

Дмитренко Д.В.¹, Шнайдер Н.А.¹, Строчкая И.Г.¹, Кичкайло А.С.¹, Зобова С.Н.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия; ²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», Красноярск, Россия

¹660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; ²660036 Красноярск, ул. Академгородок, 50

Механизмы вальпроат-индуцированного тератогенеза

Риски, связанные с внутриутробным влиянием противосудорожных препаратов (ПЭП), имеют большое значение как для женщин, страдающих эпилепсией, так и для их потомства. В данном обзоре рассмотрены основные механизмы вальпроат-индуцированного тератогенеза. Обсуждаются механизмы накопления вальпроевой кислоты внутри плода, окислительный стресс, антагонизм фолатов и ингибирование гистондеацетилазы. Анализ литературы выявил большое количество исследований, доказывающих и опровергающих различные механизмы вальпроат-индуцированного тератогенеза. Ингибирование гистондеацетилазы и окислительный стресс обладают наиболее выраженным тератогенным влиянием; при этом оба механизма особенно значимы в I триместре беременности, когда дисрегуляция ДНК имеет наибольшее влияние на органогенез. Все описанные механизмы (и, возможно, многие другие), наряду с индивидуальными генетическими особенностями, факторами окружающей среды и образа жизни, каждый из которых не определен, могут привести к повышенному риску тератогенных эффектов вальпроевой кислоты.

Ключевые слова: противосудорожные препараты; вальпроевая кислота; тератогенез; эпилепсия; врожденные пороки развития; беременность.

Контакты: Диана Викторовна Дмитренко; mart2802@yandex.ru

Для ссылки: Дмитренко ДВ, Шнайдер НА, Строчкая ИГ и др. Механизмы вальпроат-индуцированного тератогенеза. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2017;(специальный выпуск 1):89–96.

Mechanisms of valproate-induced teratogenesis

Dmitrenko D.V.¹, Shnaider N.A.¹, Strotskaya I.G.¹, Kichkaylo A.S.¹, Zobova S.N.^{1,2}

¹Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, Krasnoyarsk, Russia; ²Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

¹1, Partisan Zheleznyak St., Krasnoyarsk 660022; ²50, Akademgorodok St., Krasnoyarsk 660036

The risks associated with in utero antiepileptic drug (AED) exposure are of great importance for both epileptic women and their offspring. This review considers the basic mechanisms of valproate-induced teratogenesis. It discusses the mechanisms of fetal valproic acid accumulation, oxidative stress, folate antagonism, and histone deacetylase inhibition. Analysis of the literature has shown a large number of studies that prove and disprove different mechanisms of valproate-induced teratogenesis. Histone deacetylase inhibition and oxidative stress have the most pronounced teratogenic effect; moreover, both mechanisms are particularly important in the first trimester of pregnancy when DNA dysregulation has the greatest impact on organogenesis. All the described mechanisms (and possibly many others) along with individual genetic characteristics, environmental factors, and lifestyle, each of which has not been defined, may lead to an increased risk for the teratogenic effects of valproic acid.

Keywords: antiepileptic drugs; valproic acid; teratogenesis; epilepsy; congenital malformations; pregnancy.

Contact: Diana Viktorovna Dmitrenko; mart2802@yandex.ru

For reference: Dmitrenko DV, Shnaider NA, Strotskaya IG, et al. Mechanisms of valproate-induced teratogenesis. *Nevrologiya, Neuropsikhiatriya, Psichosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2017; (Special Issue 1):89–96.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-1S-89-96>

Риски, связанные с внутриутробным влиянием противосудорожных препаратов (ПЭП), имеют большое значение для женщин, страдающих эпилепсией, и их потомства. Кроме того, ПЭП могут использоваться и женщинами с другими неврологическими заболеваниями: нейропатической болью, мигренью [1], а также с психиатрическими расстройствами [2].

В настоящее время данных о тератогенном влиянии новых ПЭП недостаточно из-за небольшого числа клинических случаев и их использования в политерапии.

Вальпроевая кислота (ВК) является одним из наиболее используемых ПЭП в связи с ее эффективностью в отношении широкого спектра эпилептических приступов [3]. Согласно данным международных регистров беременности

и эпилепсии, существует повышенный риск врожденных пороков развития (ВПР), в том числе черепно-лицевых, дефектов нервной трубки, сердечных и когнитивных дефектов, связанных с приемом ВК во время беременности [4].

Однако механизмы тератогенеза ВК до настоящего времени остаются предметом дискуссий. На острие научного дискурса — ингибирование гистондеацетилазы [5] с антиангиогенным эффектом [6], влияние на метаболизм фолиевой кислоты, окислительный стресс, накопление ВК внутри плода.

Предлагаемые механизмы тератогенности. Накопление ПЭП внутри плода

Многие ПЭП, включая ВК, легко проникают через плаценту к плоду [7]. В большинстве случаев ВК накаплива-

ется в кровотоке плода, достигая более высокой концентрации, чем в материнской крови; это может привести к кумуляции до токсического уровня и тератогенному воздействию [8]. Скорость и механизм быстрого и асимметричного распределения ВК через плаценту остаются неясными. Тем не менее фактические данные свидетельствуют о том, что липофильность, рН, связывание с белками плазмы и белками-транспортёрами могут быть значимы для проникновения ВК через плаценту к плоду [9].

Простые монокарбоновые кислоты – это жирные кислоты с низкой молекулярной массой, растворимые в липидах, что позволяет им легко (путем пассивной диффузии) проникать через фосфолипидный бислой. Примерно 90% ВК связывается с сывороточным альбумином (уровень которого снижается на протяжении беременности) в крови матери [10]. При пролонгировании беременности устанавливается градиент протонов между матерью и плодом для адекватного обмена веществ. Физиологически рН в крови человека является нейтральным (7,35–7,45). Когда лекарственное средство принимают перорально, оно всасывается через кишечник и попадает в кровоток через воротную вену печени. В дальнейшем чем ниже рН материнской в крови, тем выше градиент протонов и тем больше ВК диссоциирует с белками плазмы и свободно диффундирует через плацентарную мембрану [11]. Это объясняет теорию, что протон-зависимая передача через плаценту вызывает накопление ВК внутри плода.

