспортиста, припадника одређених региона итд.) [10-19].

Неке хомозиготно-рецесивне особине (ХРО) у региону главе су: плаве очи (генска локација *19p13.1-q13.11*, *ОМИМ* број 227240), везан ушни режањ (*ОМИМ* број 128900), раван скалп (*ОМИМ* број 194000), права, мека, плава коса (*ОМИМ* бројеви 139450 и 210750), два цвета у коси, обрнута оријентација косе у цвету (*ОМИМ* број 139400), неспособност попречног и уздужног савијања језика (*ОМИМ* број 189300), грлено „р”, неосетљивост на *PTC* (генска локација *7q35-q36*, *ОМИМ* број 607751) и далтонизам (генска локација

Xq28, OMIM број 303800). Рецесивне особине које обухватају предео екстремитета су: дистална и проксимална хиперекстензибилност палца, кажипрст дужи или краћи од четвртог прста (OMIM број 136100), леворукост (локација гена 2p12-q22, OMIM број 139900), начин преклапања шака (OMIM број 139800) итд. [20].

ЦИЉ РАДА

Узимајући у обзир искуства многих истраживача који су проучавали природу наслеђивања низа моногенетски и олигогенетски одређених квалитативних особина код људи, као циљ рада постављено је утврђивање степена генетичке хомозиготности помоћу тзв. хомозиготно-рецесивних особина (ХРО) код испитаника са спиналним дисрафизмима.

МЕТОД РАДА

Аутори београдске популационогенетичке школе су своја истраживања засновали на утврђивању заступљености и расподеле рецесивних особина ради процене индивидуалних и групних разлика у односу на друге особености [10-18]. Степен генетичке

хомозиготности и варијабилности код испитаника са спиналним дисрафизмима и здравих особа контролне групе утврђиван је помоћу ХРО-теста (тест за утврђивање ХРО код људи, тј. степена хомозиготности), који обухвата низ претежно квалитативних морфолошких и функционалних одлика [19]. Утврђивањем постојања квалитативних ХРО стиче се увид о томе да ли је у питању преваленција хомозиготних или хетерозиготних локуса на различитим хромозомима, од којих само неки могу бити у вези с физичким способностима испитаника. Утврђени број ХРО заправо представља врсту показатеља за степен генско-хромозомске хомозиготности, која може да испољава изузетну индивидуалну, као и групну варијабилност [10-18].

У раду је директним посматрањем утврђивано постојање 15 ХРО, које су наведене у табели 1. Ради што веће објективности приликом прикупљања података, испитивање је обављала иста особа. Да бисмо били сигурни да је дата особина одређена рецесивним аелима, код особина које показују велику променљивост (боја косе и очију, облик скалпа, хиперекстензибилност зглобова) рецесивним одликама сматране су само екстремне (изразито плава коса и плаве очи, изузетно мека коса, изразита хиперекстензибилност зглобова и сл.).

ТАБЕЛА 1. Заступљеност хомозиготно-рецесивних особина код испитаника контролне групе и испитаника са спиналним дисрафизмима (*Spina bifida aperta*, *Spina bifida occulta*).

TABLE 1. Frequencies of homozygous recessive characteristics in the group of patients with spinal dysraphia and control group of individuals (*Spina bifida aperta*, *Spina bifida occulta*).

Редни број Number	Хомозиготно-рецесивна особина Homozygously-recessive trait	Контролна група Control group (N=50)	Оболели испитаници Affected patients (N=35)	χ^2
1	Светла коса Blond hair	20%	57.1%	68.82***
2	Права коса Straight hair	48%	60%	3
3	Два цвета у коси Double hair whorl	10%	0%	10**
4	Обрнут цвет косе Opposite hair whorl orientation	12%	25.7%	15.64***
5	Мека коса Soft hair	40%	65.7%	16.51***
6	Раван скалп Continuous hairline	54%	48.6%	0.54
7	Везан ушни режањ Attached ear lobe	32%	2.9%	26.46***
8	Ухо без Дарвинове кврге Ear without Darwinian knot	8%	5.7%	0.66
9	Светле очи Blue eyes	24%	34.7%	4.42*
10	Далтонизам Colour blindness	2%	2.9%	0.41
11	Десни палац преко левог палца Right thumb over left thumb	36%	40%	0.44
12	Палац под углом од 45° Top joint of the thumb >45°	28%	31.4%	0.41
13	Хиперекстензибилност палца Proximal thumb extensibility	18%	20%	0.22
14	Леворукост Left-handedness	20%	25.7%	1.62
15	Кажипрст дужи (мушкарци), односно краћи (жене) од домалог прста Index finger longer (males)/shorter (females) than the ring finger	16%	45.7%	55.13***

