

С.В. Шевчук
І.П. Кувікова

Науково-дослідний інститут
реабілітації інвалідів
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова, Вінниця

Ключові слова: антифосфолі-
підний синдром, мутація в гені
5,10-метилентетрагідрофолат-
редуктази, гіпергомоцистеїне-
мія, вітамінна недостатність,
ураження судин.

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА 5,10-МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРО- ФОЛАТРЕДУКТАЗИ С677Т У ПАЦІЄНТІВ ІЗ АНТИФОСФО- ЛІПІДНИМ СИНДРОМОМ, ЗВ'ЯЗОК ІЗ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕ- МІЄЮ, ВІТАМІННОЮ НЕДОСТАТ- НІСТЮ ТА УРАЖЕННЯМ СУДИН

Мета роботи — вивчити поширеність мутації С677Т в гені 5,10-метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР) у пацієнтів із антифосфоліпідним синдромом (АФС) і оцінити її зв'язок із гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), вітамінною недостатністю та розвитком судинних уражень. Обстежено 82 хворих, серед яких 34 (41,6%) — із первинним (ПАФС) та 48 (58,4%) — зі вторинним антифосфоліпідним синдромом (ВАФС). Контрольну групу становили 37 практично здорових осіб. У групі контролю виявилось 10,8% гомозиготних носіїв мінорного алеля (677-ТТ) МТГФР, 37,8% гетерозигот (677-СТ) та 51,4% нормальних гомозигот (677-СС), а частота Т-алеля становила 29,7%. Серед осіб з АФС частота нормальних гомозигот 677-СС становила 45,1%, гетерозигот 677-СТ — 39%, гомозигот 677-ТТ — 15,9%. Частота Т-алеля серед хворих з АФС була вищою (35,4%), ніж у групі контролю. За поширеністю генотипів МТГФР С677Т групи хворих з АФС достовірно не відрізнялися, хоча в групі з ПАФС частота Т-алеля та частка хворих — гомозигот 677-ТТ виявилися більшими, ніж у групі осіб із ВАФС, і становили 36,8 та 17,7% проти 34,4 та 14,6% відповідно. Отже, поліморфізм Т/Т-гена МТГФР за 677 нуклеотидом у пацієнтів із АФС асоціюється з ГГЦ, дефіцитом фолієвої кислоти та кобаламіну, і не має зв'язку з антифосфоліпідними антитілами, маркерами запалення та порушеннями ліпідного обміну. Мутація С677Т за геном МТГФР у осіб із АФС не є самостійним фактором ризику розвитку судинних уражень, оскільки серед Т677Т-гомозигот, С677Т-гетерозигот та С677С-гомозигот не виявлено достовірних міжгрупових відмінностей за показниками дисфункції ендотелію, субклінічними та клінічними проявами ураження судин.

ВСТУП

На сьогодні проводяться широкомасштабні дослідження щодо встановлення ролі генетичного поліморфізму у виникненні судинних захворювань. Особлива увага відводиться мутації С677Т в гені 5,10-метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР), яка пов'язана із заміною цитозину на тимін у нуклеотиді 677 (677С→Т) у відкритій рамці читування гена МТГФР (Fijnheer R. et al., 1998; Eftychiou C. et al., 2012). Це — аутосомна рецесивна мутація. Частота С677Т поліморфізму варіює залежно від популяції. Зокрема клінічно значимий гомозиготний її тип виявляють у 12% французьких канадців, 12–15% японців і мешканців ряду країн Європи та Сходу, водночас значно рідше (у 1,4–5,4%) — у афроамериканців, мешканців скандинавських країн та голландців (Cattaneo M., 1999; Girelli D. et al., 2003). Висловлю-

ється думка, що мутація МТГФР має патогенетичне значення за умов вітамінного дефіциту і, можливо, синергічної дії інших неідентифікованих чинників (Ueland P.M. et al., 2001). МТГФР забезпечує численні перетворення в організмі, тому знижена активність цього ферменту, особливо в умовах недостатності вітамінів В₉, В₁₂ та В₆, супроводжується накопиченням гомоцистеїну (ГЦ). Зокрема, у гомозиготних носіїв мінорного Т-алеля частота розвитку гіпергомоцистеїнії (ГГЦ) у >10 разів вища, ніж у нормальних гомозигот 677-СС (Guttormsen A.V. et al., 1996). Патогенетичне значення поліморфізму за МТГФР є предметом інтенсивних досліджень, встановлено його зв'язок із дефектами розвитку нервової трубки (Ueland P.M. et al., 2001), психічними розладами, ураженнями серцево-судинної системи (Girelli D., 2003; Kadziela J. et al., 2003; Eftychiou C. et al., 2012).