ВК метаболизируется в печени системой изоферментов цитохрома P450 (CYP450), β -окислением жирных кислот, глюкуронированием; менее 3% ВК в неизменном виде выводится из организма с мочой [12]. Носительство однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов изоферментов, ответственных за метаболизм ВК, объясняет кумуляцию ВК в крови матери и способствует накоплению ВК в кровотоке плода. Так, кумуляция ВК в крови выявлена у гетерозиготных носительниц ОНП *CYP2C9*2* ($38,5 \pm 13,5\%$) и у компунд-гетерозигот (100%), в меньшей мере – у гетерозиготных носительниц ОНП *CYP2C9*3* ($33,3 \pm 10,3\%$) по сравнению с гомозиготными носительницами распространенного («дикого») ОНП *CYP2C9*1* ($12,5 \pm 3,9\%$) [13]. Согласно анализу оценки риска, риск кумуляции в 1,82; 2,1 и 5,46 раза выше при генотипах *CYP2C9*1/*3*, *CYP2C9*1/*2* и *CYP2C9*2/*3* соответственно, чем при генотипе *CYP2C9*1/*1* [14]. ВПР у детей, матери которых принимали ВК во время беременности, были ассоциированы с носительством ОНП гена *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* и кумуляцией ВК в крови матери [15].

Имеется множество белков-носителей, экспрессирующихся на поверхности мембраны плаценты, опосредующих обмен эфирных молекул и обеспечивающих защиту плода. Эти белки могут способствовать накоплению ВК в фетальном кровотоке.

Белки – транспортеры лекарственных препаратов

Трансплацентарное распределение ВК происходит с помощью белков – транспортеров монокарбоновых кислот (МСТ1 и МСТ2). Транспортеры монокарбоновых кислот являются белками, связанными с 12 спиральными трансмембранно-охватывающими доменами, существующими в виде различных изоформ, каждая из которых способствует

вариабельным транспортным механизмам. Считается, что они катализируют совместный транспорт белка с ВК, контролируя распределение лекарственных препаратов – монокарбоновых кислот – между фетальным и материнским отделами из желудочно-кишечного тракта в кровоток. Если концентрация ВК увеличивается на фоне приема ее высоких доз или в результате носительства ОНП генов, приводящих к «медленному» метаболизму, то увеличивается и приток ВК через материнский кровоток и, соответственно, содержание ВК внутри плода [9].

ВК в растворе диссоциирует, образуя анион, который может быть субстратом для транспортеров органических анионов (OATs, преимущественно изоформы 4). OATs, кодируемый геном носителя растворенного вещества, является белком или притока, или оттока, расположен на базолатеральной плазматической мембране плаценты.

Высокоаффинное натрий-независимое связывание позволяет транспортировать различные лекарственные средства или их метаболиты (но не глюкуронид-конъюгаты) между кровотоками, скорее всего, из кровотока плода в материнский кровоток, формируя защитную систему [16]. Другие защитные системы включают белки множественной лекарственной устойчивости и белки резистентности рака молочной железы (BCRP).

MDR1, кодирующий Р-гликопротеин, является составной частью семейства ABC генов эффлюксных транспортеров. Благодаря использованию энергии, получаемой в результате гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ) в аденозиндифосфат, MDR1 может активно переносить лекарственные препараты из клеток, в том числе из плаценты. Считается, что Р-гликопротеин обеспечивает защиту плода и может изменить фармакокинетику ВК. Другие белки, кодируемые генами семейства ABC, – BCRP и MRP (изоформы 1–9): BCRP (производный из MCF7-клеточной линии рака молочной железы), MDR1 (клонирован из клеток культуры H69AR рака легких), MRP2 – показывают значительную защитную роль. Эти белки отличаются от Р-гликопротеина. Они являются АТФ-независимыми и совместно транспортируют ВК с эндогенно-восстановленным глутатионом. Функции данных белков были продемонстрированы в исследованиях на нокаутных мышах [10]. С другой стороны, исследование, проведенное S. Baltes и соавт. (2007), не подтвердило эти результаты [17]. Следовательно, когда нарушается экспрессия белков-транспортеров, увеличивается содержание лекарственных препаратов в тканях плода по отношению к дозе, что обуславливает тератогенность [18]. Носительство ОНП генов, кодирующих белки-транспортеры, модифицирует транскрипцию специфических белков. Носительство ОНП генов, кодирующих транспортные белки, в частности, MDR1 [10], является важным фактором изменения фармакокинетических и фармакодинамических свойств ВК. Отмечено влияние ОНП C3435T гена *MDR1* (в некодирующей, нерегуляторной области гена) на кумуляцию ВК [10], однако этот механизм до сих пор недостаточно изучен.

Окислительный стресс

Для многих ПЭП (наряду с ВК) показана роль окислительного стресса в развитии тератогенности, но мера этого влияния недостаточно понятна. Свободные радикалы могут быть сформированы макрофагами в результате деградации

патогенных микроорганизмов. Небольшое количество свободных радикалов естественным образом образуется в процессе аэробного дыхания многих биологических систем; они имеют большое значение в клеточной сигнализации и поддержании гомеостаза. В процессе метаболизма энергия выделяется путем превращения глюкозы (сахара) и кислорода до CO_2 и H_2O с помощью гликолиза, цикла Кребса, а затем транспортной цепи электронов.

Для того чтобы свободные радикалы оставались безопасными для организма, они должны регулироваться [19]. Это достигается с помощью различных защитных механизмов (антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза – СОД, каталаза и глутатионпероксидаза – GPx), которые поглощают избыток свободных радикалов и преобразуют их в менее вредные молекулы, поскольку переизбыток может привести к окислительному стрессу.

У человека есть три основных типа СОД, которые различаются по местоположению (митохондриальная или внеклеточная цитоплазма), изомерии (димерная или тетрамерная форма) и металлическим компонентам (медь и цинк или марганец). Эти ферменты катализируют превращение свободных радикалов в перекись водорода ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), которая имеет важное значение для фагоцитоза в иммунной системе, но является цитотоксической при повышенных концентрациях.

Каталаза – это тетрамерный (четыре полипептидные цепи, каждая примерно 500 аминокислот) белок, содержит четыре ядра железа (порфирин-гем группы). Железо взаимодействует с перекисью водорода, в значительной степени катализируя ее деградацию на воду и кислород [20]. Механизм этого до сих пор неясен. Предполагается два этапа: сначала окисление железного сердечника в активном центре фермента ($\text{Fe}^{III} + \diamond \text{Fe}^{IV} +$), с последующим восстановлением обратно в активное состояние ($\text{Fe}^{III} +$).

