

З.І. Россоха^{1,2}, С.П. Кир'яченко^{1,2}, Н.Г. Горovenko^{2,3}¹ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», Київ²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ³Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ

Роль міжгенної взаємодії *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* у розвитку порушень фолатного обміну у пацієнток із репродуктивними розладами

Мета — визначення ролі міжгенної взаємодії *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* у розвитку порушень фолатного обміну у пацієнток із репродуктивними розладами. **Об'єкт і методи дослідження.** У 185 пацієнток із репродуктивними розладами проведено молекулярно-генетичні дослідження генів: *MTHFR* (C677T, rs1801133; A1298C, rs1801131), *MTRR* (A66G, rs1801394), *MTR1* (A2756G, rs1805087) — та біохімічних показників фолатного обміну. **Результати.** Гіпергомоцистеїнемія (аутосомно-рецесивне спадкове метаболічне захворювання), пов'язана з мутаціями в генах фолатного обміну, виявлена у 20% жінок із репродуктивними розладами. Рівень гомоцистеїну достовірно був підвищеним у пацієнток з генотипом 677TT за геном *MTHFR* та його поєднаннями з генотипами 1298AA, 66AA, 66GG та 2756GG за генами *MTHFR*, *MTRR* та *MTR1*, при цьому рівні фолієвої кислоти та вітаміну B₁₂ були зниженими. Достовірною моделлю ризику гіпергомоцистеїнемії була чотирилокусна, із залученням генів *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*. Ризик розвитку гіпергомоцистеїнемії достовірно підвищувався за наявності комбінації генотипів: 677TT/1298AA/66GG, 1298AC/2756AG/66AG та знижувався при комбінації 677CC/1298AC/2756AA. Виявлені відмінності у показниках фолатного обміну потребують подальшого аналізу ген — факторних взаємодій з урахуванням застосування вітаміно-натуральних препаратів.

Ключові слова: генетичний поліморфізм, гіпергомоцистеїнемія, репродуктивні розлади.

Вступ

Проблемі виявлення та запобігання помірній гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ), клінічного прояву порушень фолатного обміну в осіб репродуктивного віку присвячено чимало робіт, у яких розглядали численні патогенетичні механізми її впливу як безпосередньо на судинну стінку та ендотеліальну дисфункцію, так і на тромбофілічні розлади спадкового або набутого генезу (Fermo I., 1995; Dahlback B., 2008; Moll S., 2015; Sørensen J.T., 2016; Stevens S.M., 2016). Тестування поліморфізму гена *MTHFR* та визначення рівня гомоцистеїну (ГЦ) запропоновано проводити особам груп ризику розвитку тромбофілічних порушень у численних клінічних протоколах та настановах (Baglin T., 2010; Bates S.M., 2012; Stefano V.D., 2013; Россоха З.І., 2014; Levin B.L., 2016). Але пізніше, починаючи з 2013 р., у США з'явилися повідомлення про відсутність доведеного впливу поліморфізму гена *MTHFR* на розвиток тромбофілічних порушень та запропоновано вилучити генетичне тестування із клінічних протоколів (Hickey S.E., 2013; agurplab, 2016).

Відсутність доказового впливу *MTHFR* на ризик появи клінічних проявів спадкової тромбофілії та репродуктивних розладів, а також вилучення цих досліджень із клінічних протоколів дослідники пов'язують із наслідком довготривалої фортифікації продуктів харчування в окремих країнах Північної Америки та Європи і культури широкого застосування полівітамінних препаратів та нутрієнтів з профілактичною метою (Holmes M.V., 2011; Hickey S.E., 2013). Водночас в Україні відсутня програма фортифікації продуктів харчування, а прийом полівітамінних препаратів та нутрієнтів особами репродуктивного віку, у тому числі і в прекоцепційний період, є обмеженим. Однак відмічаються випадки профілактичного призначення невідповідно надто високих доз фолієвої кислоти (ФК) або неконтрольований прийом вітамінів та нутрієнтів (Rossokha Z.I., 2017). Провідним чинником у розвитку помірної ГГЦ тривалий час розглядали здебільшого поліморфізм гена *MTHFR* (C677T, rs1801133 та A1298C, rs1801131), при варіантах якого за рахунок зниження активності ферменту метилентетрагідрофолатредуктази недостатньо засвоюються фолати та ФК, що призводить до помірної ГГЦ — клінічного прояву порушень фолатного обміну (Liu F.,

2017). Це питання й досі залишається дискусійним, йому присвячують нові дослідження, і тому знову проводиться оцінка можливо-го зв'язку виникнення репродуктивних розладів (ранніх репродуктивних втрат і безпліддя) та поліморфізму гена *MTHFR*.

Зважаючи на стан проблеми, варто зазначити, що досі не було комплексних досліджень, які би враховували вплив міжгенної та ген — факторної взаємодії на розвиток помірної ГГЦ при репродуктивних розладах, хоча помірні ГГЦ та варіанти гена *MTHFR* в Україні оцінюються як несприятливий чинник (Гречаніна О.Я., 2010; Веропотвелян П.Н., 2011; Венцівська І.Б., 2015).