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

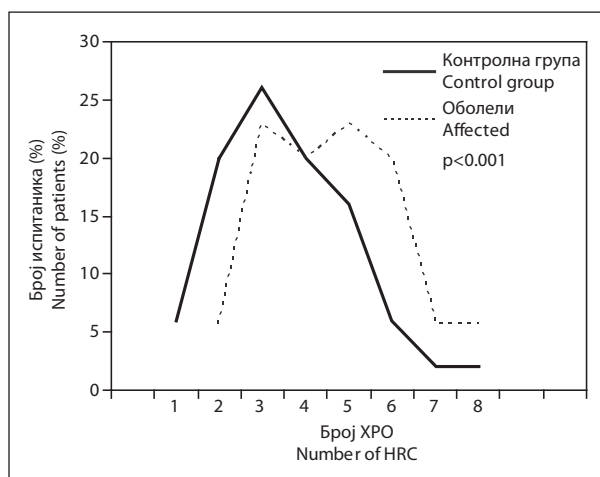
Групу оболелих особа чинило је 35 испитаника узраста од две године до 17 година, и то 13 испитаника код којих је дијагностикована *Spina bifida aperta* и 22 испитаника код која је дијагностикована *Spina bifida occulta*. Испитаници су били тзв. спорадични, а не „фамилијарни случајеви”. Контролна група, коју су чинили здрави, насумично одабрани испитаници, обухватила је 50 деце истог узраста и с исте територије (Београд) као и оболела деца. Оболели испитаници и појединци из контролне групе били су припадници исте нације (српске).

Значајност разлика у добијеном степену хомозиготности између контролне и групе оболелих испитаника утврђивана је за сваку особину појединачно, као и за свих 15 ХРО заједно, применом χ^2 -теста. На основу резултата добијених ХРО-тестом израчунате су просечне вредности у заступљености ХРО, које су затим упоређиване, а њихова статистичка разлика утврђена је применом Студентовог *t*-теста.

РЕЗУЛТАТИ

Посматрајући заступљеност и расподелу 15 ХРО код 35 испитаника са спиналним дисрафизмима и 50 деце контролне групе, примећено је да између ове две групе испитаника постоје значајне разлике ($\Sigma\chi^2=204,3$; $p<0,001$; Табела 1). Чак 11 од 15 ХРО забележено је више код оболелих испитаника, од чега пет показује статистички значајно одступање (особине под редним бројевима 1, 4, 5, 9. и 15). С друге стране, већу процентуалну заступљеност ХРО у контролној групи испитаника показују четири испитане ХРО, од којих две статистички значајно одступају (редни бројеви 3. и 7).

Већ се по резултатима ових поређења заступљености ХРО уочава повећана рецесивна хомозиготност



ГРАФИКОН 1. Укупна заступљеност хомозиготно-рецесивних особина (ХРО) код испитаника контролне групе и испитаника са спиналним дисрафизмима (*Spina bifida aperta*, *Spina bifida occulta*).

GRAPH 1. Total frequency of homozygous recessive characteristics (HRC) in the group of patients with spinal dysraphia and control group of individuals (*Spina bifida aperta*, *Spina bifida occulta*).

код испитаника са спиналним дисрафизмима за генске локусе који су одговорни за одређивање особина чија је заступљеност анализирана. Поређење просечних вредности ХРО код испитаника контролне и групе оболелих (Табела 1, Графикон 1) открило је статистички значајно чешће постојање ХРО код испитаника са спиналним дисрафизмима (контролна група $3,5\pm 0,2$; група оболелих $4,8\pm 0,3$; $t=3,61$; $p<0,001$). Ови резултати упућују на то да је код испитаника контролне групе свака четврта, а код оболелих испитаника свака трећа особина хомозиготно-рецесивна. Пратећи расподелу ХРО (Графикон 1) у контролној и групи оболелих испитаника, примећује се да су добијени нумерички резултати код испитаника са спиналним дисрафизмима померени ка вишим вредностима, што упућује на виши степен опште генетичке хомозиготности код особа с овим поремећајем.

ДИСКУСИЈА

Налази савремених студија указују на то да генетички фактори, као што су гени из фолатног циклуса *FRα* и *FRβ*, гени из групе *PAX* (*Pax-3*) и *t*-локус (*brachyury*), не утичу на оштећење нервне цеви, која је повезана с настанком спиналног дисрафизма [21, 22]. С друге стране, ген 5,10-метилентетрахидрофолат-редуктазе (*MTHFR*) из групе фолатног циклуса повезан је с развојем поремећаја нервне цеви [23]. Улога и позитивна корелација спољашњих фактора, као што су валпроична киселина и недостатак фолата у етиогенези ове болести, такође су описивани у ранијим истраживањима [24].