Особый интерес вызывает группа гема порфирина. Порфирин-гем состоит из глутатиона и селена. Главная функция этого фермента заключается в снижении перекисного окисления липидов и деградации перекиси водорода до воды. Существует восемь изоферментов этого семейства. GPx1 (наиболее распространенный в человеческой цитоплазме) преимущественно связывается с перекисью водорода. Две молекулы глутатиона необходимы для деградации одной молекулы перекиси водорода с образованием глутатион дисульфида и воды. Окисленный глутатион (глутатион дисульфид) превращается обратно в глутатион с помощью глутатион-редуктазы, создавая антиоксидантный окислительно-восстановительный цикл [21].

Лекарственные препараты, такие как ВК, могут проникать через электронную транспортную цепь (рис. 1) путем связывания с биологическими компонентами (например, СОД) или сами принимать электроны (электрофильность), в результате чего предотвращается естественный поток электронов через систему и увеличивается образование локальных свободных радикалов.

ВК образует анионы в крови, которые могут создавать ковалентные связи с антиоксидантными ферментами (например, СОД) из-за их отрицательного заряда, подавляя их функциональность [23] и постоянно предотвращая детоксикацию супероксида до нового синтеза белка.

Показано, что ВК может перехватывать электроны, проходящие через дыхательную цепь. Известно, что ВК об-

разует множество метаболитов в результате особенностей метаболизма: β -окислением жирных кислот, системой изоферментов цитохрома P450 (CYP450) печени, глюкуронированием. Часть метаболитов образуют химически активные соединения; изоферменты CYP450 образуют 4-ен-ВК, который подвергается окислению с формированием высокореактивного (E)-2,4-диена ВК. Это и другие производные могут принимать электроны и передавать их на NADPH (формирование NADP⁺), что определяет дальнейшую интерференцию электронов и установление окислительно-восстановительного цикла вместо антиоксидантного GSH окислительно-восстановительного цикла [24]. NADPH, в избытке присутствующий в клетке человека, является потенциалом для формирования свободных радикалов.

Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью молекулы с одним непарным электроном во внешней энергии орбитали, вызывая изменения во многих важных клеточных элементах, таких как ДНК/РНК, липиды и протеины, которые могут перерасти в мутации, вызывая ВПП и снижение познавательных функций. Самой распространенной формой повреждения ДНК/РНК является разложение азотистого основания гуанина (G), который включается во вновь синтезированную ДНК/РНК с формированием перекрестной связи с другими основаниями, что является трудным для репарации [25], в результате чего происходит последовательное разрушение белковых структур. Кроме того, свободные радикалы способны принять протон из цепей жирных кислот полиненасыщенных липидов, образуя перекисные радикалы, которые могут дополнительно принимать протоны. Это разрушение структурных липидов в мембране клетки может привести к некрозу клетки и органелл [26].

В течение I триместра беременности плод обладает незрелой системой защиты [27]. В результате, когда ВК биоактивируется печенью и мешает электронной транспортной цепи в производстве энергии, отсутствие защитных механизмов при образовании свободных радикалов приводит к ограничению детоксикации, увеличению взаимодействия свободных радикалов с белками, липидами и ДНК. Эффект повреждения окислительного стресса является динамическим; если повреждение можно отремонтировать, функционирование клеток остается в силе. Тем не менее если повреждений больше, то клетка будет подвергаться апоптозу,

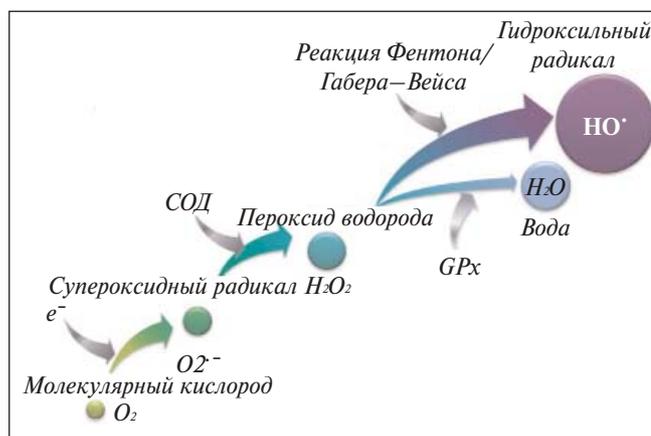


Рис. 1. Регуляция свободных радикалов с помощью антиоксидантных ферментов [22]

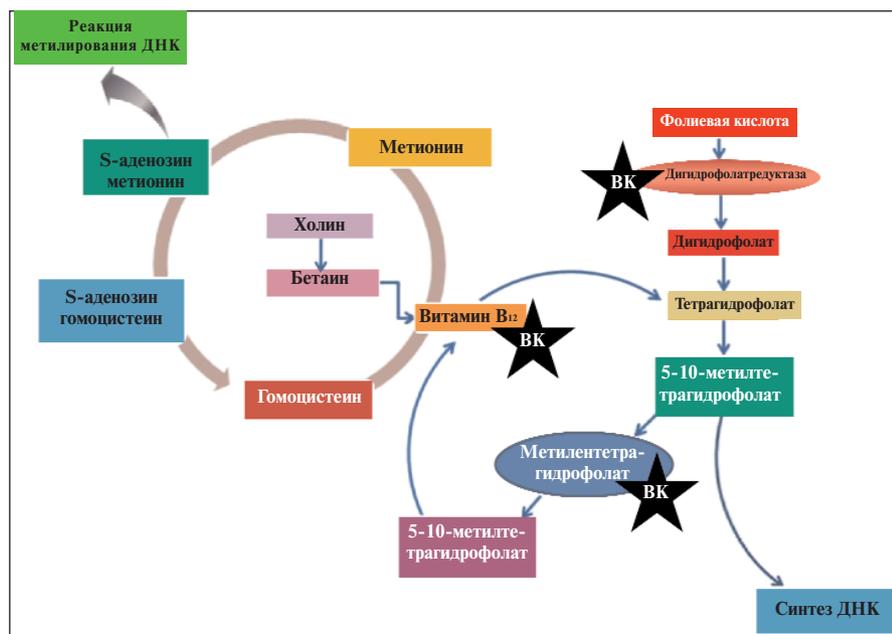


Рис. 2. Механизм действия ВК на метаболизм фолатов [22]

повышая восприимчивость к тератогенезу [28]. Избыток свободных радикалов наиболее часто приводит к дефектам нервной трубки и может привести к когнитивным нарушениям [29].