Мета — визначення ролі міжгенної взаємодії *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* у розвитку порушень фолатного обміну у пацієнток із репродуктивними розладами.

Об'єкт і методи дослідження

До дослідження залучено 185 пацієнток із репродуктивними розладами, направлених на медико-генетичне консультування та обстеження у зв'язку з підозрою на приховану спадкову тромбофілію (загальна група), з яких 127 мали ранні репродуктивні втрати (група I), а у 58 було первинне безпліддя невстановленого генезу тривалістю >5 років (група II).

Критеріями виключення з дослідження були виявлені у подружній парі: аномалії каріотипу, аномалії та вади розвитку статевих органів, хронічні інфекційні та статеві захворювання, соматична та злоякісна патологія, ожиріння, а також трубно-перитонеальне безпліддя у жінок.

У пацієнток, залучених у дослідження, проведено медико-генетичне консультування та анкетування, збір даних про спосіб життя та шкідливі звички. Усі пацієнтки надали інформовану згоду на участь у дослідженні. У всіх пацієнток виконано стандартні клініко-лабораторні обстеження за місцем надання медичної допомоги. Показники ГЦ в плазмі крові, ФК та ціанкобаламіну (вітаміну B₁₂) у сироватці крові визначали на момент звернення методом ECLIA (імунохімічний з електрохемилюмінесцентною детекцією) на автоматичному біохімічному аналізаторі «Cobas 6000» («Roche Diagnostics», Швейцарія). Референтні значення досліджуваних показників: ГЦ в плазмі крові — до 12 мкмоль/л,

ФК у сироватці крові — 4,6–18,7 нг/мл; B_{12} у сироватці крові — 197–771 пг/мл. Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів *MTHFR* (C677T, rs1801133; A1298C, rs1801131), *MTRR* (A66G, rs1801394), *MTR1* (A2756G, rs1805087) проводили за допомогою методів алейспецифічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПЛР з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Лабораторні показники представлено у вигляді арифметичних даних (середнє значення (M) \pm стандартна помилка середнього (SEM)), розрахованих із використанням програмного пакета «MS Excel» 2010 р. (ліцензійний номер K9366093I2016). Результати аналізу у всіх групах тестовано щодо оцінки нормальності статистичного розподілу показників з використанням тесту Колмогорова — Смирнова SPSS 17.0 («IBM SPSS Statistics 17 Free PC Software Full Version», США). Достовірними вважали відмінності при рівні значущості $<0,05$. Головні незалежні, а також спільні ефекти всіх проаналізованих генів, визначено із використанням статистичної програми мультифакторної просторової редукції (MDR) («GNU General Public License version 2.0», USA).

Результати та їх обговорення

Рівень ГЦ у плазмі крові є важливим клінічним маркером порушень фолатного обміну в медичній практиці. Незважаючи на деякі відмінності у методах його визначення та референтні значення, що надаються різними лабораторіями, у європейських консенсусах та настановах концентрація >12 мкмоль/л розглядається як ГЦ, а концентрація >10 мкмоль/л — як критична щодо зростання ризику розвитку ГЦ. Починаючи з концентрації ГЦ 10 мкмоль/л, підвищення ризику виникнення ГЦ відбувається за лінійною залежністю доза — реакція без певного порогового рівня. Додаткові фактори ризику (куріння, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, гіперліпідемія) адитивно або синергічно збільшують ризик ГЦ. Тому відповідно до робочих та консенсус-груп рекомендованим є цільовий рівень ГЦ у плазмі крові не вище 10 мкмоль/л (Stanger O., 2003; Devalia V., 2014; Wilcken B., 2016).

Залежно від зростання рівня ГЦ виділяють тяжку, помірну та легку форму, які розмежовуються за визначенням обраних референтних значень (<https://www.sciencedirect.com/hyperhomocysteinemia>). У Міжнародній класифікації хвороб 10-го перегляду (МКХ-10) з 2018 р. ГЦ, пов'язану з мутаціями в генах фолатного обміну, визнано аутосомно-рецесивним спадковим метаболічним захворюванням — код E72.1 (набула чинності з 01.10.2017 р. (<http://www.icd10data.com/E72.11>)). У класифікації МКХ-10 спадковому дефіциту метилентетрагідрофолатредуктази, що призводить до ГЦ, присвоєно код E72.12 (<https://www.healthline.com>). Досі однозначно не доведено, але й не спростовано вплив ГЦ та поліморфних варіантів генів фолатного обміну на зростання ризику репродуктивних розладів у клінічній практиці. Але для характеристики порушень фолатного обміну, окрім визначення рівня ГЦ, застосовують визначення показників ФК та B_{12} у сироватці крові, а також проводять молекулярно-генетичний аналіз поліморфних варіантів генів фолатного обміну *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*. Для з'ясування впливу фолат-опосередкованої міжгенної взаємодії в обстежених нами пацієнтів із репродуктивними розладами застосовано вищеперераховані критерії виключення відомих та доведених чинників ризику ГЦ (Stanger O., 2003; Россоха З.И., 2014; Devalia V., 2014). У порівняльній табл. 1 наведено вік, антропометричні показники, індекс маси тіла (ІМТ) та стан фолатного обміну в обстежених нами пацієнтів із репродуктивними розладами.

