

УДК 618.33:575.224.4(477-25)

Д.О. Микитенко\*,  
О.І. Тимченко\*\*

## ПОШИРЕНІСТЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ СЕРЕД ПОРОДІЛЬ КИЇВСЬКОГО РЕГІОНУ

Клініка репродуктивної медицини «Надія»

(дир. – к. мед. н. В. Д. Зукін)\*

ДУ «Інститут гігієни та медичної екології АМН України»

(дир. – д. мед. н., академік АМН України А. М. Сердюк)\*\*

м. Київ

**Ключові слова:** метилентетрагідрофолатредуктаза, поліморфізм, патологія вагітних та плоду

**Key words:**

*methylenetetrahydrofolate reductase, polymorphism, pregnant and fetus pathology*

**Резюме.** *Исследовано распространение полиморфизмов C677T и A1298C гена метилентетрагидрофолатредуктазы среди рожениц Киевского региона и верифицированы результаты исследования. Показано, что распространение 677CC генотипа составило 60,0%, CT – 31,11%, TT – 8,89%. Частота 1298 AA генотипа была равна 42,96%, AC – 47,41%, CC – 9,63% с 95%-доверительным интервалом ошибки выборки  $\pm 8,4\%$ . Сделаны выводы в отношении необходимости усовершенствования лечебно-профилактических мероприятий соответственно генотипу по данным локусам. Определена группа риска женщин, которым рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования на носительство C677T и A1298C полиморфизмов гена MTHFR.*

**Summary.** *It is studied the distribution of polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C among parturients of Kyiv region and the obtained results were verified. It is shown that distributions of 677CC genotypes was as follows: CC – 60.0%, CT – 31.11%, TT – 8.89%. The frequency of 1298 AA genotype is 42.96%, AC – 47.41% and CC – 9.63% with a reliable interval of error 95% confidence interval  $\pm 8.4\%$ . The necessity of improvement of preventive measures in accordance with MTHFR genotype is confirmed. The group of women with the increased risk of MTHFR-associated pathology development who are recommended to undergo investigation for the genotype MTHFR 677 and 1298 is defined.*

Проблема патології вагітних та плоду в умовах нинішніх темпів депопуляції в Україні вирізняється винятковою актуальністю та соціально-медичною значущістю [1]. Її найбільш істотним каталізатором виступає відсутність у державі ефективної соціальної політики, в т.ч. у сфері медицини. Причому поширеність даної патології протягом останніх років продовжує лише наростати та співвідноситься з несприятливою динамікою здоров'я вагітних та новонароджених. Адекватна профілактика акушерської патології дозволить не лише уникнути розвитку критичних для матері та плоду станів, що потребуватимуть застосування інтенсивних лікувальних заходів та передчасного родорозрешення, а й знизити рівень перинатальної патології та частоту вроджених аномалій. Причому об'єктом профілактичних заходів мають бути фактори середовища та харчування, що піддаються корекції.

Важливу роль у патогенезі значної частини патології вагітних та плоду відіграє гомоцистеїн [14]. Підвищення його рівня в плазмі крові матері є патогенетичною причиною порушення процесів імплантації, плацентациї, фетоплацен-

тарної недостатності [13], прееклампсії [17; 18], відшарування плаценти [17] та народження дитини з низькою вагою й зниженим резервом життєзабезпечуючих систем органів тощо [12]. Проникаючи через плаценту, ця амінокислота може спричиняти прямий тератогенний та фетотоксичний вплив [17], що призводить до виникнення дефектів нервової трубки та краніо-фаціальних вад [8], а через порушення процесів метилування та сегрегації хромосом в ооцитах матері – до підвищеного ризику народження дитини з трисомією 21 хромосоми [19]. Звідси впливає нагальна актуальність діагностики гіпергомоцистеїнемії та етіологічної й патогенетичної її корекції.

Одним із основних засобів профілактики гіпергомоцистеїнемії та вроджених вад розвитку плоду вважається фолієва кислота [6], порушення метаболізму якої в той же час є однією з першопричин підвищеного рівня гомоцистеїну [14] та спостерігається за носійства мутантних алелей гена метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) за 677 та 1298 сайтами [9; 16]. Тож, застосування фолатів із профілактичною метою вимагає індивідуального підходу до кожного

пацієнта з огляду на його генотипічний профіль [4; 5].