Антагонизм фолатов

Фолиевая кислота является биологически активной формой витамина В₉. Производные фолиевой кислоты – активные формы – имеют большое биологическое значение [30]. Витамин В₉ (фолиевая кислота) является жизненно важным кофактором для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, основой для синтеза новых РНК и ДНК. Вместе с витамином В₁₂ фолиевая кислота является одним из важнейших кофакторов, индуцирующих реметилирование метионина (метионин-синтазы) из гомоцистеина. Метионин является предшественником для многих реакций метилирования и, что наиболее важно, метилирования ДНК. Фолиевая кислота контролирует регуляцию экспрессии генов, белков нового поколения и имеет решающее значение для дифференцировки клеток плода, развития и созревания [31, 32].

Дефицит фолиевой кислоты может иметь пагубные последствия для развивающегося эмбриона. К ним относят: помехи эпигенетической регуляции экспрессии генов, гипергомоцистеинемию, индукцию окислительного стресса и нарушение критических белков, все функции, которых согласуются с тератогенностью [33].

Дефицит фолиевой кислоты у беременных женщин может влиять на риск самопроизвольного прерывания беременности и возникновения дефектов нервной трубки у плода. В многочисленных исследованиях было показано, что употребление поливитаминов с высоким содержанием фолиевой кислоты или богатой фолатами пищи до зачатия и в ранние сроки беременности снижает частоту дефектов нервной трубки – как у матерей, уже имеющих ребенка с такой патологией, так и у женщин без этого ВПР у плода в анамнезе [34]. В ранее проведенных многочисленных исследова-

ниях была показана исключительная роль фолиевой кислоты в предотвращении дефектов нервной трубки [35]. Потребление фолатсодержащих витаминов снижает риск дефектов нервной трубки на 62%, а риск повторного возникновения этой аномалии у потомства – на 70% [36]. В исследовании G. Chen и соавт. [37] снижение риска развития дефектов нервной трубки достигало 87% у женщин, начавших потребление поливитаминов до зачатия и продолжавших регулярно принимать их в течение всей беременности.

Во время беременности существует повышенная потребность в фолиевой кислоте, с уменьшением ее уровня в материнской крови в течение всего периода беременности. Прием ПЭП, таких как ВК, может приводить к дефициту фолатов [38] путем ингибирования фолатных ферментов метаболизма фолиевой кислоты

(рис. 2). Другие исследования показывают, что ВК не уменьшает уровень фолиевой кислоты в крови сама по себе, по крайней мере, по сравнению с другими ПЭП, такими как карбамазепин; возникновение дефицита фолатов происходит из-за самой беременности [4]. Современные исследования предположили, что прогрессирование беременности увеличивает дефицит фолиевой кислоты, что может привести к развитию дефектов нервной трубки независимо от того, принимает пациентка ВК или нет [30], хотя точные механизмы, с помощью которых это происходит, остаются неизвестными.

Предполагается, что ВК уменьшает превращение неактивной фолиевой кислоты в биологически активную форму [22]. Также существует гипотеза, что ВК нарушает всасывание и метаболизм фолиевой кислоты [39]. Было установлено, что прием ВК приводит к более низкому уровню сывороточного фолата [40].

В некоторых исследованиях был показан на животных моделях защитный эффект фолатов при их совместном введении с ВК, что приводило к уменьшению числа ВПР [41]. В других исследованиях защитный эффект фолиевой кислоты во время беременности у женщин, принимающих ВК, не был установлен [30].

В экспериментальном исследовании, проведенном K. Fathe и соавт. [42], с помощью иммуоферментного анализа исследована способность связывания трех основных форм фолатов с тремя высокоаффинными рецепторами фолатов [α-рецептором фолата (FRα), β-рецептором фолата (FRβ) и фолат-связывающим белком (bFBP)] с ВК и без нее. Эти белки дифференциально экспрессируются в различных тканях; особенно богаты рецепторами фолатов плацента, желточный мешок и невральные эпителии до закрытия нервной трубки [43]. Было отмечено, что рецепторы фолатов быстро доставляют фолаты после связывания и снова становятся свободными для связывания [44]. С другой стороны, эндозитоз FRα происходит с относительно постоянной скоростью в различных типах тканей и не зависит от занятости ре-

цептора лигандом [45]. Это указывает на то, что рецепторы фолатов работают со стандартной скоростью и, следовательно, обеспечивают фолаты только тогда, когда они доступны для связывания с рецептором.

ВК является неконкурентным субстратом, который может уменьшить способность трех основных форм фолиевой кислоты (фолиевая кислота, S-фолиновая кислота и 5-метилтетрагидрофолат) к связыванию с высокоаффинными рецепторами фолатов. Тесты в клетках НЕК293Т показывают, что рецепторы фолатов, расположенные в мембране клеток, связывают значительно меньшее количество фолиевой кислоты при обработке ВК, чем это делают необработанные клетки (рис. 3). Неконкурентное ингибирование ВК рецепторов фолатов может снизить биодоступность фолатов при приеме ВК во время беременности. Таким образом, внутриутробное воздействие ВК может нарушать процессы развития путем неконкурентного связывания с рецепторами фолатов во время эмбриогенеза, тем самым вызывая широкий спектр ВПР у детей, рожденных от получавших ВК матерей.

FR α является онтогенетически релевантным рецептором фолатов и экспрессируется в плаценте [46]. Модификация этих высокоаффинных рецепторов фолатов может уменьшить количество фолатов, пропускаемых через плаценту.

Хотя исследование проводили при суперфизиологических концентрациях ВК, с течением времени можно увидеть эффект лечения за счет уменьшения количества фолатов, которые могут связываться с высокоаффинными рецепторами. После длительного воздействия на рецепторы фолатов постоянные количества ВК блокируют связывание и перенос некоторой доли фолиевой кислоты, предоставленной пациенту в надежде предотвратить дефекты нервной трубки и другие ВПР. В последнее время было показано, что FR α может функционировать в качестве фактора транскрипции [47], транслоцируется в ядро и связывается с цис-отзывчивым элементом ключевых генов роста при воздействии фолиевой кислоты. Несмотря на базальный уровень FR α в ядрах клеток, добавление фолиевой кислоты приводит к дополнительной транслокации FR α в ядро [47]. Если ВК нарушает связывание фолиевой кислоты в FR α , это может изменить сигнальные каскады [42].

Другой механизм влияния ВК на метаболизм фолатов, возможно, осуществляется через ингибирование ВК фермента метилен-тетрагидрофолат редуктазы (МТГФР), которая необходима для образования 5-метилтетрагидрофолата (5МТНФ) и получения метионина [48] (рис. 4).