Однак генетичний поліморфізм у більшості випадків не визначає патологічний процес, а лише схильність до його розвитку, тому, ймовірно, мають існувати інші (ГГЦ, дефіцит кобаламіну та фолієвої кислоти, антитіл до фосфоліпідів, системний запальний процес) чинники, які, власне, і запускають розвиток судинних уражень у хворих на антифосфоліпідний синдром (АФС). Поширеність мутації С677Т в гені МТГФР в українській популяції пацієнтів із АФС не вивчалась.

Мета дослідження — вивчити поширеність мутації С677Т в гені МТГФР у хворих на АФС та оцінити її зв'язок із ГГЦ, вітамінною недостатністю і розвитком судинних уражень.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під нашим спостереженням перебували 82 хворих, серед яких 34 (41,6%) із первинним антифосфоліпідним синдромом (ПАФС) та 48 (58,4%) — зі вторинним антифосфоліпідним синдромом (ВАФС). Контрольну групу становили 37 практично здорових осіб. Групи хворих були зіставні за віком, статтю і тривалістю захворювання.

Діагноз АФС встановлювали на основі Міжнародних класифікаційних критеріїв 2006 р. (Myakis S. et al., 2006). Системний червоний вовчак (СЧВ) верифікували на основі критеріїв ACR (1997) і формулювали згідно з класифікацією, рекомендованою Асоціацією ревматологів України (2002). Лабораторна оцінка антитіл до фосфоліпідів включала визначення антитіл до кардіоліпіну ізо типу IgG та сумарних антитіл до β_2 -глікопротеїну-1 (бета-2-ГП-1). Вміст антикардіоліпінових антитіл ізо типу IgG визначали імуноферментним методом із використанням комерційного набору фірми «Trinity Biotech Captia», США — Ірландія. Вміст антитіл до бета-2-ГП-1 класів IgG, IgA, IgM визначали імуноферментним методом із використанням комерційного набору фірми «ORGenTec GmbH», Німеччина.

Вміст загального ГЦ, розчинного тромбомодуліну (sCD141), С-реактивного протеїну (СРП), інтерлейкіну-6 та ендотеліну-1 визначали імуноферментними методами за наборами «Homocysteine EIA» («Axis-Shield», Англія), «Human CD141 ELISA» (Diacclone, France), «hsCRP ELISA» («DRG», США), «IL-6 ELISA» («Diacclone», Франція), «Endothelin-1» (Cormay, Англія) у відповідності до інструкцій фірм-виробників на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS.

Вміст фолієвої кислоти в сироватці крові визначали мікробіологічним методом за набором «Folic Acid Vitamin B₉ Microbiological Test Kit» («Alpco Diagnostics»). Її рівень >6 мкг/л розглядався як нормальний, у межах 3–6 мкг/л — як гранично знижений, <3 мкг/л — як дефіцитний (Спиричев В.Б., 1984; Carmel R. et al., 2003).

Вміст кобаламіну (вітаміну В₁₂) у сироватці крові визначали імунохімічним методом з електрохемілюмінісцентною детекцією (ECLIA) (референтний інтервал — 191–663 пг/мл). Рівень кобаламіну >200 пг/мл розглядався як нормальний, у межах 200–300 пг/мл — як гранично знижений,

<200 пг/мл — як дефіцитний (Спиричев В.Б., 1984; Pennypacker L.C., 1992; Carmel R. et al., 2003).

Генотипування МТГФР проводили за допомогою ампліфікації фрагмента гена МТГФР, який містить поліморфний нуклеотид, з подальшим рестрикційним аналізом продукту ампліфікації. Для контролю проходження реакції рестрикції разом із фрагментом МТГФР ампліфікували фрагмент гена фібриногену А α , який містить сайт рестрикції для рестриктази, яка використовується в рестрикційному аналізі гена МТГФР. Ампліфікацію за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та рестрикцію проводили за модифікованим методом P. Frosst та співавторів (1995).

Для ампліфікації обох фрагментів використано дві пари праймерів:

МТГФР	A: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'
	B: 5'-AGG ACG GTG CCG TGA GAG TG-3'
Фібриноген А α	C: 5'-CTC CCT TCA CTT TCA GAA CTA CA-3'
	D: 5'-GAC CTC TCA GTT TTC ACC TTT A-3'