Таблиця 1. Вікові й антропометричні показники та особливості фолатного обміну у пацієнтів із репродуктивними розладами

Показник	Загальна група	Група I	Група II
Вік, років	33,30 \pm 0,43	32,95 \pm 0,55	34,05 \pm 0,66
Зріст, см	165,93 \pm 0,49	166,00 \pm 0,56	165,77 \pm 0,99
Маса тіла, кг	59,61 \pm 0,57	59,41 \pm 0,71	60,06 \pm 0,98
ІМТ, кг/м ²	21,46 \pm 0,16	21,33 \pm 0,16	21,78 \pm 0,33
ГЦ, мкмоль/л	9,26 \pm 0,33	9,68 \pm 0,46	8,32 \pm 0,33
ФК, нг/мл	13,36 \pm 0,61	12,73 \pm 0,76	14,59 \pm 1,05
B_{12} , пг/л	480,99 \pm 23,66	488,28 \pm 29,39	481,39 \pm 38,43

Як свідчать результати дослідження, показники групи I та II вірогідно не відрізнялися (див. табл. 1), хоча у пацієнтів групи II спостерігали тенденцію до зниження рівня ГЦ та підвищення вмісту ФК у сироватці крові порівняно з групою I. Частота геноти-

пів та їх комбінацій достовірно не різнилася у пацієнтів групи I та II ($p>0,05$). Тому порівняли показники фолатного обміну залежно від поліморфних варіантів генів у пацієнтів загальної групи (табл. 2).

Таблиця 2. Показники фолатного обміну залежно від поліморфізму генів *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*

Генотип генів	ГЦ, мкмоль/л	ФК, нг/мл	B_{12} , пг/мл
<i>MTHFR</i> (C677T)			
677CC	8,89 \pm 0,25	13,74 \pm 1,03	551,13 \pm 30,45
677CT	9,78 \pm 0,37	13,53 \pm 0,89	476,08 \pm 22,36
677TT	12,27 \pm 1,01	11,27 \pm 0,67	386,36 \pm 31,90
<i>MTHFR</i> (A1298C)			
1298AA	9,74 \pm 0,61	14,40 \pm 1,23	501,95 \pm 34,49
1298AC	9,17 \pm 0,55	12,91 \pm 0,80	477,19 \pm 35,54
1298CC	8,63 \pm 0,32	12,38 \pm 1,25	465,20 \pm 32,01
<i>MTRR</i> (A66G)			
66AA	9,98 \pm 0,78	11,73 \pm 1,67	543,55 \pm 43,38
66AG	9,37 \pm 0,57	13,73 \pm 0,85	455,21 \pm 35,97
66GG	8,75 \pm 0,43	13,86 \pm 0,99	475,64 \pm 41,90
<i>MTR1</i> (A2756G)			
2756AA	8,28 \pm 0,32	13,96 \pm 0,85	525,57 \pm 43,35
2756AG	9,46 \pm 0,25	12,65 \pm 0,90	462,45 \pm 29,85
2756GG	10,37 \pm 0,36	11,32 \pm 2,19	438,36 \pm 25,27

Рівень ГЦ достовірно зростав у пацієнтів з генотипом 677TT (12,27 \pm 1,01) порівняно з пацієнтами з генотипами 677CT (9,78 \pm 0,37) та 677CC (8,89 \pm 0,25). У пацієнтів з генотипом 677TT та репродуктивними розладами відмічали достовірне зниження рівня ФК (11,27 \pm 0,67) та B_{12} (386,36 \pm 31,90) порівняно з генотипами 677CT (13,53 \pm 0,89 та 476,08 \pm 22,36) та 677CC (13,74 \pm 1,03 та 551,13 \pm 30,45). Подібні особливості порушень фолатного обміну раніше виявлено нами при обстеженні дітей з когнітивними розладами, у яких значуще підвищення рівня ГЦ також спостерігалося при генотипі 677TT порівняно з іншими пацієнтами та дітьми контрольної групи. Особливої уваги заслуговує те, що у контрольній групі дітей не виявлено жодного випадку ГЦ за наявності генотипу 677TT (Горovenko Н.Г., 2010). Таку особливість порушень фолатного обміну, як поєднання генотипу 677TT з ГЦ, виявлено при інших патологічних станах (Garakanidze S., 2018).

Процес реметилування ГЦ залежить від генетично детермінованої активності ферментів. При реметилуванні ГЦ у метіонін беруть участь ферменти *MTHFR* та *MTR1*, активність яких визначається генетичним поліморфізмом. Для цієї реакції необхідний 5-метилтетрагідрофолат як донор метилу, а вітамін B_{12} служить «носієм» метильної групи. Дефіцит вітаміну B_{12} призводить до «фолатної пастки» та внутрішньоклітинного накопичення відновлених фолатів й підвищення рівнів ГЦ у плазмі крові та може бути додатково посилений генетичним поліморфізмом *MTR1* 2756A→G (Feix A., 2001). Для осіб з генотипом 2756GG за геном *MTR1* описано зростання активності ферменту метіонінсинтази та прискорення процесів реметилування B_{12} у процесах фолатного обміну, і відповідно підвищена потреба у вітаміні B_{12} (<http://www.omim.org/entry/156570>). В обстежених нами пацієнтів рівень ГЦ був також достовірно найвищим (але в межах референтних значень) за наявності генотипу 2756GG за геном *MTR1* порівняно з генотипом 2756AG, при цьому також виявлене зниження рівня ФК та B_{12} .