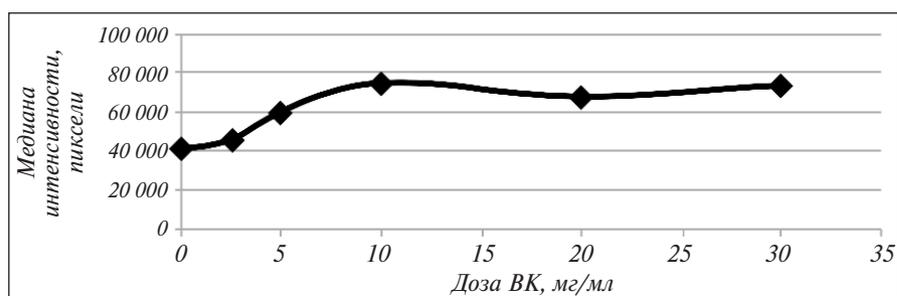


Рис. 3. Ингибирование ВК фолатов [23]

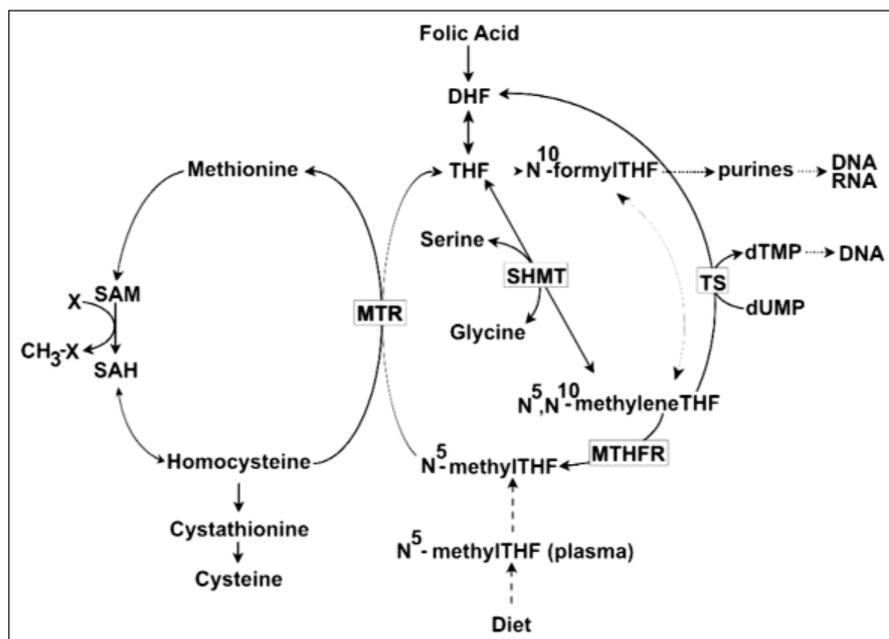


Рис. 4. Фолатный цикл и цикл метионина (TS — тимидилатсинтаза, МТР — метионинсинтаза, ДГФ — дигидрофолатредуктаза, ТНФ — тетрафолат, SHMT — серингидрометилтрансфераза) [49]

Матери, носительницы гомо- или гетерозиготного ряда ОНП гена *MTHFR* 677 С>Т, имеют полностью функционирующий фермент МТГФР, обладающий необходимой конформацией, восприимчивой к ингибированию ВК [50]. Гомозиготные носительницы аллели Т по ОНП 677 С>Т имеют более низкий риск тератогенных эффектов ВК, поскольку фермент МТГФР имеет измененную структуру, которая оставляет его менее восприимчивым к ингибированию ВК [49]. С другой стороны, исследования, проведенные Ливерпульско-Манчестерской группой изучения нейроразвития, показали, что материнский генотип по ОНП 677 С>Т может предрасполагать к тератогенным эффектам у плода [50].

Показано, что гомо- и гетерозиготное носительство ОНП генов фолатного цикла, особенно гетерозиготное носительство ОНП гена *MTHFR* (33,3%) и *MTRR* (40,5%) у матери, ассоциировано с риском возникновения ВПР на фоне приема ПЭП, отсутствием эффективности приема фолиевой кислоты и необходимостью мониторинга уровня фолиевой кислоты и гомоцистеина в крови, приема «активных» фолатов во время планирования и вынашивания беременности [51].

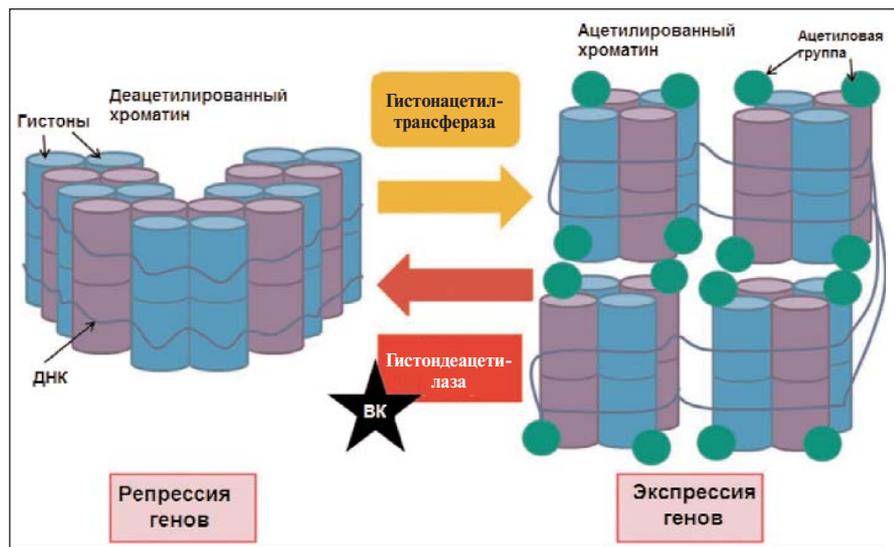


Рис. 5. Регуляция экспрессии генов, ацетилирования деацетилирования гистонов хроматина и предлагаемый механизм торможения [22]

Однако не было никакой значимой связи между фетальным генотипом по ОНП 677 С> Т гена *MTHFR* и ВПР. Таким образом, возможно влияние других механизмов.