Проте проблематика поширеності поліморфізмів С677Т та А1298С серед населення України вкрай недостатньо охоплена науковими дослідженнями. Нез'ясованим остаточно залишається у світі і їхній зв'язок з акушерською та перинатальною патологією. Це пов'язано з тим, що поліморфізми простих нуклеотидів не є виключними детермінантами патології, оскільки їх клінічна значущість першочергово визначається особливостями харчового статусу, способом та умовами життя населення певної території [15], що зумовлює варіації їх клінічних проявів у різних регіонах та вікових групах вагітних.

У зв'язку з цим метою дослідження стало дослідження поширеності поліморфізмів С677Т та А1298С гена *MTHFR* серед породіль Київського регіону.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведено із залученням 135 породіль, що проходили родорозрішення протягом квітня-червня 2009 року на базі Київського обласного центру охорони здоров'я матері і дитини (КОЦОЗМіД). Всі жінки були проінформовані та надали згоду на використання клінічної інформації з науковою метою. КОЦОЗМіД було вибрано за базу дослідження з метою уникнення необхідності відбору породіль із декількох місць Київської області та м. Києва, оскільки в цій установі перебувають вагітні, що проживають на обох територіях. Породілі включались у дослідження шляхом ймовірнісної вибірки. Це дозволяє вважати отриману вибірку якісно репрезентативною відносно Київського регіону.

Параметри досліджуваної групи породіль за віком були наступними: мінімальний вік становив 17 років, максимальний – 40 років, середній –  $27,51 \pm 6,08$  р. Вік 50% породіль знаходився в межах  $23 \div 32$  роки. Захворювання статевих органів мали 55 (40,74%) породіль. На екстрагенітальну патологію страждали 58 (42,96%) жінок. Одночасно наявність захворювань статевих органів та екстрагенітальної патології спостерігалась у 22 (16,30%) породіль. Безпліддя в анамнезі мали 5 (3,70%) жінок, з них вагітність у однієї породіллі настала за участю допоміжних репродуктивних технологій. Чоловічого фактора безпліддя жодна з жінок в процесі анкетування не відмітила.

З метою виключення впливу вікового та токсичного фактору у вибірку не включені породілі понад 40 років, ті, що мали професійний контакт із токсичними речовинами в анамнезі,

багатоплідну вагітність, мертвонародження під час даного родорозрішення, зловживали алкоголем (до чи під час вагітності).

Матеріалом для дослідження слугував зразок венозної крові. Забір здійснювався у вакуумні стерильні пробірки, оброблені літій-гепарином (Sarstedt, Німеччина), об'ємом 1,2 мл. Виділення ДНК проводилося з використанням комерційного набору QIAmp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Дослідження поліморфізмів гена *MTHFR* здійснювалось проведенням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу з наступною дискримінацією алелей при використанні 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) з програмним забезпеченням SDS v1.4. Дослідження проводилось на основі комерційного тест-набору TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems, США) SNP ID hCV1202883 (refSNP rs1801133) для С677Т та hCV850486 (rs1801131) для А1298С з умовами, рекомендованими виробником.

Розрахунок вибіркової помилки при екстраполяції результатів дослідження здійснений з використанням формули вибіркового обстеження [3] (1):

$$d = z_{\alpha} \sqrt{\frac{\omega(1-\omega)}{n} \left(1 - \frac{n}{N}\right)} \quad (1),$$

де:  $d$  – помилка вибіркової долі;  $z_{\alpha}$  – показник кратності помилки обсягу вибірки, який для рівня значущості критерію  $P \leq 0,05$  рівний 1,96 (табличне значення);  $N$  – обсяг генеральної сукупності, осіб;  $n$  – обсяг вибірки, осіб;  $\omega$  – частка досліджуваної ознаки у генеральній сукупності. В умовах, коли розрахунок відбувається за якісно альтернативною ознакою і невідома її частка у генеральній сукупності, як у нашому випадку, приймається значення  $\omega = 0,5$  (до того ж, цей показник вважається доцільним з огляду на дослідження [7]), оскільки дисперсія у таких випадках досягає максимуму [3].

