

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616–053.2–001.28–06:577.164.17:546.15:612.015.31:546.41

THE STATE OF FOLATE METABOLISM AND CALCIUM METABOLISM IN CHILDREN LIVING IN DISTRICTS AFFECTED BY THE CHERNOBYL NUCLEAR POWER PLANT ACCIDENT

¹*Yu. I. Bandazhevskiy*, ²*N. F. Dubovaia*

¹Ecology and Health Coordination and Analytical Centre, Ivankiv,

²Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

Introduction. Homocysteine reflects the state of folate metabolism. At the same time, its link to osteoporosis has been established. Given that hyperhomocysteinemia has been found in more than 75.0% of children living in districts adjacent to the Chernobyl exclusion zone, it is reasonable to study calcium metabolism in them.

The purpose of this study was to identify the association between blood levels of homocysteine, parathyroid hormone and ionized calcium, taking into account folate metabolism genotypes in children living in districts affected by the Chernobyl nuclear power plant accident.

Research methods. Immunochemical, mathematical and statistical.

Results. A direct association was reported between blood homocysteine and ionized calcium levels in the group of children living in affected areas 30 years after the accident at the Chernobyl nuclear power plant. At the same time, there was no association between ionized calcium and parathyroid hormone concentrations.

This effect is associated with the carriership of the T allele of the MTHFR:677 genetic polymorphism responsible for the synthesis of one of the key enzymes of folate metabolism — methylenetetrahydrofolate reductase.

There was no direct association between homocysteine and calcium in the group of children — carriers of the MTR:2756 G/G genotype, however, unlike other groups, there was a strong inverse association between homocysteine and parathyroid hormone.

Children with the MTHFR:677 T/T genotype should be identified as a risk group for destructive diseases of the skeletal system.

The findings can be used in the development of measures for the prevention and treatment of osteoporosis in children and adults living

under conditions of environmental distress caused by the nuclear power plant accident.

Key words: association, folate metabolism, homocysteine, calcium, parathyroid hormone, genetic polymorphisms, radiation-contaminated areas.

Introduction. Folate metabolism is one of the main metabolic cycles of the human body. One of the indicators of its functioning is the blood level of homocysteine, a sulphur-containing amino acid, a product of methionine metabolism [1]. Epidemiological cohort studies have shown a strong direct association between serum homocysteine concentrations and frequency of bone fractures due to osteoporosis [2].

Given that hyperhomocysteinemia has been found in more than 75.0% of children living in districts adjacent to the Chernobyl exclusion zone [3], it is reasonable to study calcium metabolism in them.

The purpose of this study was to identify the association between blood levels of homocysteine and ionized calcium, as well as parathyroid hormone, taking into account folate metabolism genotypes in children living in districts affected by the Chernobyl nuclear power plant accident.

Material and methods. The study was conducted within the implementation of projects of the European Commission in Ukraine “Health and Ecological Programmes around the Chernobyl Exclusion Zone: Development, Training and Coordination of Health-Related Projects” and the Rhône-Alpes Regional Council (France).

158 children from Polesky district of Kiev region underwent laboratory examination. According to data of dosimetry certification of settlements, the territory of the district has remained contaminated with radioactive substances after the Chernobyl accident until the present day (having the ^{137}Cs soil contamination density of 0.17 up to 1.9 Cu/km^2) [4].

The examined children’s average age was 14.8 ± 0.1 years (95% CI 14.7–15.0 years). All the children who attended school had blood drawn from the ulnar vein after fasting in the morning.

The blood samples were analysed at a laboratory certified under quality standards with the agreement of the parents. Thus, we assessed blood levels of homocysteine (H_c), ionized calcium (Ca), parathyroid hormone (PTH) and the state of the genetic system of folate metabolism (FM).

Plasma homocysteine concentrations were measured using a chemiluminescent immunoassay method (CLIA). Analyser and test kit: Architect 1000 (ABBOT Diagnostics (USA)). Plasma homocysteine levels in the children of over 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ were defined as hyperhomocysteinemia.