Эти противоречивые данные свидетельствуют о том, что фермент МТГФР не может быть основной мишенью для ВК. ВК может иметь множество взаимодействий с метаболизмом фолиевой кислоты с различной степенью воздействия. Например, известно, что ВК может быть конкурентным антагонистом глутаминовой кислоты, которая участвует в образовании дигидрофолата, уменьшая эндогенный синтез фолиевой кислоты [52].

Ранее предполагалось, что введение фолиевой кислоты может противодействовать тератогенному действию ВК. Увеличение концентрации фолиевой кислоты будет компенсировать дефицит, развившийся во время беременности, и возвратит уровни фолиевой кислоты, гомоцистеина и метионина к нормальным [32, 53]. Использование добавок фолиевой кислоты во время беременности было широко изучено в течение последних 10–20 лет, со снижением частоты ВПР, таких как *spina bifida* и фетальный вальвроатный синдром, на 50%. Этот защитный эффект был показан на животной модели (грызуны, подвергнутые тератогенным концентрациям ВК с предварительным воздействием фолиевой или пантотеновой кислоты или без такового) с уменьшением частоты дефектов нервной трубки [54]. Клинические исследования же показали, что прием фолиевой кислоты не имел какого-либо существенного защитного эффекта против вальвроат-индуцированного тератогенеза [30].

Ингибирование гистондеацетилазы

Геном человека имеет размер примерно 3 м в длину. Ядерный диаметр средней человеческой клетки – 7 мкм [55]. Для того чтобы ДНК находилась на таком небольшом участке, она должна быть значительно сжата. Это достигается за счет супернакрутки двухцепочечных альфа-спиралей вокруг белковых ядер (гистонов) с образованием эухроматина или нуклеосом. ДНК будет оставаться в этом состоянии до момента репликации, митоза или мейоза либо ацетилирования с помощью ферментов гистонацетилазы.

Гиперацетилирование гистонов ДНК распутывает конденсированный хроматин, что облегчает доступ факторов транскрипции, увеличивая транскрипцию генов и тем самым регулируя экспрессию генов, необходимых для пролиферации и развития клеток плода [56].

Регулирование экспрессии генов представляет собой динамический процесс. Когда транскрипция генов завершена, ферменты гистондеацетилазы или ферменты лизиндеацетилазы удаляют ацетильные группы с помощью реакции гидролиза, высвобождая положительно заряженные N-терминалы для конденсирования, тем самым инициируя репрессию генов [21]. Есть два основных класса ферментов гистондеацетилаз: класс I (HDAC 1, 2, 3 и 8) и класс II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 и 10), причем каж-

дый подтип отличается расположением и подвижностью [57]. Различные классы гистондеацетилаз играют разные роли в регуляции генов, клеточного цикла (пролиферации) и гибели клеток (апоптозе), влияя на гиперацетилирование и транскрипцию ДНК. В настоящее время остается неясным, что является наиболее важным, но предполагается, что они могут иметь дублирующие функции в процессе развития, например HDAC1 и HDAC2 [58].

Предполагается, что ВК действует путем изменения экспрессии генов (рис. 5). Ингибирование гистондеацетилаз, как полагают, происходит через прямое связывание ВК (или ее активных метаболитов) с активным участком фермента, предотвращая гидролитическое отщепление ацетильных групп от ДНК. Открытый, несконденсированный хроматин затем подвергается воздействию многочисленных факторов транскрипции, которые могут индуцировать транскрипцию потенциально опасных генов, таких как *Bcl-2* и *Noxa1* [59], повышение регуляции апоптоза и снижение морфогенеза (обязательны для дифференцировки органов) и пролиферации клеток, соответственно. С другой стороны, факторы транскрипции могут также уменьшить экспрессию гена протеинкиназы C, значимого для сигнальных путей. Это нарушает клеточный цикл (уменьшение роста клетки через дифференцировку) и затем приводит к апоптозу и замедлению роста клеток [12].

Для развивающегося эмбриона в I триместре беременности, когда дифференцировка и рост клеток имеют основополагающее значение для нормального развития плода, ингибирование гистондеацетилаз в результате воздействия ВК потенциально может повысить риск ВПР [60].

Кроме того, показано, что ВК ингибирует фактор роста эндотелия сосудов, нарушая таким образом ангиогенез [61]. Терапевтические концентрации ВК являются ингибиторами ангиогенеза и васкулогенеза. ВК снижает экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота в эндотелиальных клетках человека, нарушая опосредованную оксидом азота сигнализацию ангиогенеза. В эндотелиальных клетках этот эффект связан с ингибированием пролиферации, миграции эндотелиальной клетки и образования капиллярной

трубки. ВК ингибирует клеточный цикл в середине фазы G1 (пресинтетической) [62].

Хотя ВК вызывает относительно быстрое увеличение ацетилирования гистонов и снижение экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота, а также оказывает ингибирующее действие на миграцию, пролиферацию клеток, задержка ангиогенеза составляла от 3 до 5 дней. В эксперименте показано, что использование ВК у беременных мышей приводит к заметному снижению формирования эмбриональных сосудов в ткани печени. Это, возможно, объясняет тератогенные и гепатотоксические эффекты вальпроатов. Выявлена корреляция между потенциальной активацией ВК активированного рецептора *b* пролиферации пероксисом и его способностью индуцировать дифференцировку F9 — тератоканцеромы клетки и дефекты нервной трубки (экзенцефалия у мышей) [63].

Заключение

Большинство женщин, страдающих эпилепсией, имеют здоровых детей. Тем не менее по-прежнему остаются актуальными проблемы безопасности в отношении тератогенеза ВК. В настоящее время Международная противоэпи-

лептическая лига рекомендует избегать использования ВК у женщин детородного возраста [64]. С другой стороны, недостаточный контроль эпилепсии во время беременности представляет больший риск травмирования как для матери, так и для плода, чем любая экспозиция ПЭП [65].

На основании существующих доказательств ингибирование гистондеацетилазы оказывает наиболее значимое воздействие на эмбрион [66]. Нарушение синтеза белка связано со множеством проблем во время органогенеза (нарушение роста и дифференцировки клеток) и ассоциировано с ВПР.

Образование свободных радикалов в результате ограниченных путей детоксикации и прогрессирования беременности также может вызвать необратимые повреждения эмбриона. Существует меньше данных, подтверждающих вклад накопления ВК внутри эмбриона с формированием ВПР. Существует доказательство того, что экспрессия белков-носителей в синцитиотрофобласте может способствовать переносу ВК через плаценту и уменьшить защитные механизмы эмбриона. По данным других авторов, ВК не является субстратом для большинства из этих транспортеров и данный механизм не значим в тератогенезе ВК [18].