Показники загального холестерину (ЗХС), холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ХС ЛПВЩ) і тригліцеридів (ТГ) у сироватці крові досліджували за стандартно прийнятою методикою. Значення ХС ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) розраховували за формулою Friedwald:

$$\text{ХС ЛПНЩ} = \text{ЗХС} - \text{ХС ЛПВЩ} - (0,45 \cdot \text{ТГ}).$$

Для вивчення функції ендотелію використовували ехолокацію високого розрізнення та доплерографію плечової артерії, яку виконували, як описано D. Selermajer та співавторами (1992). Товщину комплексу інтими — медіа загальної сонної артерії (КІМ ЗСА) визначали під час сканування ЗСА у В-режимі ехолокації на відстані 2 см від біфуркації в діастолічну фазу при максимальному збільшенні. Ступінь атеросклеротичного ураження судин та наявність атеросклеротичної бляшки (АБ) оцінювали за I. Wendelhag та співавторами (1993). Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері за допомогою стандартних статистичних програм «Microsoft Excel» для Windows-2000. Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, достовірність відмінностей за t-критерієм Стьюдента, проводили парний кореляційний аналіз. Результати представлені як $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати виконаних нами досліджень свідчать, що в групі контролю виявилось 10,8% гомозиготних носіїв мінорного алеля (677-ТТ) МТГФР, 37,8% гетерозигот (677-СТ) та 51,4% нормальних гомозигот (677-СС), а частота Т-алеля становила 29,7% (табл. 1). Серед пацієнтів з АФС спостерігалось зменшення частки нормальних гомозигот 677-СС, натомість зростала частка гетерозигот 677-СТ та гомозигот 677-ТТ. Відповідно, частота виявлення Т-алеля серед пацієнтів з АФС була більшою, ніж у групі контролю, і становила 35,4%.

За поширеністю генотипів МТГФР С677Т групи осіб з АФС достовірно не відрізнялися, хоча у гру-

пі з ПАФС частота Т-алеля та частка хворих — гомозигот 677-ТТ — виявилися більшими, ніж у групі хворих з ВАФС, і становили 36,8 та 17,7% проти 34,4 та 14,6% відповідно.

Таблиця 1

Частота генотипів МТГФР С677Т у практично здорових осіб та пацієнтів із ПАФС та ВАФС

Група	Частота генотипів МТГФР С677Т, n (%)			Частота Т-алеля, %
	677-СС	677-СТ	677-ТТ	
Контроль (n=37)	19 (51,4)	14 (37,8)	4 (10,8)	29,7
Пацієнти з АФС (n=82)	37(45,1)	32 (39,0)	13 (15,9)	35,4
$P_{1,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
У тому числі:				
- пацієнти з ВАФС (n=48)	22 (45,8)	19 (39,6)	7 (14,6)	34,4
- пацієнти з ПАФС (n=34)	15 (44,1)	13 (38,2)	6 (17,7)	36,8
$P_{3,1}$	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001
$P_{4,1}$	<0,001	<0,05	>0,05	<0,05
$P_{3,4}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Аналіз вмісту ГЦ в сироватці крові у пацієнтів з АФС залежно від генотипу МТГФР С677Т засвідчив, що наявність мінорного Т-алеля є вагою детермінантою розвитку ГЦ у цього контингенту осіб (табл. 2). За середніми величинами вміст ГЦ у хворих на АФС — гомозигот 677-ТТ був достовірною вищим на 36,7 та 21,0%, ніж у гомозигот 677-СС та гетерозигот 677-СТ відповідно.

Частка осіб з ГЦ серед гомозигот 677-ТТ достовірно в 2,4 та 1,8 раза перевищувала частки осіб з ГЦ серед нормальних гомозигот 677-СС та гетерозигот 677-СТ. Слід відзначити, що у гетерозигот 677-СТ вміст ГЦ у середньому був більшим (на 12,9%), ніж у нормальних гомозигот, і, відповідно, частіше реєстрували ГЦ, однак виявлені відмінності не сягали межі вірогідності.

Таблиця 2

Рівень ГЦ та частота ГЦ у пацієнтів з АФС (n=82) залежно від генотипу МТГФР С677Т

Генотип МТГФР С677Т	ГЦ, мкмоль/л	
	М±m	ГЦ >15 мкмоль/л, n (%)
Гомозиготи 677-СС (n=37)	13,9±0,70	12 (32,4)
Гетерозиготи 677-СТ (n=32)	15,7±0,87	14 (43,8)
$P_{1,2}$	>0,05	>0,05
Гомозиготи 677-ТТ (n=13)	19,0±1,24	10 (76,9)
$P_{3,1}$	<0,01	<0,01
$P_{3,2}$	<0,05	<0,05

У хворих на АФС наявність мінорного Т-алеля асоціювалася з більш суттєвими порушеннями вітамінного статусу, особливо фолієвої кислоти (табл. 3). Зокрема, серед пацієнтів із АФС недостатність фолієвої кислоти (≤ 6 нг/мл) реєстрували у 27% нормальних гомозигот 677-СС і більше ніж у 50% гетеро- та гомозиготних носіїв мінорного Т-алеля. Недостатність кобаламіну (≤ 300 пг/мл) серед осіб із АФС виявлена у 24,3% носіїв генотипу 677-СС та 43–46% носіїв Т-алеля.