Ca levels were measured using an ion-selective method. Analyser and test kit: AVL 9180; Roche Diagnostics (Switzerland). The reference values were 1.16–1.32 mmol/L.

PTH concentrations were determined using an electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA) method. Analyser and test kit: Cobas 6000; Roche Diagnostics (Switzerland). The reference values were 15.0–65.0 pg/mL.

The following allelic variants were identified during genetic analysis of FM: C677T and A1298C of the MTHFR gene (synthesis of the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme), A2756G of the MTR gene (synthesis of the B₁₂-dependent methionine synthase enzyme) and A66G of the MTRR gene (synthesis of the methionine synthase reductase enzyme). A real-time PCR method was used. Analyser and test kit: DT-96 detecting thermocycler, DNA-Technology (Russia).

During the study, we formed groups of children with a certain genotype of the FM polymorphisms under study (Table 1). We also determined statistical differences for blood H_c, PTH and Ca values between the groups. Associations were identified between H_c and Ca, H_c and PTH, PTH and Ca values in each group.

Table 1

Groups of children with a certain FM polymorphism genotype.

Group No.	Genotype	Group No.	Genotype
1	MTR:2756 A/A	8	MTHFR:677 C/T
2	MTR:2756 A/G	9	MTHFR:677 T/T
3	MTR:2756 G/G	10	MTHFR:677 C/T+MTHFR:677 T/T
4	MTHFR:1298 A/A	11	MTRR:66 A/A
5	MTHFR:1298 A/C	12	MTRR:66 A/G
6	MTHFR:1298 C/C	13	MTRR:66 G/G
7	MTHFR:677 C/C	14	Total

The statistical processing of the results obtained was performed using the IBM SPSS Statistics 22 software (USA). The arithmetic mean (M), standard error of mean (m), confidence interval for the mean value (95% CI), median (Me), interquartile range (IR), minimum and maximum parameter values and percentiles were calculated for the variables analysed. The distribution hypothesis was tested (a Kolmogorov-Smirnov test). All the parameters under study did not conform to the normal distribution law, thus, a non-parametric Mann-Whitney U test was used

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

to compare values. The statistical significance of variables was assessed by determining a significance level for p with the help of the statistical software programme.

The Student's t -test was used to compare relative values. The critical level of significance for the null hypothesis (p) was set at 0.05. Associations between blood Hc and Ca levels within the groups under study were identified with the help of the Spearman's rank correlation coefficient (r_{xy}).

The strength of the association was assessed according to a typical scale: weak — 0 to 0.299; moderate — 0.3 to 0.699; strong — 0.7 to 1.0.

Results and discussion. The highest H_c levels were reported in the group of children 9 — a homozygous version of carriership of the T allele of the MTHFR:677 polymorphism (Table 2).

Table 2

Statistical characteristics of the blood Hc, PTH and ionized Ca values of the children examined.

Group No.	H _c , μmol/L		PTH, pg/mL		Ca, mmol/L	
	Me	IR	Me	IR	Me	IR
1	10.26	8.39–13.56	35.00	26.03–44.40	1.26	1.22–1.31
2	9.37	7.75–10.95	34.20	28.60–41.90	1.24	1.21–1.30
3	11.13	10.17–12.32	35.60	30.65–48.80	1.24	1.21–1.31
4	10.14	7.99–13.04	34.85	29.18–42.15	1.26	1.21–1.30
5	10.19	9.01–13.19	35.00	25.18–44.40	1.26	1.22–1.31
6	10.31	7.99–12.69	36.40	24.75–45.93	1.24	1.21–1.28
7	9.44	7.93–11.16	34.30	28.40–41.80	1.24	1.21–1.31
8	10.24	8.42–13.18	35.60	28.73–45.60	1.26	1.21–1.30
9	14.47	10.15–22.78	31.20	24.60–36.10	1.26	1.24–1.29
10	10.91	8.99–14.31	35.20	28.00–45.30	1.26	1.22–1.30
11	9.26	8.03–13.13	36.10	29.33–50.78	1.26	1.22–1.31
12	10.08	7.98–11.99	35.90	29.50–44.95	1.26	1.22–1.30
13	10.81	9.13–14.18	30.75	24.56–37.50	1.24	1.21–1.29
14	10.17	8.30–13.10	35.00	28.20–43.58	1.26	1.21–1.30