ЛИТЕРАТУРА

- Rodriguez-Sainz A, Pinedo-Brochado A, Sanchez-Menoyo JL, et al. Migraine, stroke and epilepsy: underlying and interrelated causes, diagnosis and treatment. *Curr Treat Opt Cardiovasc Med.* 2013;15(3):322-34. doi: 10.1007/s11936-013-0236-7
- Chiu C-T, Wang, Z, Hunsberger JG, et al. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev.* 2013;65:105-42. doi: 10.1124/pr.111.005512
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, et al. Adult epilepsy. *Lancet (Lond).* 2006;367:1087-100. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68477-8
- Hill DS, Wlodarczyk BJ, Palacios AM, et al. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Exp Rev Neurother.* 2010;10:943-59. doi: 10.1586/ern.10.57
- Rosenberg G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:2090-103. doi: 10.1007/s00018-007-7079-x
- Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:205-16. doi: 10.1007/s10545-008-0841-x
- Shen DD. Valproate. In: Loscher W, editor. Milestones in drug therapy. Basel: Birkhauser Verlag; 1999.
- Vajda F. Dose issues in antiepileptic therapy. *J Clin Neurosci.* 2012;19:1475-7. doi: 10.1016/j.jocn.2012.05.003
- Utoguchi N, Audus KL. Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line. *Int J Pharm.* 2000;195:115-24. doi: 10.1016/S0378-5173(99)00398-1
- Atkinson DE, Brice-Bennett S, D'Souza SW. Antiepileptic medication during pregnancy: does fetal genotype affect outcome? *Pediatr Res.* 2007;62:120-7. doi: 10.1203/PDR.0b013e3180a02e50
- Scott WJ Jr, Schreiner CM, Nau H, et al. (1997) Valproate-induced limb malformations in mice associated with reduction of intracellular pH. *Reprod Toxicol.* 1997;11:483-93. doi: 10.1016/S0890-6238(97)00015-4
- Sankar R. Teratogenicity of antiepileptic drugs: role of drug metabolism and pharmacogenomics. *Acta Neurol Scand.* 2007;116:65-71. doi: 10.1111/j.1600-0404.2007.00830.x
- Dmitrenko DV, Shnyder NA, Govorina YuB, Myravyova AV. The effect of CYP2C9 gene polymorphisms at the level of valproic acid in serum in women of reproductive age with epilepsy. *Eur Sci Rev.* 2015;(9-10):62-3.
- Дмитренко ДВ, Шнайдер НА. Исследование полиморфизма гена CYP2C9 у женщин, принимающих вальпроаты. Медицинская генетика. 2015;(10):36-42 [Dmitrenko DV, Shnyder NA. Study of the polymorphism of the CYP2C9 gene in women taking valproate. *Meditsinskaya Genetika.* 2015;(10):36-42 (In Russ.)].
- Dmitrenko DV, Shnyder NA, Kiselev IA, et al. Problems of rational therapy for epilepsy during pregnancy. *Open J Obstet Gynecol.* 2014;4(9):506-15. doi: 10.4236/ojog.2014.49072
- Sekine T, Cha SH, Endou H. The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2000;440:337-50. doi: 10.1007/s004240000297
- Baltes S, Fedowitz M, Tortos CL, et al. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharm Exper Ther.* 2007;320:331-43. doi: 10.1124/jpet.106.102491
- Tomson T, Battino D. Teratogenic effects of antiepileptic medications. *Neurol Clin.* 2009;27:993-1002. doi: 10.1016/j.ncl.2009.06.006
- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Res Upd.* 2004;7:97-110. doi: 10.1016/j.drug.2004.01.004
- Abramovs JP, Wells PG. (2011) Embryonic catalase protects against endogenous and phenytoin-enhanced DNA oxidation and embryopathies in acatalasemic and human catalase-expressing mice. *FASEB J.* 2011;25:2188-200. doi: 10.1096/fj.11-182444
- Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharm.* 2010;248:201-9. doi: 10.1016/j.taap.2010.08.001
- Lloyd KA. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Biosci Horiz.* 2013;6:1-10. doi: 10.1093/biohorizons/hzt003
- Wells PG, Lee CJJ, McCallum GP, et al. Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;196:131-62. doi: 10.1007/978-3-642-00663-0_6
- Liu H, Fu RY, Liao QK, et al. Valproic acid induced intracellular GSH-redox imbalance and apoptosis of leukemic cells resistant to dexamethasone and doxorubicin. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed).* 2009;40:133-7.
- Wu G, Nan C, Rollo JC, et al. Sodium valproate-induced Congenital cardiac abnormalities in mice are associated with the inhibition of histone deacetylase. *J Biomed Sci.* 2010;17:16-22. doi: 10.1186/1423-0127-17-16
- Verrotti A, Scardapane A, Franzoni E, et al. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. *Epilepsy Res.* 2008;78:171-7. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2007.11.005
- Zaken V, Kohen R, Ornoy A. The development of antioxidant defense mechanism in young rat embryos in vivo and in vitro. *Early Pregnancy.* 2000 Apr;4(2):110-23.
- Tung EWY, Winn LM. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species

