

© Г. К. Рапильбекова

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии, Алматы, Казахстан

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ, ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ И ДЕФИЦИТ ФОЛАТА КАК ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ СИНДРОМА ПОТЕРИ ПЛОДА

■ У 41 % пациенток с синдромом потери плода было выявлено наличие мутации С677Т *MTHFR*. Носительство гомозиготного варианта гена *MTHFR TT* увеличивает риск развития синдрома потери плода в 3,9 раза, гетерозиготного варианта СТ — в 1,3 раза. Присутствие мутации С677Т в гене *MTHFR* не влияло на уровень гомоцистеина в крови. Однако достоверное повышение уровня гомоцистеина наблюдалось у пациенток с наличием мутации в гене *MTHFR* при сочетании с другими формами тромбофилии. Уровень фолатов был снижен во всех группах пациенток, независимо от присутствия мутации С677Т в гене *MTHFR*, вместе с тем, выраженный дефицит фолатов наблюдался в группе при одновременном наличии других дефектов гемостаза.

■ **Ключевые слова:** синдром потери плода; наследственная тромбофилия; генетический полиморфизм С677Т в гене *MTHFR*; гипергомоцистеинемия; дефицит фолата

В последние годы внимание многих исследователей привлекает роль наследственно обусловленных нарушений в системе гемостаза, так называемых тромбофилических состояний и гипергомоцистеинемии (ГГЦ) в патогенезе микроциркуляторных и тромботических осложнений при различных заболеваниях, в том числе и в акушерской практике [1, 2, 4, 5]. При этом наиболее частой формой среди генетически обусловленной тромбофилии является мутация в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*).

Описано несколько разновидностей мутаций гена *MTHFR*. Наиболее значимым является вариант, в котором нуклеотид цитозин заменен тимидином в позиции 677 4-го экзона, что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата. Такой полиморфизм гена *MTHFR* обозначается как С677Т. Аллель С677Т широко распространен в популяции. Этот фермент обеспечивает превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, главную действующую форму фолиевой кислоты, поступающей в организм алиментарным путем [3]. Фолиевая кислота в своей активной форме обеспечивает превращение гомоцистеина в метионин, одну из незаменимых аминокислот. При снижении функции *MTHFR* нарушается доставка и метаболизм фолиевой кислоты, что приводит к накоплению гомоцистеина в плазме крови, последнее напрямую коррелирует с угнетением синтеза тромбомодулина, понижением активности антитромбина III и эндогенного гепарина, а также с активацией выработки тромбоксана А2 [4]. Эти изменения вызывают микротромбообразование и нарушение микроциркуляции, что, в свою очередь, играет существенную роль в патологии спиральных артерий и развитии акушерских осложнений, связанных с изменением маточно-плацентарного кровообращения.

ГГЦ сама по себе является мультифакториальным процессом с вовлечением генетических и негенетических аспектов метаболизма гомоцистеина. Наиболее частыми приобретенными причинами ГГЦ являются дефициты фолата и, в меньшей степени, дефициты витаминов В₆ и В₁₂. При беременности концентрация гомоцистеина снижается примерно на 50 % от исходного уровня [2]. Низкая концентрация гомоцистеина в крови, возможно, является адаптационным механизмом, способствующим улучшению маточно-плацентарного кровотока.

При изучении мутации С677Т в гене *MTHFR* ученые пытаются установить связь его с развитием синдрома потери плода (СПП).

В связи с этим огромный интерес представляет роль гипергомоцистеинемии и дефицита фолата при СПП и мутации С677Т в гене *MTHFR*.

Цель исследования: оценить значение ГГЦ и дефицита фолата в динамике беременности при СПП в зависимости от присутствия мутации С677Т в гене *MTHFR*.

Материал и методы исследования

На I этапе методом молекулярно-генетического анализа нами были обследованы 200 беременных, из них 100 с СПП в анамнезе (основная группа) и 100 беременных с нормальной репродуктивной функцией (контрольная группа) в казахской популяции.

Выявление мутации С677Т *MTHFR* проводилось в 3 этапа: выделение ДНК, амплификация (методом полимеразной цепной реакции), рестрикция.

На II этапе у 41 женщины с мутацией в гене *MTHFR* и с СПП в анамнезе (основная группа) и у 24 женщин с данной мутацией и без СПП в анамнезе (контрольная группа) проводилось определение гомоцистеина и фолата с помощью иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка включала в себя вычисление средних величин и их ошибок. Достоверность отличий оценивалась при помощи *t*-критерия Стьюдента и критерия χ^2 .