Statistically significant differences were reported between values in the group 9 (MTHFR:677 T/T) and values in the groups 1, 2, 4–8, 10–13 (Table 3). No statistically significant differences were observed

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

when comparing H_c levels in the group 9 (MTHFR:677 T/T) and No. 3 (MTR:2756 G/G).

No statistically significant differences were found when comparing PTH and Ca levels in the group 9 and other groups (Table 3).

Direct associations between H_c and Ca values were present in all the groups, except the groups 3, 5, 6 and 7. The strongest association was observed in the group 9 (Table 4).

Table 3

Results of statistically significant differences when comparing blood H_c values of examined children.

Comparison groups	Comparison group size	Average rank	Mann–Whitney U test value, significance level, p
1	104	58.30	U=603.00; p=0.007
9	19	82.26	
2	45	27.29	U=193.00; p=0.001
9	19	44.84	
3	9	11.06	U=54.50; p=0.127
9	19	16.13	
4	82	46.82	U=436.50; p=0.003
9	19	69.03	
5	60	36.02	U=331.00; p=0.006
9	19	52.58	
6	16	13.69	U=83.00; p=0.022
9	19	21.63	
7	79	44.30	U=340.00; p=0.0001
9	19	71.11	
8	60	36.00	U=330.00; p=0.006
9	19	52.63	
10	79	46.46	U=510.50; p=0.031
9	19	62.13	
11	32	21.42	U=157.50; p=0.004
9	19	33.71	
12	72	41.43	U=335.00; p=0.001
9	19	63.32	
13	54	33.76	U=338.00; p=0.028
9	19	46.21	

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

There was no association between PTH and Ca values in all the groups under study.

A strong inverse association was found between H_c and PTH values in the group 3. There was no such association in other groups (Table 4).

The highest blood H_c levels were reported and the strongest direct association between H_c and Ca values was found in the group of children — carriers of the MTHFR:677 T/T genotype.

The presence of the T allele of the mentioned genotype predetermined a direct association between H_c and Ca (Table 4) in most groups (Table 5).

There was no association between H_c and Ca in the group 5 (MTHFR:1298 A/C genotype, with carriership of the T allele in less than 50 % of cases).

Despite the carriership of the T allele of the MTHFR:677 polymorphism in 55.56 % of cases (Table 5), there is a genetic block for the conversion of H_c into methionine at the B_{12} -dependent methionine synthase enzyme level in the form of the MTR:2756 G mutation (G/G genotype) in all the children from the group 3. In this situation, there was no direct association between H_c and Ca, but there was a strong inverse association between H_c and PTH.

Table 4

Results of correlation analysis between H_c and Ca, H_c and PTH values in groups of children with different genetic polymorphisms.

Group No.	Parameter	Correlation coefficient	Parameters	
			Ca, mmol/L	PTH, pg/mL
1	H_c $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.319**	0.025
		Sign. (2-tailed), p	0.001	0.800
		N	104	104
2	H_c $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.362*	-0.048
		Sign. (2-tailed), p	0.014	0.755
		N	45	45
3	H_c $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.201	-0.767*
		Sign. (2-tailed), p	0.604	0.016
		N	9	9
4	H_c $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.462**	-0.020
		Sign. (2-tailed), p	0.0001	0.858
		N	82	82
5	H_c $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.216	0.126
		Sign. (2-tailed), p	0.097	0.338
		N	60	60