- and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharm.* 2011;80:979-87. doi: 10.1124/mol.111.072314
29. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet.* 2003;4:784-93. doi: 10.1038/nrg1181
30. Jentink J, Bakker MK, Nijenhuis CM, et al. Does folic acid use decrease the risk for spina bifida after in utero exposure to valproic acid? *Pharmacoevidemiol Drug Safety.* 2010;19:803-7. doi: 10.1002/pds.1975
31. Kalhan SC, Marczewski SE. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012;13:109-19. doi: 10.1007/s11154-012-9215-7
32. Дмитренко ДВ, Шнайдер НА, Говорина ЮБ и др. Роль наследственных нарушений обмена фолиевой кислоты в формировании врожденных пороков развития у плода у женщин, принимающих противосудорожные препараты. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2014;(4):16-22 [Dmitrenko DV, Shnaider NA, Govorina YuB, et al The role of hereditary disorders of folic acid metabolism in the formation of congenital malformations in the fetus in women taking antiepileptic drugs. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния.* 2014;(4):16-22 (In Russ.)].
33. Pulikkunnel ST, Thomas SV. Neural tube defects: pathogenesis and folate metabolism. *J Assoc Physicians India.* 2005;53:127-35.
34. Smith J, Whitehall J. Sodium valproate and the fetus: a case study and review of the literature. *J Neonatal Nursing.* 2009;28:363-7. doi: 10.1891/0730-0832.28.6.363
35. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* 1991;338(8760):131-7. doi: 10.1016/0140-6736(91)90133-A
36. Blencowe H, Cousens S, Modell B, Lawn J. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol.* 2010 Apr;39 Suppl 1:i110-21. doi: 10.1093/ije/dyq028
37. Chen G, Song X, Ji Y, et al. Prevention of NTDs with periconceptional multivitamin supplementation containing folic acid in China. *Birth Def Res Clin Mol Teratol.* 2008;82(8):592-6. doi: 10.1002/bdra.20471
38. Wilffert B, Altena J, Tijink L, et al. Pharmacogenetics of drug-induced birth defects: what is known so far? *Pharmacogenomics.* 2011;12:547-58. doi: 10.2217/pgs.10.201
39. Elmazar MM, Nau H. Trimethoprim potentiates valproic acid-induced neural tube defects in mice. *Reprod Toxicol.* 1993;7:249-54. doi: 10.1016/0890-6238(93)90231-U. [PubMed: 8318756].
40. Schwaninger M, Ringleb P, Winter R, et al. Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. *Epilepsia.* 1999;40:345-50. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb00716.x
41. Padmanabhan R, Shafullah MM. Amelioration of sodium valproate-induced neural tube defects in mouse fetuses by maternal folic acid supplementation during gestation. *Congenit Anom (Kyoto).* 2003;43:29-40. doi: 10.1111/j.1741-4520.2003.tb01024.x
42. Wald DS, Bishop L, Wald NJ, et al. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med.* 2001;161(5):695-700. doi: 10.1001/archinte.161.5.695
43. Yang J, Chen H, Vlahov IR, et al. Characterization of the pH of folate receptor-containing endosomes and the rate of hydrolysis of internalized acid-labile folate-drug conjugates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:462-8. doi: 10.1124/jpet.106.117648
44. Bandara NA, Hansen MJ, Low PS. Effect of receptor occupancy on folate receptor internalization. *Mol Pharm.* 2014;11:1007-13. doi: 10.1021/mp400659t
45. Solanky N, Requena Jimenez A, D'Souza SW, et al. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta.* 2010;31:134-43. doi: 10.1016/j.placenta.2009.11.017
46. Boshnjaku V, Shim KW, Tsurubuchi T, et al. Nuclear localization of folate receptor alpha: a new role as a transcription factor. *Sci Rep.* 2012;(2):980. doi: 10.1038/srep00980
47. Fathe K, Palacios A, Finnell RH. Brief report novel mechanism for valproate-induced teratogenicity. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol.* 2014 Aug;100(8):592-7. doi: 10.1002/bdra.23277. Epub 2014 Jul 26.
48. Kishi T, Fujita N, Eguchi TA, et al. Mechanism for reduction of serum folate by antiepileptic drugs during prolonged therapy. *J Neurol Sci.* 1997;145:109-12. doi: 10.1016/S0022-510X(96)00256-0
49. Roy M, Leclerc D, Wu Q, et al. Valproic acid increases expression of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and induces lower teratogenicity in MTHFR deficiency. *J Cell Biochem.* 2008;105:467-76. doi: 10.1002/jcb.21847
50. Kini U, Lee R, Jones A, et al. Influence of the MTHFR Genotype on the rate of malformations following exposure to antiepileptic drugs in utero. *Eur J Med Genet.* 2007;50:411-20. doi: 10.1016/j.ejmg.2007.08.002
51. Дмитренко ДВ. Профилактика врожденных пороков развития у плода с учетом фармакогенетических особенностей метаболизма антиэпилептических препаратов и наследственных нарушений фолатного цикла. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014;6(1S):31-8 [Dmitrenko DV. Prevention of fetal congenital malformations with allowance for the pharmacogenetic features of the metabolism of antiepileptic drugs and hereditary abnormalities in the folate cycle. *Неврология, Нейропсихиатрия, Психосоматика = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2014;6(1S):31-8 (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2014-1S-31-38
52. Hsieh CL, Wang HE, Tsai WJ, et al. Multiple point action mechanism of valproic acid-teratogenicity alleviated by folic acid, vitamin C, and N-acetylcysteine in chicken embryo model. *Toxicology.* 2012;291:32-42. doi: 10.1016/j.tox.2011.10.015
53. Butterworth CE Jr, Bendich A. Folic acid and the prevention of birth defects. *Ann Rev Nutr.* 1996;16:73-97. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.000445
54. Dawson JE, Raymond AM, Winn LM. Folic acid and pantothenic acid protection against valproic acid-induced neural tube defects in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharm.* 2006;211:124-32. doi: 10.1016/j.taap.2005.07.008
55. Campbell NA, Reece JB, Urry LA, et al. Biology. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2008.
56. Kuo M-H, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays.* 1998;20:615-26. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H
57. Pan H, Cao J, Xu W. Selective histone deacetylase inhibitors. *Anti-Cancer Agents Med Chem.* 2012;12:247-70. doi: 10.2174/187152012800228814
58. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997;389:349-52. doi: 10.1038/38664
59. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol.* 2009;28:1-20. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.02.014
60. Choi JC, Holtz R, Murphy SP. Histone deacetylases inhibit IFN- α -inducible gene expression in mouse trophoblast cells. *J Immunol.* 2009;182:6307-15. doi: 10.4049/jimmunol.0802454
61. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med.* 2001;7:437-43. doi: 10.1038/86507
62. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J Jr. Valproate and valproate analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem.* 2002;9:1417-33. doi: 10.2174/0929867023369763
63. Lampen A, Carlberg C, Nau H. Peroxisome proliferator-activated receptor delta is a specific sensor for teratogenic valproic acid derivatives. *Eur J Pharmacol.* 2001;431:25-33. doi: 10.1016/S0014-2999(01)01423-6
64. Tomson T, Marson A, Boon P, et al. Valproate in the treatment of epilepsy in girls and women of childbearing potential. *Epilepsia.* 2015;56(7):1006-19. doi: 10.1111/epi.13021
65. Klein AM. Epilepsy cases in pregnant and postpartum women: a practical approach. *Semin Neurol.* 2011;31:392-6. doi: 10.1055/s-0031-1293538
66. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs). Structure-activity relationships: history and new QSAR perspectives. *Med Res Rev.* 2012;32:1-165. doi: 10.1002/med.20200

Поступила 25.04.2017

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.