С обзиром на типичну клиничку слику спиналног дисрафизма, која се огледа и у повећаној мањавости епидермне површине лумбалне регије у којој се развило оштећење, циљ нашег истраживања је био да се сагледају популационогенетички параметри из ХРО-теста, како би се забележиле разлике код спиналних дисрафизама у односу на општу популацију у нашој земљи. Популационогенетичка испитивања за особине из ХРО-теста која су током нашег истраживања изведена нису на овакав начин обрађивана у свету, тако да се подаци добијени из овог испитивања могу сматрати новим сазнањима у разумевању етиологије поменуте болести.

Резултати овог истраживања открили су различиту заступљеност и расподелу ХРО у две групе испитаника, што указује на јасну популационогенетичку разлику која постоји између њих. Утврђено је и да су типичне групе испитаних особина заступљене у различитом степену код особа са спиналним дисрафизмима и здравих испитаника, што упућује на могућност корелације међу различитим групама полигена (група неколико гена која утиче на фенотипску експресију једне особине) који могу бити укључени у регулаторне процесе отпорности организма на испитивани поремећај [15-18].

Како се гени за испитане ХРО налазе на различитим хромозомима, они се сматрају показатељима не само тих хромозома, већ и суседних група полигена који могу утицати на развој спиналних дисрафизама или, пак, на отпорност на неке факторе средине који могу провоцирати настанак датог поремећаја. Повећани степен генетичке хомозиготности код особа са спиналним дисрафизмима може бити и резултат плејотропног деловања гена који су одговорни за експресију датог обољења. Ови гени би у том случају одређивали не само експресију спиналних дисрафизама, већ и групу других особина, укључујући и неке од испитаних ХРО [14, 16-18].

Степен рецесивне хомозиготности који се одређује ХРО-тестом је практично утврђивање генетичких оптерећења код људског рода, али и код неких специфичних групација људи [12, 13, 15, 17, 18]. Повећана рецесивна хомозиготност код оболелих особа би тако могла бити узрок повећања степена генетичких оптерећења, што би могло условити смањење отпорности организма на чиниоце који омогућавају испољавање обољења [16-18].

Релативно висока индивидуална разноликост у постојању испитиваних ХРО (2-8 особина) говори о томе колико може бити висока варијабилност у генетичкој хомеостази код људи, уз велику могућност да екстремни генотипови буду изложенији специфичним метаболичким и развојним малформацијама [16-18]. Примена ХРО-теста у будућности може бити корисна у откривању генотипова осетљивијих на различита обољења.

ЗАКЉУЧАК

Иако је број испитаника са спиналним дисрафизмима у овом истраживању релативно мали, добијени резултати показују јасну популационогенетичку разлику у степену генетичке хомозиготности и варијабилности у односу на здраве испитанике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fineman RM, Jorde LB, Martin RA, Hasstedt SJ, Wing SD, Walker ML. Spinal dysraphia as an autosomal dominant defect in four families. *Am J Med Genet* 1982; 12:457-64.
2. Fellous M, Boue J, Malbrount C, et al. A five-generation family