Table 4 continuation

Group No.	Parameter	Correlation coefficient	Parameters	
			Ca, mmol/L	PTH, pg/mL
6	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	-0.192	-0.389
		Sign. (2-tailed), p	0.476	0.137
		N	16	16
7	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.169	-0.099
		Sign. (2-tailed), p	0.136	0.386
		N	79	79
8	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.399**	0.073
		Sign. (2-tailed), p	0.002	0.580
		N	60	60
9	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.619**	0.326
		Sign. (2-tailed), p	0.005	0.173
		N	19	19
10	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.450**	0.070
		Sign. (2-tailed), p	0.0001	0.538
		N	79	79
11	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.403*	0.123
		Sign. (2-tailed), p	0.022	0.502
		N	32	32
12	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.319**	0.074
		Sign. (2-tailed), p	0.006	0.537
		N	72	72
13	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.276*	-0.067
		Sign. (2-tailed), p	0.044	0.633
		N	54	54
14	Hc $\mu\text{mol/L}$	Spearman's	0.314**	0.013
		Sign. (2-tailed), p	0.0001	0.869
		N	158	158

Note. * — Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). ** — Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Thus, the carriership of the T risk allele of the MTHFR:677 genetic polymorphism, especially the homozygous version, contributes to the increase in blood H_c levels, and consequently in ionized Ca levels. In this regard, and taking into account that hyperhomocysteinemia is associated

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

with osteoporosis in adults [5, 6], it can be stated that there are initial stages of development of destructive processes in bone tissues in children with increased blood H_c levels.

H_c can be presented as an indicator of osteoporosis associated with a deficiency of vitamins B_6 , B_9 , B_{12} and trace elements [7]. Under the conditions of suppression of PTH production by H_c , Ca is intensively excreted in urine, and therefore its concentration in the blood may be within the reference values.

The findings show that H_c affects calcium metabolism in the body of children living in districts affected by the Chernobyl nuclear power plant accident.

Table 5

Proportion of cases of carriership of T allele of MTHFR: C677T polymorphism in genetic groups of children.

Group No.	Genotype	Number of cases in a group	Number of cases of carriership of T allele of MTHFR: C677T polymorphism	
			Absolute number	%
1	MTR:2756 A/A	104	50	48.08
2	MTR:2756 A/G	45	24	53.33
3	MTR:2756 G/G	9	5	55.56
4	MTHFR:1298 A/A	82	54	65.85
5	MTHFR:1298 A/C	60	25	41.67
6	MTHFR:1298 C/C	16	0	0
7	MTHFR:677 C/C	79	0	0
8	MTHFR:677 C/T	60	60	100
9	MTHFR:677 T/T	19	19	100
10	MTHFR:677 C/T + MTHFR:677 T/T	79	79	100
11	MTRR:66 A/A	32	14	43.75
12	MTRR:66 A/G	72	37	51.39
13	MTRR:66 G/G	54	28	51.85
14	Total	158	79	50.0

Conclusions. A direct association was reported between blood homocysteine and ionized calcium levels in the group of children living in affected areas 30 years after the accident at the Chernobyl nuclear

power plant. At the same time, there was no association between ionized calcium and parathyroid hormone concentrations.

This effect is associated with the carriership of the T allele of the MTHFR:677 genetic polymorphism responsible for the synthesis of one of the key enzymes of folate metabolism — methylenetetrahydrofolate reductase.

There was no direct association between H_c and Ca in the group of children — carriers of the MTR:2756 G/G genotype, however, unlike other groups, there was a strong inverse association between H_c and PTH.

Children with the MTHFR:677 T/T genotype should be identified as a risk group for destructive diseases of the skeletal system.

The findings can be used in the development of measures for the prevention and treatment of osteoporosis in children and adults living under conditions of environmental distress caused by the nuclear power plant accident.