Моделювання комбінацій генотипів за 677 та 1298 локусами гена *MTHFR* проведено за використання програмного забезпечення Haploview 4.1 [10]. Достовірність результатів моделювання оцінювалася за критерієм LOD (Logarithm of Odds) [11].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попри достатньо широку вивченість наведених поліморфізмів, їх поширеність у межах України лишається недостатньо вивченою. Так, піонерським можна вважати дослідження, що

проводилось на території Харківської області. За його результатами встановлено, що частота 677 СС, СТ та ТТ генотипів складає 52,26%, 40,70% та 7,04% відповідно (частота Т-алеля – 27,39%). Аналогічно, 1298 АА, АС та СС – 52,00%, 39,50%, 8,50% відповідно (частота С-алеля – 28,25%) [7]. Позитивно оцінюючи результати цитованої праці, відзначимо, що у вищенаведеній роботі не висвітлені особливості формування вибірки, що унеможливило екстраполяцію наведених частот на рівень області та держави в цілому. Тому, з огляду на унікальність кожної популяції за особливостями генотипу та умовами життя, питання встановлення істинних меж частот поширення мутантних алелів серед жіночого населення України й досі лишається актуальним.

При проведенні дослідження у породіль Київського регіону, що були включені у дослідження, було визначено генотип за 677 та 1298 сайтами гена *MTHFR*. Результати зведено в таблицю 1.

Таблиця 1

**Поширення поліморфізмів С677Т та А1298С серед породіль Київського регіону**

Сайт, генотип	Поширеність поліморфізмів	
	абс.	Відн., %
<b>677 сайт</b>		
СС	81	60,00
СТ	42	31,11
ТТ	12	8,89
<b>Всього</b>	<b>135</b>	<b>100,00</b>
<b>1298-сайт</b>		
АА	58	42,96
АС	64	47,41
СС	13	9,63
<b>Всього</b>	<b>135</b>	<b>100,00</b>

Як впливає з наведених результатів, кількість носіїв поліморфізму С677Т в гетеро- та гомозиготному стані (СТ + ТТ) становила 54 (40,9%) особи. Відтак, частота нормального («дикого») С-алелю склала 75,56%, мутантного Т-алелю – 24,44%. Кількість носіїв А1298С поліморфізму в гетеро- та гомозиготному стані (АС + СС) склала 77 (57,04%) осіб, причому, частота нормального («дикого») А-алелю склала 66,67%, мутантного С-алелю – 33,33%.

Для екстраполяції отриманих даних на рівень Київського регіону як обсяг генеральної сукуп-

ності взято середній трирічний показник кількості народжених осіб за 2006-2008 роки за даними Головного управління статистики в Київській області [2], тобто 18652 особи (2006 р. – 17383 дітей, 2007 р. – 18378, 2008 р. – 20195). В дійсності це число буде дещо перевищувати загальну кількість жінок, що відповідають встановленим критеріям, в області загалом, однак це не є недоліком через те, що зумовлює застосування додатково більш жорстких вимог до розрахунку обсягу вибірки. Таким чином, з формули (1) впливає розрахунок (2):

$$d = 1.96 \sqrt{\frac{0.5(1-0.5)}{135} \left(1 - \frac{135}{18652}\right)} \approx 0.084 \quad (2)$$

Відтак, проведені дослідження дозволяють встановити частоту поширення алельних варіантів гена *MTHFR* серед породіль Київського регіону з помилкою вибіркової долі 0,084 (або 8,4%). Тобто, з рівнем значущості  $P \leq 0,05$  істинна популяційна частота поширення досліджуваних поліморфізмів у когорті жінок, які відповідають критеріям відбору, не буде відрізнятися від розрахункової більш ніж на 8,4%.