Результаты и их обсуждение

Из 100 беременных основной группы у 41 (41,0 ± 4,9 %) и из 100 беременных контрольной группы у 24 (24,0 ± 4,3 %) было выявлено наличие мутации С677Т *MTHFR*. При этом в основной группе у 37 (37,0 ± 4,8 %; $p < 0,05$) — гетерозиготная форма, а у 4 (4,0 ± 2,0 %) — гомозиготная форма. Изолированная форма мутации выявлена у 28 (28,0 ± 4,5 %) беременных, а в сочетании с други-

ми формами тромбофилии — у 13 (13,0 ± 3,4 %). В контрольной группе данная мутация обнаружена у 24 женщин (24,0 ± 4,3 %), при этом у 23 (23,0 ± 4,2 %) — гетерозиготная форма, и в 1 случае (1,0 %) — гомозиготная форма (табл. 1).

С целью определения клинико-диагностической значимости генетического полиморфизма С677Т гена *MTHFR* для развития СПП в казахской популяции методом ПДРФ-анализа были определены полиморфные варианты гена *MTHFR* в основной и в контрольной группах.

Частоты генотипов и аллелей по С677Т полиморфизму гена *MTHFR* у пациенток с СПП в анамнезе, а также в здоровом контроле представлены в таблице 2. Как показано в таблице, в основной группе достоверно реже встречался благоприятный гомозиготный генотип (СС) — 59,0 ± 4,9 %, в то время как в контроле — 76,0 ± 4,3 % ($\chi^2 = 7,2$; $p < 0,02$). Частота гомозигот по Т-аллелю (ТТ) в основной группе составила 4,0 ± 2,0 %, что превышало аналогичный показатель контрольной группы — 1,0 ± 1,0 %. Частота гетерозигот (СТ) в группе обследуемых по развитию СПП — 37,0 ± 4,8 % — также превышала данный показатель в популяционном контроле — 23,0 ± 4,2 %.

В контрольной группе частота встречаемости аллеля С гена *MTHFR* превалирует над частотой аллеля Т (87,5 и 12,5 % соответственно). В группе женщин частота неблагоприятного аллеля Т оказалась выше частоты встречаемости ал-

Таблица 1

Частота мутации С677Т *MTHFR* в исследуемых группах (М ± м, %)

Форма тромбофилии	Основная группа (n = 100)		Контрольная группа (n = 100)		p
	Абс. число	М ± м, %	Абс. число	М ± м, %	
<i>MTHFR</i> :	41	41,0 ± 4,9	24	24,0 ± 4,3	< 0,001
• гомозиготная форма	4	4,0 ± 2,0	1	1,0 ± 1,0	–
• гетерозиготная форма	37	37,0 ± 4,8	23	23,0 ± 4,2	< 0,05
• изолированная	28	28,0 ± 4,5	24	24,0 ± 4,3	–
• мультигенная	13	13,0 ± 3,4	–	–	< 0,01

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей гена *MTHFR* по С677Т полиморфизму в исследуемых группах (М ± м, %)

Генотипы, аллели	Основная группа (n = 100)		Контрольная группа (n = 100)		p
	n	М ± м, %	n	М ± м, %	
СС	59	59,0 ± 4,9	76	76,0 ± 4,3	< 0,01
СТ	37	37,0 ± 4,8	23	23,0 ± 4,1-2	< 0,05
ТТ	4	4,0 ± 2,0	1	1,0 ± 1,0	–
Всего	100	100,0	100	100,0	–
С	155	77,5 ± 3,0	175	87,5 ± 2,3	< 0,01
Т	45	22,5 ± 3,0	25	12,5 ± 2,3	< 0,01
Всего	200	100,0	200	100,0	–

Таблица 3

Влияние генотипа *MTHFR* на уровень гомоцистеина в сыворотке крови у обследованных беременных в динамике беременности (мкмоль/мл)