REFERENCES

1. Кох Н. В. Фолатный цикл: обзор и практические рекомендации по интерпретации генетических тестов / Н. В. Кох, А. А. Слепущина, Г. И. Лифшиц // Медицинская генетика. — 2015. — № 11. — С. 3–8.
2. Fratoni V. B Vitamins, Homocysteine and Bone Health / V. Fratoni and M. L. Brandi // Nutrients. — 2015. — № 7(4). — P. 2176–2192.
3. Бандажевский Ю. И. Генетические дефекты при нарушении функционирования цикла фолиевой кислоты у детей, проживающих на территории, пострадавшей от аварии на ЧАЭС / Ю. И. Бандажевский, Н. Ф. Дубовая // Збірник наук. праць співроб. НМАПО імені П. Л. Шупика. — 2016. — Вип. 25. — С. 93–98.
4. Загальнодозиметрична паспортизація та результати ЛВЛ-моніторингу в населених пунктах України, які зазнали радіоактивного забруднення після Чорнобильської катастрофи. Дані за 2011 р. Збірка 14. — К.: МОЗ України, НАМНУ України, МНС України, ДАЗВ, ДУ “ННЦРМ НАМН України”, НД ІРЗ АТН України, 2012. — 99 с.
5. McLean R. R. Homocysteine as a predictive factor for hipfracture in older persons / R. R. McLean, P. F. Jacques, J. Selhub et al. // Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 350. — № 20. — P. 2042–2049.
6. Salari P. Association of hyperhomocysteinemia with osteoporosis: a systematic review / P. Salari, B. Larijani and M. Abdollahi // Therapy. — 2008. — Vol. 5. — № 2. — P. 215–222.
7. Herrmann M. Homocysteine a newly recognised risk factor for osteoporosis / M. Herrmann, T. Widmann T, W. Herrmann // Clin. Chem. Lab. Med. — 2005. — Vol. 43. — № 10. — P. 1111–1117.

Стан фолатного циклу та обмін кальцію у дітей, які проживають в районах, постраждалих від аварії на Чорнобильській атомній електростанції

Ю. І. Бандажевський, Н. Ф. Дубова

Координаційний аналітичний центр «Екологія і здоров'я»,
смт. Іванків,

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П. Л. Шупика МОЗ України, м. Київ

Вступ. Гомоцистеїн відображає стан фолатного циклу. У той же час визначено його зв'язок з остеопорозом. З огляду на те, що стан гіпергомоцистеїнемії був виявлений більше, ніж у 75,0% дітей, які проживають в районах, прилеглих до Чорнобильської зони відчуження, доцільним є дослідження у них обміну кальцію.

Метою роботи було визначення у дітей, які проживають в районах, постраждалих від аварії на Чорнобильській атомній електростанції, кореляційної залежності між показниками вмісту гомоцистеїну, паратиреоїдного гормону й іонізованого кальцію у крові з урахуванням генотипів фолатного циклу.

Методи дослідження. Імунохімічний, математико-статистичний.

Результати. У групі дітей, які проживають на постраждалій території через 30 років після аварії на Чорнобильській атомній електростанції, реєструвався прямий кореляційний зв'язок між рівнями гомоцистеїну і іонізованого кальцію в крові. При цьому, кореляційний зв'язок між іонізованим кальцієм і паратиреоїдним гормоном був відсутній.

Даний ефект пов'язаний з носійством алелі Т генетичного поліморфізму MTHFR:677, відповідального за синтез одного з основних ферментів фолатного циклу — метілентетрогідрофолатредуктази.

У групі дітей-носіїв генотипу G/G2756 MTR прямий кореляційний зв'язок між гомоцистеїном і кальцієм був відсутній, однак був присутній, на відміну від інших груп, сильний зворотний зв'язок між гомоцистеїном і паратиреоїдним гормоном.

Діти, що мають генотип T/TMTHFR:677, повинні бути віднесені до групи ризику деструктивних захворювань кісткової системи.

Отримані результати можуть бути використані при розробці заходів профілактики і лікування остеопорозу у дітей і дорослих, які проживають в умовах екологічного неблагополуччя, обумовленого аварією на атомній електростанції.

Ключові слова: кореляційний зв'язок, фолатний цикл, гомоцистеїн, кальцій, паратиреоїдний гормон, генетичні поліморфізми, радіоактивно забруднена територія.