Аналіз вмісту маркерів запалення в сироватці крові у пацієнтів з АФС залежно від генотипу МТГФР С677Т не виявив суттєвих міжгрупових відмінностей за середніми величинами, хоча у носіїв Т-алеля спостерігалась тенденція до зростання рівнів СРП та інтерлейкіну-6 (табл. 4). Виявилось, що частки

осіб з аберантними рівнями СРП (>5 мг/л) та інтерлейкіну-6 (>9 пг/мл) серед гомозигот 677-ТТ були на 5–10% більшими, ніж серед гомозигот 677-СС.

Таблиця 3

Показники забезпеченості фолієвою кислотою та кобаламіном у пацієнтів з АФС (n=82) залежно від генотипу МТГФР С677Т

Генотип МТГФР С677Т	Фолієва кислота, нг/мл		Кобаламін, пг/мл	
	М±m	≤ 6 нг/мл, n (%)	М±m	≤ 300 пг/мл, n (%)
Гомозиготи 677-СС (n=37)	6,90±0,43	10 (27,0)	369±19,5	9 (24,3)
Гетерозиготи 677-СТ (n=32)	5,92±0,48	16 (50,0)	337±24,3	14 (43,7)
$P_{1,2}$	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
Гомозиготи 677-ТТ (n=13)	5,67±0,81	7 (53,8)	338±39,8	6 (46,2)
$P_{3,1}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблиця 4

Вміст маркерів запалення в сироватці крові у пацієнтів з АФС (n=82) залежно від генотипу МТГФР С677Т

Генотип МТГФР С677Т	СРП, мг/л		Інтерлейкін-6, пг/мл	
	М±m	$>5,0$ мг/л, n (%)	М±m	>9 пг/мл, n (%)
Гомозиготи 677-СС (n=37)	6,26±0,65	23 (62,2)	11,7±0,88	23 (62,2)
Гетерозиготи 677-СТ (n=32)	6,93±0,48	22 (68,7)	15,8±1,50	22 (68,7)
$P_{1,2}$	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
Гомозиготи 677-ТТ (n=13)	6,31±0,65	9 (69,2)	13,6±1,99	10 (76,9)
$P_{3,1}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

У подальшому нами оцінено, яким чином поліморфізм за МТГФР пов'язаний із показниками ліпідного обміну (табл. 5). Встановлено, що рівні ЗХС, ХС ЛПНЩ, ХС ЛПВЩ та ТГ у гомозигот 677-ТТ практично не відрізнялися від таких у гетерозигот 677-СТ чи гомозигот 677-СС. Жоден із варіантів гена МТГФР не асоціювався із рівнем антифосфоліпідних антитіл у сироватці крові. Середні рівні антикардіоліпінних антитіл класу IgG чи антитіл проти бета-2-ГП-1 у гетеро- та гомозиготних носіїв мінорного Т-алеля були практично зіставними із нормальними гомозиготами 677-СС.

Таблиця 5

Вміст показників ліпідного обміну та антифосфоліпідних антитіл у сироватці крові у пацієнтів з АФС (n=82) залежно від генотипу МТГФР С677Т (М±m)

Показник	Генотип МТГФР С677Т		
	Гомозиготи 677-СС	Гетерозиготи 677-СТ	Гомозиготи 677-ТТ
Кількість спостережень, n	37	32	13
ЗХС, ммоль/л	5,72±0,16	6,14±0,20	6,15±0,29
ХС ЛПВЩ, ммоль/л	1,09±1,05	1,03±0,05	1,01±0,11
ХС ЛПНЩ, ммоль/л	3,79±0,15	4,06±0,15	4,10±0,30
ТГ, ммоль/л	1,96±0,11	2,35±0,16	2,15±0,23
Взаємозв'язок із рівнями антитіл до кардіоліпіну класу IgG та антитіл до бета-2-ГП-1 класів IgG, IgA, IgM			
Антикардіоліпінні антитіла класу IgG	13,2±0,73	13,1±1,07	13,1±1,89
Антитіла проти бета-2-ГП-1	68,2±7,2	72,4±8,4	69,9±12,8

Аналіз вмісту маркерів ендотеліальної дисфункції в сироватці крові у пацієнтів з АФС залежно від генотипу МТГФР С677Т не виявив достовірних міжгрупових відмінностей як за середніми величинами, так і за частками осіб із високими рівнями цих показників (табл. 6). При цьому слід відзначити, що носійство Т-алеля супроводжувалося слабкою тенденцією до зростання вмісту тромбомодуліну та ендотеліну-1.