На наступному етапі оцінено вплив на стан фолатного обміну комбінацій за двома алейними варіантами C677T та A1298C гена *MTHFR* (табл. 3). За результатами нашого дослідження серед обстежених пацієнтів не виявлено комбінацій таких алейних варіантів гена *MTHFR*: 677TT/1298AC, 677TT/1298CC та 677CT/1298CC. В окремих роботах доведено, що з перерахованими комбінаціями поліморфних варіантів діти взагалі не народжуються, а гинуть антенатально (Isotalo P.A., 2000; Fodinger M., 2001; Zetterberg H., 2002; Bae J., 2007). Ми виявили значуще підвищення ГЦ, зниження ФК та B_{12} у пацієнтів із комбінацією генотипів 677TT/1298AA порівняно з генотипами 677CT/1298AC та 677CC/1298AC. За наявності комбінації генотипів 677CC/1298CC відмічався знижений рівень ГЦ порівняно з генотипом 677TT/1298AA (див. табл. 3). Отже, ГЦ у пацієнтів з репродуктивними розладами значуще переважала за наявності комбінації генотипів 677TT/1298AA, але при цьому показники ФК та B_{12} були в межах референтних значень, але достовірно нижчими порівняно з особами з іншими комбінаціями за алейними варіантами гена *MTHFR*. Подібну асоціацію генотипів 677TT/1298AA з підвищенням рівня ГЦ також виявлено у хворих на гемодіалізі

(Fodinger M., 2001) та донорів крові після нічного голодування (Zappacosta B., 2014).

Таблиця 3. Показники фолатного обміну залежно від комбінації алельних варіантів 677CC>T/1298A>C гена *MTHFR*

Поліморфні варіанти гена <i>MTHFR</i>	ГЦ, мкмоль/л	ФК, нг/мл	V_{12} , пг/мл
677CC/1298AA	9,11±0,74	14,88±1,63	501,19±61,39
677CC/1298AC	8,50±0,38	13,65±1,20	491,86±36,08
677CC/1298CC	8,97±0,56	12,39±1,25	477,20±71,77
677CT/1298AA	8,53±0,53	13,89±1,89	472,68±42,41
677CT/1298AC	8,36±0,41	12,78±1,05	478,96±35,73
677TT/1298AA	11,79±1,63	10,25±0,74	386,36±28,90

Показники рівня ГЦ були також найвищими у нашому дослідженні за наявності комбінацій генотипів 2756AA/66AA (10,33±1,08) та 2756GG/66GG (10,90±1,96) генів *MTR1* та *MTRR*, але в межах референтних значень (табл. 4).

Таблиця 4. Показники фолатного обміну залежно від комбінацій поліморфних варіантів генів *MTRR* та *MTR1*

Поліморфні варіанти генів <i>MTR1/MTRR</i>	ГЦ, мкмоль/л	ФК, нг/мл	V_{12} , пг/мл
2756AA/66AA	10,33±1,08	11,96±2,51	471,67±70,80
2756AG/66AA	9,76±1,20	11,50±1,89	550,28±60,69
2756GG/66AA	7,84±0,60	13,29±3,96	611,0±97,0
2756AA/66AG	9,47±0,84	15,06±1,6	423,73±51,11
2756AG/66AG	9,27±0,51	12,68±1,20	576,88±44,18
2756GG/66AG	9,39±1,80	9,41±2,56	669,8±77,9
2756AA/66GG	8,74±0,48	13,23±1,11	383,30±36,89
2756AG/66GG	8,05±0,47	14,66±2,03	566,97±62,08
2756GG/66GG	10,90±1,96	13,33±2,74	577,15±85,55

Пацієнтки з комбінацією генотипів 2756AA/66AA та 2756GG/66GG мали критичне, відповідно до консенсусу, зростання рівня ГЦ порівняно з іншими варіантами комбінацій генотипів за генами *MTRR* та *MTR1*. При цьому рівень V_{12} був достовірно найвищим за наявності генотипу 2756GG/66AA порівняно з генотипами 2756AA/66AA та 2756AG/66AA. Подібне накопичення V_{12} може бути пов'язане з тим, що носії генотипу 2756GG за геном *MTR1* потребують вищих доз V_{12} у зв'язку з підвищеною активністю ферменту *MTR1* (<http://www.holisticacare.com/mtrr-and-vitamin-b12>).