Состояние фолатного цикла и обмен кальция у детей, проживающих в районах, пострадавших от аварии на Чернобыльской атомной электростанции

Ю. И. Бандажевский, Н. Ф. Дубова

**Координационный аналитический центр «Экология и здоровье», пгт. Иванков,
Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика МЗ Украины, г. Киев**

Вступление. Гомоцистеин отражает состояние фолатного цикла. В тоже время определена его связь с остеопорозом. Учитывая то, что состояние гипергомоцистеинемии было выявлено более, чем у 75,0% детей, проживающих в районах, прилежащих к Чернобыльской зоне отчуждения, целесообразным, является исследование у них обмена кальция.

Целью работы явилось определение у детей, проживающих в районах, пострадавших от аварии на Чернобыльской атомной электростанции, корреляционной зависимости между показателями содержания гомоцистеина, паратиреоидного гормона и ионизированного кальция в крови, с учетом генотипов фолатного цикла.

Методы исследования. Иммунохимический, математико-статистический.

Результаты. В группе детей, проживающих на пострадавшей территории спустя 30 лет после аварии на Чернобыльской атомной электростанции, регистрировалась прямая корреляционная связь между уровнями гомоцистеина и ионизированного кальция в крови. При этом, корреляционная связь между ионизированным кальцием и паратиреоидным гормоном отсутствовала.

Данный эффект связан с носительством аллели Т генетического полиморфизма MTHFR:677, ответственного за синтез одного из основных ферментов фолатного цикла — метилентетрагидрофолатредуктазы.

В группе детей-носителей генотипа G/G2756 MTR прямая корреляционная связь между гомоцистеином и кальцием отсутствовала, однако присутствовала, в отличие от других групп, сильная обратная связь между гомоцистеином и паратиреоидным гормоном.

Дети, имеющие генотип Т/TMTHFR:677, должны быть отнесены в группу риска деструктивных заболеваний костной системы.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке мер профилактики и лечения остеопороза у детей и взрослых, проживающих в условиях экологического неблагополучия, обусловленного аварией на атомной электростанции.

Ключевые слова: корреляционная связь, фолатный цикл, гомоцистеин, кальций, паратиреоидный гормон, генетические полиморфизмы, радиоактивно загрязненная территория.

Відомості про авторів:

Бандажевський Юрій Іванович — доктор медичних наук, професор, Голова правління ПУ «Координаційний аналітичний центр «Екологія і здоров'я». Адреса: смт. Іванків, вул. Поліська, 65.

Дубова Наталія Федорівна — кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри громадського здоров'я Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 205-49-92.

УДК: 616.33

ЧАСТОТА ТА ФАКТОРИ РИЗИКУ ВИНИКНЕННЯ ПОСТОПЕРАЦІЙНИХ СТРЕСОВИХ ВИРАЗОК У ДІТЕЙ

А. В. Біляєв, Ю. А. Іскра

**Національна медична академія післядипломної освіти
імені П. Л. Шупика, м. Київ**

Вступ. Нині в Україні немає регламентованого протоколу профілактики виникнення стрес-індукованих змін (СІЗ) слизової оболонки верхнього відділу шлунково-кишкового тракту (ШКТ), але дана проблема наявна і виходячи з патогенезу — основним завданням її вирішення є ліквідація фізіологічного стресу і відновлення нормальної гемоциркуляції та гемоперфузії тканин.

Мета дослідження. Аналіз кореляції частоти виникнення СІЗ в постопераційному періоді від інтраопераційної динаміки периферичного кровообігу (система NIRS), ступеня кислотності шлункового соку та травматичності оперативного втручання, що потенційно має призвести до покращення результатів анестезіологічного забезпечення та оперативних втручань у дітей.

Матеріали і методи дослідження. Для визначення частоти СІЗ дітям з хірургічною патологією в передопераційному періоді та через 3 доби після операції виконували фіброезофагодуоденоскопію (ФЕГДС) в поєднанні з реєстрацією кислотності внутрішньошлунко-