Зауважимо, що при проведенні дослідження в жодному випадку не було виявлено гетерозиготного носійства мутації за одним із сайтів одночасно з гомозиготним носійством мутації за іншим (тобто, 677 СТ та 1298 СС, або 677 ТТ та 1298 АС одночасно), а також одночасного гомозиготного носійства мутації за обома сайтами (тобто, 677 ТТ та 1298 СС одночасно), що наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

**Комбінації генотипів за С677Т та А1298С у досліджуваних породіль**

Сайт, осіб	1298 сайт			Всього, осіб
	677 сайт	АА	АС	
СС	30	38	13	81
СТ	16	26	-	42
ТТ	12	-	-	12
<b>Всього, осіб</b>	<b>58</b>	<b>64</b>	<b>13</b>	<b>135</b>

Варто зазначити, що інші дослідники також не виявили зазначених комбінацій генотипів [7; 8]. При цьому [8] припустив, що мутації за вказаними сайтами виникли еволюційно незалежно одне від одного та запропонував розглядати таке явище в якості невірноваженого зчеплення (eng.: linkage disequilibrium) [8, 11]. Як

зрозуміло з отриманих власних результатів та цитованих праць, на одній хромосомі з пари, що містить ген *MTHFR* (1p36.3), з досліджуваних локусів може одночасно бути мутантним лише один. Проте, залишаються нез'ясованими питання: чи можуть взагалі обидва мутантні локуси одночасно знаходитись на одній хромосомі та чи може виникнути така комбінація мутацій випадково або в результаті процесу рекомбінації хромосом? З метою отримання відповіді на це питання було проведено віртуальне моделювання можливих комбінацій генотипів за досліджуваними сайтами гена *MTHFR* з використанням програми *Mapview* 4.1. За даними побудованої моделі частота носійства «дикого» 677 С-алелю складала 75,8%, мутантного 677 Т-алелю – 24,2%. За 1298 сайтом: «дикого» А-алелю – 64,2%, мутантного 35,8%. Змодельовані частоти комбінацій були наступними: 677С/1298А – 40,0%, 677С/1298С – 35,8%, 677Т/1298А – 24,2%, 677Т/1298С – 0%. Тобто, комбінації 677Т/1298С також не було змодельовано. Статистична достовірність розрахунків при цьому склала  $P < 0,0001$  ( $LOD > 3,0$ ). Отримані розрахункові дані співвідносились із результатами власних клінічних спостережень в межах встановленої вибіркової помилки, що підтверджує істинність та репрезентативність отриманих в результаті клінічних спостережень даних, а також правильність вибору методу формування вибірки.

Таким чином, можна заключити, що близькість знаходження поліморфних сайтів унеможливує розходження даних локусів в процесі рекомбінації хромосом. Відтак, мутантні алелі за 677 та 1298 сайтами, що виникли незалежно одне від одного не можуть бути присутніми одночасно на одній хромосомі. Це й обумовлює такі особливості комбінацій генотипів за С677Т та А1298С поліморфізмами гена *MTHFR*, що спо-

стерігались як у наших дослідженнях, так і у роботах попередників. Проте питання можливості виникнення одночасно на одній хромосомі таких поліморфізмів шляхом випадкової мутації та сумісності такої комбінації з життям лишається відкритим для подальшого дослідження.

#### ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження встановлено поширеність поліморфізмів гена метилентетрагідрофолатредуктази серед породіль Київського регіону та верифіковано отримані результати шляхом моделювання, що дозволяє заключити наступне:

1. Частота 677 СС генотипу серед породіль Київського регіону складає 60,0%, СТ – 31,11%, ТТ – 8,89%. 1298 АА генотипу – 42,96%, АС – 47,41%, СС – 9,63% з 95%-довірчими межами вибіркової помилки  $\pm 8,4\%$ .

2. Кожна популяція є унікальною за частотою мутантних алелів та середовищем існування, а оскільки останнє переважно й визначає клінічні асоціації поліморфізмів, це необхідно враховувати при провадженні профілактичних заходів. Відтак, не можна екстраполювати результати дослідження поширеності поліморфізмів та їх клінічної значущості в одному регіоні на інший без проведення додаткових досліджень.