Для показника V_{12} виявлено достовірні відмінності, за яких найвищий рівень зафіксовано у пацієнток з комбінаціями генотипів 2756GG/66AG та 2756GG/66GG порівняно з 2756AA/66AG, 2756AG/66AG і 2756AA/66GG, 2756AG/66GG відповідно. Найнижчий рівень V_{12} був за наявності комбінації генотипів 2756AA/66GG — 383,30±36,89. Також достовірну різницю за показником ФК виявлено між пацієнтками з комбінацією генотипів 2756AA/66AG (15,06±2,6) і 2756GG/66AG (9,41±1,12) та 2756AG/66AG (12,68±1,20) і 2756GG/66AG (9,41±1,12), що може бути зумовлено як особливостями витрат при метаболічних фолатзалежних процесах, так і надходженням ФК та V_{12} з продуктами та вітамінними препаратами.

Як видно з табл. 5, виявлено достовірне зростання ГЦ у пацієнток із комбінацією генотипів 677TT/66AA на відміну від комбінацій генотипів 677CC/66AA та 677CT/66AA. Такі самі достовірності відмінності ($p<0,05$) відмічено для рівня ФК, який був найнижчим за комбінації генотипів 677TT/66AA. Показник V_{12} у пацієнток був достовірно найвищим ($p<0,05$) за наявності комбінації генотипів 677TT/66AA порівняно з 677CC/66AA та 677CT/66AA. На відміну від представлених нами даних щодо впливу комбінацій генотипу 677TT на зростання показників ГЦ, за наявності комбінації 677CC/66AG показник ГЦ, навпаки, був достовірно вищим, але в межах референтних значень, порівняно з 677TT/66AG, при цьому для комбінації генотипів 677TT/66GG виявлено достовірне зростання понад референтне значення.

Отже, за наявності у пацієнток гетерозиготного варіанта 66AG в комбінації з 677TT рівень ГЦ, навпаки, знижувався (8,25±0,78). Рівень V_{12} достовірно відрізнявся за різних поєднань гетерозиготного варіанта 66AG залежно від поліморфізму С677Т. Найвищим показник V_{12} був у пацієнток з комбінацією генотипів 677CC/66AG (479,11±44,01) порівняно з комбінацією генотипів 677TT/66AG (372,25±24,63) та 677CT/66AG (475,75±43,35). За поєднань із гомозиготним варіантом 66GG достовірний вплив на зростання ГЦ мала комбінація 677TT/66GG. І, відповідно, за комбінації генотипів 677TT/66GG рівень ФК був достовірно найнижчим ($p<0,05$) порівняно з комбінаціями генотипів 677CT/66GG та 677CC/66GG. По-

казник V_{12} достовірно відрізнявся за наявності комбінацій генотипів 677CC/66GG (505,90±64,34) та 677TT/66GG (410,12±56,64).

Таблиця 5. Показники фолатного обміну залежно від комбінацій поліморфних варіантів за генами *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*

Поліморфні варіанти	ГЦ, мкмоль/л	ФК, нг/мл	V_{12} , пг/мл
<i>MTHFR/MTRR</i>			
677CC/66AA	9,12±0,54	11,07±1,74	508,66±51,17
677CT/66AA	9,50±0,93	14,01±2,69	609,25±68,54
677TT/66AA	17,80±7,36	7,25±1,67	619,23±70,15
677CC/66AG	9,82±0,80	14,24±1,46	479,11±44,01
677CT/66AG	9,26±0,89	13,28±1,15	475,75±43,35
677TT/66AG	8,25±0,78	13,19±1,10	372,25±24,63
677CC/66GG	8,23±0,40	14,45±1,12	505,90±64,34
677CT/66GG	8,16±0,50	14,21±1,27	474,47±71,22
677TT/66GG	12,45±1,24	11,13±0,89	410,12±56,64
<i>MTHFR/MTR1</i>			
677CC/2756AA	8,95±0,71	13,82±1,8	446,02±46,28
677CT/2756AA	9,27±0,48	14,55±1,44	482,24±43,13
677TT/2756AA	11,47±2,13	12,40±1,40	491,98±47,55
677CC/2756AG	8,60±0,58	13,24±1,39	609,67±53,74
677CT/2756AG	8,84±0,67	13,03±1,35	544,57±61,11
677TT/2756AG	10,76±1,24	8,17±1,84	285,17±37,98
677CC/2756GG	8,17±1,05	12,97±2,99	550,45±54,64
677CT/2756GG	10,40±1,97	8,05±2,30	305,60±0,00
677TT/2756GG	19,50±0,00	5,28±0,00	257±21,50

Рівень ГЦ був достовірно підвищеним за комбінації генотипів 677TT/2756AA (11,47±2,13) порівняно з комбінаціями генотипів 677CC/2756AA (8,95±0,71) та 677CT/2756AA (9,27±0,48). Рівень ФК був найнижчим у пацієнток з комбінацією генотипів 677TT/2756AA порівняно з 677CC/2756AA та 677CT/2756AA. У пацієнток з варіантом 2756AG рівень ГЦ був достовірно вищим при поєднанні з 677TT (див. табл. 5). Найвищий показник ГЦ був у пацієнток з комбінацією генотипів 677TT/2756GG порівняно з усіма іншими варіантами комбінацій генотипів. У пацієнток з цією комбінацією генотипів найнижчими були показники ФК та V_{12} . Отже, з усіх перерахованих у табл. 5 комбінацій генетичних варіантів найбільш несприятливою була комбінація генотипів 677TT/2756GG. Виявлені відмінності у показниках фолатного обміну залежно від різних комбінацій генотипів, на нашу думку, зумовлені не тільки генетичним поліморфізмом, але й особливостями харчування пацієнтів та прийому вітамінно-нутриєнтних препаратів і потребують подальших детальних досліджень. При розрахунку нами генетичного ризику репродуктивних розладів, зумовлених поліморфізмом генів *MTHFR*, *MTR1*, *MTRR*, з'ясовано необхідність детального аналізу *MTR1* та *MTRR*, враховуючи кофактори фолатного обміну (Россоха З.І., 2018).