Таблиця 6

Вміст маркерів ендотеліальної дисфункції в сироватці крові у пацієнтів з АФС (n=82) залежно від генотипу МТГФР С677Т

Генотип МТГФР С677Т	sCD141, нг/мл		Ендотелінін-1, пг/мл	
	M±m	>5,0 нг/мл, n (%)	M±m	>10 пг/мл, n (%)
Гомозиготи 677-СС (n=37)	4,75±0,32	18 (48,6)	8,60±0,81	15 (40,5)
Гетерозиготи 677-СТ (n=32)	4,87±0,34	14 (43,7)	8,82±0,81	14 (43,7)
$P_{1,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Гомозиготи 677-ТТ (n=13)	5,01±0,42	6 (46,2)	10,3±1,32	6 (46,2)
$P_{3,1}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$P_{3,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Аналіз структурно-функціональних змін у судинах залежно від генотипу МТГФР С677Т також не виявив суттєвих міжгрупових відмінностей як за середніми величинами, так і за часткою осіб із потовщенням КІМ ЗСА, зниженням ендотеліальної залежної вазодилатації плечової артерії (ЕЗВДПА) та наявністю АБ на ЗСА, хоча у носіїв Т-алеля спостерігалася тенденція до зростання товщини КІМ ЗСА, зниження ЕЗВДПА (табл. 7). Зокрема, частка осіб із потовщенням КІМ ЗСА (>0,90 мм) та зниженням ЕЗВДПА (≤8,0%) серед гомозигот 677-ТТ була на 3–6,5% більшою, ніж серед гомозигот 677-СС. Серед гомозигот 677-ТТ у 1,2–1,8 рази частіше виявляли хворих із транзиторною ішемічною атакою (ТІА), ішемічним інсультом, інфарктом міокарда (ІМ) та стенокардією.

Таблиця 7

Взаємозв'язок генотипу МТГФР С677Т з ЕЗВДПА, товщиною КІМ ЗСА, наявністю АБ та судинними ускладненнями у пацієнтів із АФС (M±m)

Показник	Генотип МТГФР С677Т		
	Гомозиготи 677-СС	Гетерозиготи 677-СТ	Гомозиготи 677-ТТ
Кількість спостережень, n	34	29	13
КІМ ЗСА, мм	0,86±0,03	0,90±0,03	0,88±0,05
Кількість осіб з КІМ ЗСА >0,90 мм, n (%)	12 (35,3)	15 (51,7)	5 (38,5)
ЕЗВДПА, %	7,09±0,49	6,92±0,58	6,32±1,0
Кількість осіб із ЕЗВДПА ≤8,0%, n (%)	16 (47,0)	14 (48,3)	7 (53,8)
Наявність АБ, n (%)	9 (26,5)	14 (48,3)	3 (23,1)
ТІА + ішемічний інсульт, n (%)	15 (44,1)	13 (44,8)	7 (53,8)
ІМ + стенокардія, n (%)	7 (20,5)	6 (20,7)	5 (38,5)

Таким чином, результати нашого дослідження свідчать, що серед обстежених пацієнтів із АФС частота нормальних гомозигот 677-СС становила 45,1%, гетерозигот 677-СТ — 39%, гомозигот 677-ТТ — 15,9%. Частота виявлення Т-алеля серед па-

цієнтів із АФС становила 35,4%. У контрольній групі було 10,8% гомозиготних носіїв мінорного алеля (677-ТТ) МТГФР, 37,8% — гетерозигот (677-СТ) та 51,4% — нормальних гомозигот (677-СС), а частота Т-алеля становила 29,7%. Розподіл генотипів 677-СС, 677-СТ, 677-ТТ у контрольній групі підкорявся закону Харді — Вайнберга і в цілому відповідав поширеності поліморфізму МТГФР гена С677Т серед практично здорових осіб в Україні (Гречанина Е.Я., 2009; Заїчко Н.В., 2010). Дослідження польської популяції показало, що частота гомозиготних носіїв мінорного алеля (677-ТТ) МТГФР становила 9,2% (Kadziela J. et al., 2003).

Наявність мінорного Т-алеля генотипу МТГФР С677Т є вагомою детермінантою розвитку ГГЦ у пацієнтів із АФС. Зокрема, якщо серед нормальних гомозигот 677-СС частка осіб з ГГЦ становила 32,4%, то серед гетерозигот С677Т — 43,8%, а серед гомозигот Т677Т — 76,9%. За середніми величинами вміст ГЦ у пацієнтів із АФС — гомозигот 677-ТТ — був достовірно вищим на 36,7 та 21,0%, ніж у гомозигот 677-СС та гетерозигот 677-СТ відповідно. Наявність асоціативного зв'язку генетичного поліморфізму МТГФР із ГГЦ встановлено в осіб із цукровим діабетом II типу (Mello A.L. et al., 2012) та у хворих з ангиографічно задокументованим ураженням судин (Hiroyuki Morita et al., 1997; Kadziela J. et al., 2003), де гомозиготи Т677Т мали на 40% вищу концентрацію ГЦ, ніж гетерозиготи С677Т чи гомозиготи С677С.