- with sacral agenesis and spina bifida: possible similarities with the mouse T-locus. *Am J Med Genet* 1982; 12:465-87.
3. Lorber J. The family of spina bifida cystica. *Pediatrics* 1965; 35:589-95.
 4. Baraitser M, Burn J. Neural tube defects as an X-linked condition. *Am J Med Genet* 1984; 17:383-5.
 5. Toriello HV. Report of a third kindred with X-linked anencephaly/spina bifida. *Am J Med Genet* 1984; 19:411-2.
 6. Jensson O, Arnason A, Gunnarsdottir H, Petursdottir I, Fosdal R, Hreidarsson S. A family showing apparent X linked inheritance of both anencephaly and spina bifida. *J Med Genet* 1988; 25:227-9.
 7. Newton R, Stainer P, Loughna S, et al. Linkage analysis of 62 X-linked recessive inheritance of neural tube defects. *Clin Genet* 1994; 45:241-9.
 8. Nickel RE, Magenis RE. Neural tube defects and deletions of 22q11. *Am J Med Genet* 1996; 66:25-7.
 9. Fryns JP, Devriendt K, Moerman P. Lumbosacral spina bifida and myeloschizis in A female foetus with de novo X/autosomal translocation (t(X;22)(q27;q12)). *Genet Counsel* 1996; 7:159-60.
 10. Hol FA, Schepens MT, van Beersum SE, et al. Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes. *Genomics* 2000; 69:174-81.
 11. Marinkovic D, Ilic M, Spremo B. Studies of human population – genetic variation. Comparison of homozygously recessive traits in attendants of special and regular schools in Serbia. *Arh Biol Sci* 1990; 42(3-4):11-2.
 12. Marinković D, Cvjetičanin S. Studies of human population – genetic variation. The frequencies of ABO blood types and homozygously recessive traits among top sportsmen and young intellectuals. *Arh Biol Sci* 1991; 43(1-2):5-6.
 13. Markovic-Denic Lj, Marinkovic D, Jankovic S, Radovanovic Z. Population genetics analyses of chronic lymphocytic leukemia. *Arh Biol Sci* 1992; 44(1-2):3-4.
 14. Marinkovic D, Jovanovic D, Cvjetičanin S, Savić M, Branković S. Genetic homozygosity and normal vs. pathological human variation. *Genetika* 1994; 36(3):147-56.
 15. Pesut D. Susceptibility to lung tuberculosis – a population genetic study. *Med Pregl* 2004; 57(1):21-4.
 16. Cvjetičanin S, Marinkovic D. Genetic variability in the group of patients with congenital hip dislocation. *Russian J Genetics* 2005; 41(8):936-40.
 17. Cvjetičanin S, Marinkovic D. Genetic variability and frequencies of ABO blood types among different samples of patients from Serbia. *Korean J Genetics* 2005; 27(1):35-40.
 18. Marinkovic D, Cvjetičanin S. Population-genetic study of Balkan endemic nephropathy in Serbia. *Russian J Genetics* 2007; 43(8):942-6.
 19. Marinković D. Populaciono-genetički pristup istraživanju stanovništva. *Genetika* 1989; 21(3):179-88.
 20. Online Mendelian inheritance in man (OMIM). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
 21. Melvin EC, George TM, Worley G, et al. Genetic studies in neural tube defects. NTD Collaborative Group. *Pediatr Neurosurg* 2000; 32:1-9.
 22. Speer MC, Melvin EC, Viles KD, et al. T locus shows no evidence for linkage disequilibrium or mutation in American Caucasian neural tube defect families. *Am J Med Genet* 2002; 110:215-8.
 23. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998; 157(6):487-92.
 24. Steegers-Theunissen RP. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 61:39-48.

DEGREE OF GENETIC HOMOZYGOSITY AMONG PATIENTS WITH SPINAL DYSRAPHIA

Suzana CVJETIĆANIN¹, Dejan NIKOLIĆ², Ivana PETRONIĆ², Biljana JEKIĆ¹,
Tatjana DAMNJANOVIĆ¹, Dragana ĆIROVIĆ², Vladimir RADLOVIĆ², Tatjana KNEŽEVIĆ²

¹Institute for Human Genetics, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade;

²University Children's Hospital, Belgrade

INTRODUCTION Our study of genetic homozygosity degree includes an analysis of the presence, distribution and individual combination of 15 selected genetically controlled morpho-physiological traits in the sample of patients with spinal dysraphia (N=35) and in the control-healthy group (N=50).

OBJECTIVE Assuming that spinal dysraphia is a genetically controlled disease, we made a hypothesis that an increased homozygosity level, as well as the changed variability among patients, could be a population-genetic parameter for the prediction of the illness.

METHOD Taking into consideration our experience, as well as the experience of numerous scientists who studied the nature of the inheritance of mono- and oligo-genically controlled qualitative traits, we applied a methodology to estimate the proportion of such homozygously recessive characters (HRC-test).

RESULTS This population-genetic study did not only show a statistically significant difference of the mean values of genetic homozygosity (SD 4.8 ± 0.3 ; control 3.5 ± 0.3), but of the differenc-

es in the type of distribution too, as well as the differences in the presence of certain individual combinations of such traits.

CONCLUSION Due to the fact that those genes which control such qualitative recessive traits are distributed in different human chromosomes, being their visible markers, this could indicate that degrees of genetic homozygosity are ostensibly greater in a sample of patients with spinal dysraphia compared to the control group of individuals.

Key words: spinal dysraphia; HRC-test; genetic homozygosity

Suzana CVJETIĆANIN
Institut za humanu genetiku
Medicinski fakultet
Višegradska 26, 11000 Beograd
Tel/faks: 011 361 5781
Tel.: 011 244 1381
E-mail: bgcuja@yahoo.com