Зростання рівня ГЦ >12 мкмоль/л (ГЦ) виявлено у 37 зі 185 обстежених пацієнток загальної групи (20%), тобто кожна п'ята пацієнтка зазнавала несприятливого впливу підвищеного рівня ГЦ. При аналізі ген — генної взаємодії за допомогою програми мультифакторної просторової редукції найбільш значущою була чотирилокусна модель, яка включала всі варіанти досліджених генів *MTHFR* (С677Т, А1298С), *MTRR*, *MTR1*. Така модель мала предиктивну цінність 67,53%, відтвореність 10/10. Проведення додаткового коригуючого пермутаційного тесту підтвердило вірогідність отриманих нами результатів ($p<0,05$). Побудована нами модель довела роль міжгенної взаємодії у розвитку ГЦ у пацієнток із репродуктивними втратами, чим підтверджено необхідність тестування всіх перерахованих генів у клінічній практиці (рисунок).

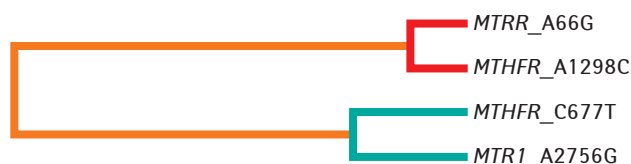


Рисунок. Дендрограма міжгенної взаємодії

Червоний та оранжевий колір — синергічна взаємодія, зелений колір — антагоністична взаємодія між локусами.

Серед пацієнтів із ГЦ у 2 (5,41%) виявлено поєднання генотипів 677TT/2756AG, а в 1 (2,70%) — 677TT/2756GG, а при нормальному рівні ГЦ частка пацієнтів з генотипом 677TT/2756GG була меншою — 2 (1,35%), а генотип 677TT/2756GG взагалі не зафіксовано. Варіант генотипу 677TT/2756GG/66GG виявлено в 1 (2,70%) із пацієнтів із ГЦ. За даними наукових джерел відомо, що

гомозиготи 2756GG за геном *MTR1* виявляють рідко, а для з'ясування статистичної розбіжності і доведення його впливу в цьому випадку потрібна більша вибірка. Однак ми встановили вплив поліморфізму *MTR1* на розвиток ГГЦ при розрахунку рівня ГЦ залежно від поєднань генотипів. При розрахунку комбінацій генотипів серед обстежених пацієнтів взагалі не виявлено комбінацій генотипів 1298CC/2756GG за генами *MTHFR* та *MTR1*.

У табл. 6 наведено результати порівняння частоти комбінацій генотипів у пацієнток залежно від рівня ГЦ у плазмі крові. Ми виявили чотири варіанти комбінацій генотипів, за яких підвищується ризик розвитку ГГЦ. Наявність у пацієнток комбінацій генотипів 677CC/1298AC/2756AA достовірно знижувала ризик розвитку ГГЦ.

Таблиця 6. Комбінація генотипів досліджуваних генів *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* у пацієнток із репродуктивними розладами залежно від рівня ГЦ

Поліморфні варіанти	ГЦ <12 (n=148)		ГЦ >12 (n=37)		Результати статистичного аналізу		
	n	%	n	%	χ^2	p	Від- носний ризик 95% довірчий інтервал
C677T/A1298C							
677TT/1298AA	11	7,43	8	21,62	5,02	0,025	3,44 1,27–9,29
C677T/A66G							
677TT/66GG	4	2,70	5	13,51	5,32	0,021	5,63 1,43–22,12
C677T/A1298C/A66G							
677TT/1298AA/66GG	4	2,70	5	13,51	5,32	0,021	5,63 1,43–22,12
C677T/A1298C/A2756G							
677CC/1298AC/2756AA	26	17,57	1	2,70	4,12	0,042	0,13 0,02–0,99
A1298C/A2756G/A66G							
1298AC/2756AG/66AG	3	2,03	4	10,81	4,09	0,043	5,86 1,25–27,44

R. Reilly та співавтори (2014) в оглядовій роботі щодо впливу поліморфізму гена *MTHFR* на ризик розвитку мультифакторних захворювань зробили висновок, що необхідно виявляти осіб з 677TT-генотипом у регіонах без фортифікації продуктів харчування, тому що існують переконливі докази потенційної користі персоналізованого підходу у призначенні вітамінів групи В для профілактики або лікування захворювань. В Україні не здійснюється фортифікація продуктів харчування, тому генетичний скринінг *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* є необхідним для запобігання мультифакторним захворюванням та репродуктивним розладам шляхом призначення збалансованих полівітамінних комплексів.