Наявність мінорного Т-алеля також асоціювалася з вітамінною недостатністю, особливо дефіцитом фолієвої кислоти. Зокрема, серед пацієнтів із АФС недостатність фолієвої кислоти (≤6 нг/мл) реєстрували у 27% нормальних гомозигот 677-СС і у >50% гетеро- та гомозиготних носіїв мінорного Т-алеля. Недостатність кобаламіну (≤300 пг/мл) серед осіб із АФС виявлено у 24,3% носіїв генотипу 677-СС та 43–46% носіїв Т-алеля. Водночас, згідно з деякими даними (Kadziela J. et al., 2003; Stuart J. et al., 2003), рівні фолієвої кислоти і вітаміну В₁₂ у хворих з ураженням судин не пов'язані з генетичним поліморфізмом за МТГФР, а, очевидно, пов'язані з іншими факторами ризику.

Результати проведених досліджень свідчать, що носійство Т/Т-варіанта гена МТГФР у пацієнтів із АФС практично не мало зв'язку з ліпідним спектром крові та інтенсивністю запальної реакції (рівнем СРП та інтерлейкіну-6). Також не виявлено статистично значимих відмінностей у рівнях антитіл до кардіоліпіну та бета-2-ГП-1 між С677С-гомозиготами та С677Т-гетерозиготами або Т677Т-гомозиготами. Водночас відзначено, що отримані дані суперечать результатам (Reshetniak T.M. et al., 2002; George V.Z. et al., 2005), які виявили статистично значимий зв'язок генетичного поліморфізму за МТГФР з концентрацією антифосфоліпідних антитіл, рівнями СРП та фібриногену.

Отримані нами дані свідчать, що мутація С677Т за геном МТГФР не є фактором ризику розвитку атеросклеротичного ураження судин у пацієнтів із АФС, на що вказує відсутність асоціативних

взаємозв'язків між рівнем ЕЗВДПА, потовщенням КІМ ЗСА, як і власне судинних уражень, з одного боку, та поліморфізмом за МТГФР — з іншого. Носійство Т-алеля також супроводжувалося слабкою тенденцією до зростання вмісту маркерів дисфункції ендотелію — тромбомодуліну та ендотеліну-1 в сироватці крові пацієнтів із АФС. Значення мутації С677Т за геном МТГФР як незалежного фактора ризику судинних уражень також не доведено (Fijnheer R. et al., 1998; Bahadır Anzel et al., 2014). За даними А. Afeltra та співавторів (2005), докази патогенетичного значення цієї мутації виявлено. Аналогічні дані отримані японськими дослідниками, в яких носійство Т-алеля чітко асоціюється з кількістю уражень коронарних артерій (Morita Hiroyuki et al., 1997).

Тобто, підсумовуючи отримані дані, слід відзначити, що роль генетичного поліморфізму у виникненні судинних захворювань — далеко не визначальна. Слід зауважити, що сам по собі внесок окремих алельних варіантів у підвищення ризику судинних захворювань недостатньо високий, оскільки мутації, які спричиняють судинні ускладнення та в подальшому можливу передчасну смерть, просто не змогли б накопичитись у популяції. Тому набагато більше значення для реалізації впливу генетичного поліморфізму на долю індивіда має односпрямована (синергічна) дія одночасно кількох факторів ризику, які власне і запускають розвиток уражень судин.

ВИСНОВКИ

1. Частота Т-алеля гена МТГФР за 677 нуклеотидом серед пацієнтів із АФС становить 35,4%, серед яких частота нормальних гомозигот 677-СС — 45,1%, гетерозигот — 677-СТ 39%, гомозигот 677-ТТ — 15,9%.

2. Поліморфізм Т/Т-гена МТГФР за 677 нуклеотидом у осіб із АФС асоціюється з ГГЦ, дефіцитом фолієвої кислоти та кобаламіну і не має зв'язку з антифосфоліпідними антитілами, маркерами запалення та порушенням ліпідного обміну.

3. Мутація С677Т за геном МТГФР у пацієнтів із АФС не є самостійним фактором ризику розвитку судинних уражень, оскільки серед Т677Т-гомозигот, С677Т-гетерозигот та С677С-гомозигот не виявлено достовірних міжгрупових відмінностей за показниками дисфункції ендотелію (тромбомодуліну та ендотеліну-1), субклінічними (ЕЗВДПА, товщина КІМ ЗСА) та клінічними (ІМ, стенокардія, інсульт, ТІА, венозні тромбози) проявами ураження судин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Гречанина Е.Я. (2009) Сравнительная характеристика частот аллелей С677Т МТНFR, А66С МТRRR генів системи фолатного цикла і ВПР ЦНС. Ультразвук. перинат. діагност., 27–28: 4–12.