Генотип	Уровень гомоцистеина					
	I триместр		II триместр		III триместр	
	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения
Гетерозиготная форма (С-Т)	4,7 ± 0,9	4,3 ± 0,3	5,4 ± 1,5	4,8 ± 0,6	5,1 ± 0,6	5,0 ± 0,2
Мультигенная форма+ <i>MTHFR</i> (С-Т)	15,2 ± 1,2 **	—	12,7 ± 0,7 **	—	4,6 ± 1,6 *	—
Мультигенная форма+ <i>MTHFR</i> (С-С)	4,3 ± 0,3 **	—	5,8 ± 1,5 *	—	4,9 ± 0,7 **	—

* — $p < 0,01$; ** — $p < 0,001$

Таблица 4

Влияние генотипа *MTHFR* на уровень фолата в сыворотке крови у обследованных беременных в динамике беременности (нг/мл)

Генотип	Уровень фолата					
	I триместр		II триместр		III триместр	
	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения
Гетерозиготная форма (С-Т)	3,2 ± 0,4	3,7 ± 0,3	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,6	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Мультигенная форма+ <i>MTHFR</i> (С-Т)	2,4 ± 0,5 *	—	2,2 ± 0,4 *	—	1,6 ± 0,3 *	—
Мультигенная форма+ <i>MTHFR</i> (С-С)	3,3 ± 0,2 *	—	3,2 ± 0,5 *	—	3,3 ± 0,3 *	—

* — $p < 0,001$

лея С (77,5 и 22,5 % соответственно) ($\chi^2 = 18,3$; $p < 0,001$). Достоверные различия выявлены по частоте встречаемости Т аллеля у женщин с СПП в анамнезе по сравнению со здоровым контролем ($p < 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют о возможном вкладе гена *MTHFR* в этиологию и риск развития СПП.

Анализ частоты носительства полиморфных вариантов гена *MTHFR* у женщин с СПП позволил определить коэффициент odds ratio (OR), рассчитанный как относительный риск развития СПП при носительстве того или иного генотипа. Нами выявлено, что носительство гомозиготного варианта гена *MTHFR* ТТ увеличивает риск развития СПП в 3,9 раза, гетерозиготного варианта СТ — в 1,3 раза.

Результаты проведенных биохимических исследований показали (табл. 3), что у пациенток с нормальным течением беременности и у пациенток с СПП в анамнезе наличие мутации в гене *MTHFR* не сопровождалось повышением уровня гомоцистеина в плазме крови и в среднем составило: в I триместре беременности в основной группе — $4,7 \pm 0,92$ мкмоль/л, в группе контроля —

$4,3 \pm 0,3$ мкмоль/л, во II триместре — $5,4 \pm 1,5$ и $4,8 \pm 0,6$ мкмоль/л, в III триместре — $5,1 \pm 0,6$ и $5,0 \pm 0,2$ мкмоль/л соответственно. Однако достоверное повышение уровня гомоцистеина ($p < 0,001$) наблюдалось у пациенток с наличием мутации в гене *MTHFR* при сочетании с другими дефектами гемостаза (АФС, мутация фактора V Лейдена, в гене протромбина G20210A), при этом наибольшее содержание гомоцистеина в плазме крови наблюдалось в I триместре беременности, в среднем составило $15,2 \pm 1,2$ мкмоль/л, в последующем наблюдалось его снижение в динамике беременности. Нами также определялось исследование содержания гомоцистеина у женщин с мультигенными формами тромбофилии без наличия мутации в гене *MTHFR*, при этом содержание гомоцистеина находилось в пределах нормы.

Как показано в таблице 4, в результате проведенного исследования было выявлено, что средний уровень фолата в сыворотке крови у пациенток как группы контроля, так и основной был ниже нормы и составил: в I триместре беременности: в основной группе — $3,2 \pm 0,4$ нг/мл, в группе контроля — $3,7 \pm 0,3$ нг/мл, во II три-

местре — $3,1 \pm 0,4$ и $3,4 \pm 0,6$ нг/мл, в III триместре — $2,7 \pm 0,5$ и $2,8 \pm 0,4$ нг/мл, соответственно в группах. Однако достоверное снижение уровня фолата ($p < 0,05$) наблюдалось у пациенток с наличием мутации в гене *MTHFR* при сочетании с другими дефектами гемостаза (АФС, мутация фактора V Лейдена, в гене протромбина G20210A). Нами также определялось содержание фолата у женщин с мультигенными формами тромбофилии без наличия мутации в гене *MTHFR*, при этом содержание фолиевой кислоты было ниже норм.