3. Рекомендувати жінкам, що мають схильність до соматичної гомоцистеїн-асоційованої патології, мали проблеми, пов'язані з жіночим фактором безпліддя, чи вагітність котрих в анамнезі перебігала з ускладненнями, а також тим, що мали плід з уродженими краніофціальними вадами чи патологією нервової трубки, рекомендувати генотипування за 677 та 1298 локусами гена *MTHFR* з наступною модифікацією лікувально-профілактичних рекомендацій відповідно до встановленого генотипу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Генофонд і здоров'я: поширеність і чинники ризику виникнення щілин губи і/або піднебіння / О. І.Тимченко, Т.А.Приходько, І.П.Линчак, І.П. Кривич. – К. : Медінформ, 2008. – 155с.
2. Демографічна ситуація. Населення (1995-2009 рр.) [ Електронний ресурс ] / ГУ статистики у Київській області. – <http://www.oblstat.kiev.ua>.
3. Дубина И. Н. Математические основы эмпирических социально-экономических исследований: учебное пособие. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2006. – 283 с.
4. Запорожан В. М. Набуті та генетичні форми тромбофілій в патогенезі акушерської патології / В.

М. Запорожан, В. І. Лінніков // Інтегративна антропологія. – 2006. – №2(8). – С. 3 – 7.

5. Микитенко Д.О. Вплив підвищених рівнів гомоцистеїну на виникнення патології вагітних та вроджених вад розвитку плоду / Д. О.Микитенко, О. І. Тимченко // Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України: збірка тез доповідей науково-практичної конференції молодих вчених (П'яті марзєвські читання), 21-22 травня 2009 року, м.Київ. – К., 2009. – Вип. 9. – С. 107 – 110.

6. Первинна профілактика вродженої і спадкової патології: методичні рекомендації. – К.: Міністерство охорони здоров'я, 2001. – 27 с.

7. Поиск фено- и генотипических соотношений при дефектах фолатного цикла за пределами обычной генетики (часть II) / Е. Я. Гречанина, Р. Маталон, Ю. Б. Гречанина [и др.] // Ультразвукова перинатальна діагностика. – 2008. – № 26. – С. 3–14.

8. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? / N. M. van der Put, F. Gabreëls, E. M. Stevens [et al.] // Amer. J. Human Genetics. – 1998. – Vol. 62, N 5. – P.1044–1051.

9. Bailey L. B. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science / L. B. Bailey, G. C. Rampersaud, G. P. A. Kauwell // J. Nutrition. – 2003. – Vol. 133, N 6. – P. 1961S-1968S.

10. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps / J. C. Barrett B. Fry, J. Maller, M. J. Daly // Bioinformatics. – 2005. – Vol. 2, N2. – P. 263 – 265.

11. Linkage Disequilibrium and Association Mapping / edited by A. R. Collins. – Totowa: Humana Press Inc. – Series: Methods in Molecular Biology. – 2007. – Vol. 376. – 255 p.

12. Maternal Homocysteine before Conception and throughout Pregnancy Predicts Fetal Homocysteine and Birth Weight / M. M. Murphy, J. M. Scott, V. Arijia [et al.] // Clinical Chemistry. – 2004. – Vol. 50, N 4. – P.1406–1412.

13. Maternal MTHFR polymorphism and risk of spontaneous abortion / M. d. R. Rodríguez-Guillen, L. Torres-Sanches, J. Chen [et al.] // Salud Pública de México. – 2009. – Vol. 51, N 1. – P. 19–25.

14. Medina M. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. / M. Medina, J. Uradias, M. Amores-Sauches // Eur. J. Biochemistry. – 2001. – Vol. 268, N 14. – P. 3871–3882.

15. Miller M. S. Genetic polymorphisms and susceptibility to disease / M. S. Miller, M. T. Cronin. – Boca Raton : CRC Press, 2000. – 266 p.

16. Mills J. L. Fortification of foods with folic acid – how much is enough? / J. L. Mills // New Engl. J. Medicine. – 2000. – Vol. 342, N 19. – P. 1442–1445.

17. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study / S. E. Vollset, H. Refsum, L. M. Irgens [et al.] // Amer. J. Clinical Nutrition. – 2000. – Vol. 71. – P. 962–968.

18. Wilkins-Haug L. Inherited thrombophilia and adverse pregnancy out-comes: What the evidence shows. / L. Wilkins-Haug // OBG Management. – 2003. – April Issue. – P. 34 – 48.

19. Zintzaras E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis / E. Zintzaras // J. Human Genetics. – 2007. – Vol. 52, N 11. – P. 1434 – 1461.