Заїчко Н.В. (2010) Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфіду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази. Експеримент. клініч. фізіол. біохім., 4: 35–41.

Спиричев В.Б. (1984) Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения. Наука, 170 с.

Afeltra A., Vadacca M., Conti L. et al. (2005) Thrombosis in systemic lupus erythematosus: congenital and acquired risk factors. *Arthritis Rheum.*, 53(3): 452–459.

Bahadır Anzel, Eroz Recep, Türker Yasin (2014) Does MTHFR C677T gene polymorphism indicate the cardiovascular disease risk in Type 2 diabetes mellitus patients? *Anadolu Kardiyol Derg.*, DOI: 10.5152.

Carmel R., Green R., Rosenblatt D.S. et al. (2003) Update on cobalamin, folate, and homocysteine *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 1: 62–81.

Cattaneo M. (1999) Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Tromb. Haemost.*, 81: 65–76.

Celermajer D., Sorensen K., Gooch V. et al. (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.*, 340: 1111–1115.

Eftychiou C., Loizos Antoniadis, Loukia Makri et al. (2012) Homocysteine Levels and MTHFR Polymorphisms in Young Patients with Acute Myocardial Infarction: A Case Control Study *Hellenic. J. Cardiol.*, 53: 189–194.

Fijnheer R., Roest M., Haas F.J. et al. (1998) Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, antiphospholipid antibodies, and thromboembolic events in systemic lupus erythematosus: a retrospective cohort study. *J. Rheumatol.*, 25: 1737–1742.

Frosst P., Blom H.J., Milos R. et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, 10: 111–113.

George V.Z. Dedoussis, Demosthenes B. (2005) The ATTICA Study Group An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Inter. J. Cardiol.*, 100(3): 409–414.

Gershoni-Baruch R., Dagan E., Israeli D. et al. (2000) Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur. J. Cancer.*, 36(18): 2313–2316.

Girelli D., Martinelli N., Pizzolo F. et al. (2003) The interaction between MTHFR 677 C-T genotype and folate status is a determinant of coronary atherosclerosis risk. *J. Nutr.*, 133(5): 1281–1285.

Guttormsen A.B., Ueland P.M., Nesthus I. et al. (1996) Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J. Clin. Invest.*, 98(9): 2174–2183.

Kadziela J., Janas J., Dzielińska Z. et al. (2003) The C677T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma homocysteine concentration and the risk of coronary artery diseases. *Kardiol. Pol.*, 59(7): 17–26.

Matthews R.G. (2002) Methylenetetrahydrofolate reductase: A common human polymorphism and its biochemical implications. *Chem. Rec.*, 2(1): 4–12.

Mello A.L., Cunha S.F., Foss-Freitas M.C. et al. (2012) Evaluation of plasma homocysteine level according to the C677T and A1298C polymorphism of the enzyme MTHFR in type 2 diabetic adults. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 56(7): 429–434.

Myakis S., Lockshin M.D., Atsumi A. et al. (2006) International consensus statement on an updated of the classification criteria for the definite antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.*, 4: 295–306.

Morita Hiroyuki, Taguchi Junichi, Kurihara Hiroki et al. (1997) Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) as a Risk Factor for Coronary Artery Disease. *Circulation.*, 95: 2032–2036.

Pennybacker L.C., Allen R.H., Kelly J.P. et al. (1992) High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 40(12): 1197–1204.

Reshetniak T.M., Patrushev L.I., Tikhonova T.F. et al. (2002) Mutation of a 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Ter. Arkh.*, 74(5): 28–32.

Stuart J. Moat, Pauline A.L. Ashfield-Watt, Hilary J. Powers et al. (2003) Effect of Riboflavin Status on the Homocysteine-lowering Effect of Folate in Relation to the MTHFR (C677T). *Genotype Clin. Chemistry*, 49: 2295–2302.

Ueland P.M., Hustad S., Schneede J. et al. (2001) Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci., 22(4): 195–201.