Учитывая влияние дефицита фолатов на метаболизм гомоцистеина, нами был проведен корреляционный анализ зависимости данных показателей. При этом выявлена обратная связь между уровнем гомоцистеина и содержанием фолата в сыворотке крови ($r = -0,5$, $p < 0,001$).

Результаты проведенных исследований показали, что между ГГЦ и генотипами наследственных тромбофилии и АФС имеет место выраженный синергизм в потенцировании вероятности тромбообразования. Прогнозирование степени риска развития потери плода у пациенток с наличием мутации в гене *MTHFR* (одиночной или сочетающейся с другими маркерами тромбофилий) не может быть осуществлено на основе только определений генотипа без учета уровня гомоцистеина и фолатов. Повышенный уровень гомоцистеина и дефицит фолата не обязательно могут быть связанными с мутациями С677Т *MTHFR*, но являются самостоятельными факторами риска тромбообразования. При этом обуславливаемая ГГЦ и дефицитом фолата тромбоопасность возрастает при одновременном наличии мутаций фактора V Лейдена или протромбина G20210A, или АФС. Но, однако, по полученным результатам наших исследований сами по себе мутации С677Т *MTHFR*, не сопровождаемые возрастанием уровня гомоцистеина, ассоциируются с повышением риска потери плода.

Выводы

У пациенток с СПП достоверно чаще, чем у пациенток с нормальной репродуктивной функцией, выявляется мутация С677Т в гене *MTHFR* — ферменте, участвующем в метаболизме гомоцистеина. При этом носительство гомозиготного варианта гена *MTHFR* TT увеличивает риск развития СПП в 3,9 раза, гетерозиготного варианта СТ — в 1,3 раза. Присутствие мутации С677Т в гене *MTHFR* не влияло на уровень гомоцистеина в крови. Однако достоверное повышение уровня гомоцистеина ($p < 0,001$) наблюдалось у пациенток с наличием мутации в гене *MTHFR* при сочетании с другими дефектами гемостаза (АФС, мутация фактора V Лейдена, в

гене протромбина G20210A). Уровень фолатов был снижен во всех группах пациенток, независимо от присутствия мутации С677Т в гене *MTHFR*, вместе с тем, выраженный дефицит фолатов наблюдался в группе при одновременном наличии других дефектов гемостаза ($p < 0,05$).

Литература

1. Ефимов В. С. Гомоцистеинемия в патогенезе тромбоваскулярной болезни и атеросклероза / Ефимов В. С., Цакалоф А. К. // Журнал лаб. мед. — 1999. — № 2. — С. 44–48.
2. Низкомолекулярный гепарин и тромбофилические состояния в акушерстве / Макацария А. Д., Бицадзе В. О., Долгушина Н. В. [и др.]; Ред. А. Д. Макацария. — М., 2002. — 218 с.
3. Rosen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methyltetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) / Rosen R. // Thrombosis and Haemostasis J. — 1997. — Vol. 78, N 1. — P. 523–527.
4. The role of vitamin B₁₂ in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the *MTHFR* gene, case-control study of patients with early-onset thrombotic events / D'Angelo A., Copolla A., Modonna P. [et al.] // Thromb. Haemost. — 2000. — Vol. 83. — P. 563–570.
5. Ueland P. M. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status / Ueland P. M. // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41. — P. 340–342.

Статья представлена М. С. Зайнулиной
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

GENETIC POLYMORPHISM OF GENE OF *MTHFR*,
HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND FOLATE DEFICIENCY AS
FACTORS TO RISK OF DEVELOPMENT OF THE FETAL LOSS
SYNDROME

Rapilbekova G. K.

■ **Summary:** Mutation of *MTHFR* C677T was founded at 41 % patients with syndrome of fetal loss. The carriage of homozygous forms of mutation increasing a risk of fetal loss in 3,9 once and heterozygous forms — in 1,3 once. Mutation of *MTHFR* C677T not influenced on the level of homocystein. But hyperhomocysteinemia was revealed at combination of mutation of *MTHFR* C677T with other forms of thrombophilia. The level of folates was failed at patients of all groups, irrespective of presence of mutation of *MTHFR* C677T, but expressed folate deficiency observed at patients with combination of mutation of *MTHFR* C677T with other forms of thrombophilia.

■ **Key words:** syndrome of loss fetus; polymorphism C677T in the gene of *MTHFR*; hereditary thrombophilia; hyperhomocysteinemia; folate deficiency