Висновки

ГГЦ (аутосомно-рецесивне спадкове метаболічне захворювання), пов'язана з мутаціями в генах фолатного обміну, виявлена у 20% жінок із репродуктивними розладами.

Рівень ГЦ достовірно підвищений у пацієнток з генотипом 677TT за геном *MTHFR* та його поєднаннями з генотипами 1298AA, 66AA, 66GG та 2756GG за генами *MTHFR*, *MTRR* та *MTR1*, при цьому рівні ФК та вітаміну В₁₂ у сироватці крові були зниженими.

Достовірною моделлю ризику розвитку ГГЦ була чотирилокусна, яка включала всі варіанти досліджених генів *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTRR* (A66G), *MTR1* (A2756G).

Ризик розвитку ГГЦ достовірно підвищувався за наявності комбінації трьох варіантів генів: 677TT/1298AA/66GG, 1298AC/2756AG/66AG — та знижувався при 677CC/1298AC/2756AA.

Виявлені відмінності у показниках фолатного обміну потребують подальшого аналізу ген — факторних взаємодій з урахуванням прийому вітамінно-натуральних препаратів.

Список використаної літератури

- Венціківська І.Б., Прощенко О.М., Загородня О.С. (2015) Прогнозування невиношування вагітності при поєднанні генетично детермінованої тромбофілії й антифосфоліпідного синдрому. *Здоров'я жінки*, 1(97): 83–86.
- Веропотвелян П.Н., Веропотвелян Н.П., Погуляй Ю.С. (2011) Гіпергомоцистеїнемія і вагітність. *Здоров'я жінки*, 9(65): 87–90.
- Горovenko Н.Г., Ольхович Н.В., Россоха З.І. та ін. (2010) Вплив поліморфізму C677T гену *MTHFR* на фолатний статус та рівень гомоцистеїну в сироватці крові у дітей з когнітивними розладами. *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики*, 19: 61–70.
- Гречанина О.Я., Гречанина Ю.Б., Гусар В.А. (2010) Спосіб профілактики репродуктивних втрат при гіпергомоцистеїнемії. Патент на корисну модель UA 53270, МПК (2009) G01N33148. Харківський мед. університет, u201005921, Бюл. 18.
- Россоха З.И., Кирьяченко С.П., Горovenko Н.Г. (2014) Диагностика и лечение наследственной тромбофилии в акушерско-гинекологической прак-

тике. *Обзор клинических рекомендаций и литературы. Мед. аспекты здоровья женщины*, 6(81): 5–13.

Россоха З.І., Кир'яченко С.П., Горovenko Н.Г. (2018) Порівняльна оцінка моделей генетичного ризику репродуктивних розладів, зумовлених поліморфізмом генів *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*. *Мед. перспективи*, XXIII (2): 85–91.

aruplab (2016) Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) 2 Variants (<http://td.aruplab.com/tests/pub/0055655>).

Bae J., Shin J.S., Cha H.S. et al. (2007) Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fert. Ster.*, 87: 351–355.

Baglin T., Gray E., Greaves M. (2010) Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br. J. Haematol.*, 149(2): 209–220.

Bates S.M., Greer I.A., Middeldorp S. et al. (2012) VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy and Pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines. *CHEST*, 141(2): 691–736.

Dahlback B. (2008) Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*, 112(1): 19–27.

Devalia V., Hamilton M.S., Molloy A.M. (2014) Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br. J. Haematol.*, 166(4): 496–513.

Feix A., Fritsche-Polanz R., Kletzmayer J. et al. (2001) Increased prevalence of combined MTR and *MTHFR* genotypes among individuals with severely elevated total homocysteine plasma levels. *Am. J. Kid. Dis.*, 38(5): 956–964.

Fermo I., Viganò D.S., Paroni R., Mazzola G. (1995) Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Ann. Intern. Med.*, 123(10): 747–753.

Fodinger M., Buchmayer H., Heinz G. et al. (2001) Association of two *MTHFR* polymorphisms with total homocysteine plasma levels in dialysis patients. *Am. J. Kid. Dis.*, 38: 77–84.

Garakanidze S., Costa E., Bronze-Rocha E. et al. (2018) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism (C677T) as a risk factor for arterial thrombosis in Georgian patients. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, Jan. 1 [Epub. ahead of print].

Hickey S.E., Curry C.J., Toriello H.V. (2013) ACMG Practice Guideline: lack of evidence for *MTHFR* polymorphism testing. *Genet. Med.*, 15(2): 153–156.

Holmes M.V., Newcombe P., Hubacek J.A. et al. (2011) Effect modification by population dietary folate on the association between *MTHFR* genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet*, 378: 584–594.

Isotolo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G. (2000) Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 986–990.

Levin B.L., Varga E.J. (2016) *MTHFR*: addressing genetic counseling dilemmas using evidence-based literature. *J. Genet. Counsel.*, 25: 901–911.

Liu F., Silva D., Malone M.V., Seetharaman K. (2017) *MTHFR* A1298C and C677T polymorphisms are associated with increased risk of venous thromboembolism: a retrospective chart review study. *Acta Haematol.*, 138: 208–215.