Wendelhag I., Wiklund O., Wikstrand J. (1993) Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence. Arterioscler. Thromb., 13: 1404–1411.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА
5,10-МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТ-
РЕДУКТАЗЫ С677Т У ПАЦИЕНТОВ
С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ
СИНДРОМОМ, СВЯЗЬ
С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ,
ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ
И ПОРАЖЕНИЕМ СОСУДОВ**

С.В. Шевчук, И.П. Кувикова

Резюме. Цель работы — изучить распространенность мутации С677Т в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) у пациентов с антифосфолипидным синдромом (АФС) и оценить ее связь с гипергомоцистеинемией (ГГЦ), витаминной недостаточностью и развитием сосудистых поражений. Обследовано 82 больных, среди которых 34 (41,6%) — с первичным (ПАФС) и 48 (58,4%) — со вторичным антифосфолипидным синдромом (ВАФС). Контрольную группу составили 37 практически здоровых лиц. В группе контроля оказалось 10,8% гомозиготных носителей минорного аллеля (677-ТТ) МТГФР, 37,8% гетерозигот (677-СТ) и 51,4% нормальных гомозигот (677-СС), а частота Т-аллеля составила 29,7%. Среди лиц с АФС частота нормальных гомозигот 677-СС составила 45,1%, гетерозигот 677-СТ — 39%, гомозигот 677-ТТ — 15,9%. Частота Т-аллеля среди больных с АФС была выше (35,4%), чем в группе контроля. По распространенности генотипов МТГФР С677Т группы больных с АФС достоверно не отличались, хотя в группе с ПАФС частота Т-аллеля и доля больных — гомозигот 677-ТТ оказались больше, чем в группе лиц с ВАФС, и составили 36,8 и 17,7% против 34,4 и 14,6% соответственно. Итак, полиморфизм Т/Т-гена МТГФР по 677 нуклеотиду у пациентов с АФС ассоциируется с ГГЦ, дефицитом фолиевой кислоты и кобаламина, и не имеет связи с антифосфолипидными антителами, маркерами воспаления и нарушениями липидного обмена. Мутация С677Т по гену МТГФР у лиц с АФС не является самостоятельным фактором риска развития сосудистых поражений, поскольку среди Т677Т-гомозигот, С677Т-гетерозигот и С677С-гомозигот не выявлено достоверных межгрупповых различий по показателям дисфункции эндотелия, субклиническим и клиническим проявлениями поражения сосудов.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, мутация в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы, гипергомоцистеинемия, витаминная недостаточность, поражения сосудов.

**GENE POLYMORPHISM
OF 5,10-METHYLENTETRAHYDROFOLATE
REDUCTASE C677T IN PATIENTS
WITH ANTIPHOSPHOLIPID
SYNDROME, RELATIONSHIP
WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA, VITAMIN
DEFICIENCY AND VASCULAR LESIONS**

S.V. Shevchuk, I.P. Kuvikova

Summary. The aim of the study was to examine the prevalence of C677T mutation in gene 5,10-methyltetrahydrofolate reductase (5,10-MTHFR) in patients with antiphospholipid syndrome (APS) and to evaluate its relationship with hyperhomocysteinemia, vitamin deficiency and the development of vascular lesions. Materials and methods. 82 patients were examined, including 34 (41.6%) patients with primary antiphospholipid syndrome (PAPS) and 48 (58.4%) — with secondary antiphospholipid syndrome (SAPS). The control group consisted of 37 healthy individuals. The research found that the frequency of homozygous minor allele carriers (677-TT) MTHFR in the control group was 10.8%, heterozygotes (CT-677) — 37.8% and normal homozygotes (677-CC) — 51.4%, and T-allele frequency was 29.7%. Among patients with APS frequency of normal homozygotes 677-CC was 45.1%, heterozygotes 677-CT — 39%, TT homozygotes 677- — 15.9%. The frequency of T allele among patients with APS was higher than in control group, and was 35.4%. The groups of patients with APS were not significantly different on the prevalence of 5,10-MTHFR C677T genotypes, although T allele frequency and proportion of patients — 677-TT homozygotes in the group of PAPS were higher than in patients with SAPS, and were 36.8 and 17.7% vs 34.4 and 14.6%, respectively. Studies have shown that polymorphism T/T 5,10-MTHFR gene by 677 nucleotides in patients with APS associated with hyperhomocysteinemia, deficiency of folic acid and cobalamin, and has no connection with antiphospholipid antibodies, markers of inflammation and lipid metabolism. Mutations in the gene 5,10-MTHFR TC677T in patients with APS is not an independent risk factor for vascular lesions because of T677T-homozygotes, heterozygotes and C677T-, C677C-homozygotes revealed no significant intergroup differences in endothelial dysfunction, subclinical and clinical manifestations of vascular lesions.

Key words: antiphospholipid syndrome, a mutation in the gene 5,10-methyltetrahydrofolate reductase, hyperhomocysteinemia, vitamin deficiency, vascular lesions.

Адреса для листування:
Шевчук Сергій Вікторович
21100, Вінниця, Хмельницьке шосе, 104
НДІ реабілітації інвалідів
ВНМУ ім. М.І. Пирогова,
відділ клінічної ревматології
E-mail: shev_sv2@mail.ru