Moll S., Varga E.A. (2015) Homocysteine and *MTHFR* mutations. *Circulation*, 132 (1): e6–e9.

Reilly R., McNulty H., Pentieva K. et al. (2014) *MTHFR* 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins? *Proc. Nutr. Soc.*, 73(1): 47–56.

Rossocha Z., Gorovenko N. (2017) Assessment of the individual folic acid doses requirement for patients with reproductive disorders. In: Abstracts of the XIII World Congress of Perinatal Medicine, Oct. 26–29, Serbia, p. 349.

Sørensen J.T., Gaustadnes M., Stabler S.P. et al. (2016) Molecular and biochemical investigations of patients with intermediate or severe hyperhomocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.*, 117(3): 344–350.

Stanger O., Herrmann W., Pietrzik K. et al. (2003) DACH-LIGA homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41(11): 1392–1403.

Stefano V.D. (2013) Testing for inherited thrombophilia and consequences for antithrombotic prophylaxis in patients with venous thromboembolism and their relatives. A review of the Guidelines from Scientific Societies and working groups. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(4): 697–705.

Stevens S.M., Woller S.C., Bauer K.A. et al. (2016) Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J. Thromb. Thrombolysis*, 41(1): 154–164.

Wilcken B. (2017) Therapeutic targets in homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency: new European guidelines, Expert Opinion on Orphan Drugs, 5: 1–3.

Zappacosta B., Graziano M., Persichilli S. et al. (2014) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem. Funct.*, 32: 1–4.

Zetterberg H., Regland B., Palmér M. et al. (2002) Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. Eur. J. Hum. Genet., 10(2): 113–118.

Роль межгенного взаимодействия *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* в развитии нарушений фолатного обмена у пациенток с репродуктивными расстройствами

З.И. Россоха, С.П. Кирьяченко, Н.Г. Горovenko

Резюме. Цель — определение роли межгенных взаимодействий *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* в развитии нарушений фолатного обмена у пациенток с репродуктивными расстройствами. **Объект и методы исследования.** У 185 пациенток с репродуктивными расстройствами проведено молекулярно-генетическое исследование генов: *MTHFR* (C677T, rs1801133; A1298C, rs1801131), *MTRR* (A66G, rs1801394), *MTR1* (A2756G, rs1805087) — и биохимических показателей фолатного обмена. **Результаты.** Гипергомоцистеинемия (аутосомно-рецессивное наследственное метаболическое заболевание), связанная с мутациями в генах фолатного обмена, выявлена у 20% женщин с репродуктивными расстройствами. Уровень гомоцистеина достоверно был повышен у пациенток с генотипом 677TT по гену *MTHFR* и его сочетаниями с генотипами 1298AA, 66AA, 66GG и 2756GG по генам *MTHFR*, *MTRR* и *MTR1*, при этом уровни фолиевой кислоты и витамина B₁₂ были пониженными. Достоверной моделью риска гипергомоцистеинемии была четырехлокусная, с вовлечением генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*. Риск развития гипергомоцистеинемии достоверно повышался при наличии комбинации генотипов 677TT/1298AA/66GG, 1298AC/2756AG/66AG и снижался при комбинации 677CC/1298AC/2756AA. Выявленные различия в показателях фолатного обмена требуют дальнейшего анализа ген — факторных взаимодействий с учетом применения витаминно-нутриентных препаратов.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, гипергомоцистеинемия, репродуктивные расстройства.

The role of *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* intergenic interaction in the development of folate metabolism disturbance in patients with reproductive disorders

Z.I. Rossokha, S.P. Kiryachenko, N.G. Gorovenko

Summary. *Purpose.* Role determination of *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* intergenic interaction in the development of folate metabolism disturbance in patients with reproductive disorders. *Object and methods.* Molecular genetic studies of genes: *MTHFR* (C677T, rs1801133, A1298C, rs1801131), *MTRR* (A66G, rs1801394), *MTR1* (A2756G, rs1805087) and biochemical indicators of folate metabolism in 185 patients with reproductive disorders were performed. *Results.* Hyperhomocysteinemia (autosomal recessive hereditary metabolic disease) associated with mutations in folate metabolism genes were found in 20% of women with reproductive disorders. The level of homocysteine was significantly increased in patients with the 677TT genotype in the *MTHFR* gene and its combinations with 1298AA, 66AA, 66GG and 2756GG genotypes of the *MTHFR*, *MTRR* and *MTR1* genes, while the levels of folic acid and vitamin B₁₂ were decreased. A significant model risk of hyperhomocysteinemia was four-locus, involving the *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1* genes. The risk of hyperhomocysteinemia development was increased significantly with genotypes combinations: 677TT/1298AA/66GG, 1298AC/2756AG/66AG, and decreased with combination 677CC/1298AC/2756AA. The differences in folate metabolism indices are required further analysis of gene — factor interactions, taking into account vitamin and nutrient consumption.

Key words: genetic polymorphism, hyperhomocysteinemia, reproductive disorders.

Адреса для листування:

Россоха Зоя Іванівна
04112, Київ, вул. Дорогожицька, 9
ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України»
E-mail: zoiroh071@gmail.com

Одержано 27.06.2018