

**С.В. Шевчук**  
**О.О. Пентюк**

Вінницький національний  
медичний університет  
ім. М.І. Пирогова, Вінниця

Український державний  
науково-дослідний інститут  
реабілітації інвалідів  
МОЗ України, Вінниця

**Ключові слова:** системний червоний вовчак, мутація Ц677Т в гені 5, 10-МТГФР, гомоцистеїн.

# ЗВ'ЯЗОК МУТАЦІЇ Ц677Т В ГЕНІ 5, 10-МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРО-ФОЛАТРЕДУКТАЗИ У ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ ВОВЧАК З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ, АНТИФОСФОЛІПІДНИМ СИНДРОМОМ І ТРОМБОТИЧНИМИ УСКЛАДНЕННЯМИ

**Резюме.** Проведено оцінку поширеності мутації Ц677Т в гені 5, 10-метилентетрагідрофолатредуктази у хворих на системний червоний вовчак (СЧВ). Ц677Ц-гомозиготи дикого типу виявляють у 46,6% випадків, Ц677Т-гетерозиготи та Т677Т-гомозиготи за термолабільним варіантом ферменту — у 37,3 та 16,1% хворих відповідно. Поліморфізм Т/Т гена МТГФР за 677 нуклеотидом у хворих на СЧВ є фактором ризику розвитку тромбоемболічних уражень у пацієнтів із СЧВ, який асоціюється переважно з гіпергомоцистеїнемією і частково з антифосфоліпідним синдромом.

## ВСТУП

Головна причина смерті хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) — тромботичні ускладнення, виникнення яких найчастіше пов'язують з антифосфоліпідним синдромом (АФС), атеросклеротичними та запальними ураженнями судин. Очевидно, що спектр причин підвищеної схильності хворих на СЧВ до тромбозу не обмежується вищезазначеними причинами.

Останнім часом активно обговорюється проблема тромбофілічного синдрому, в основі якого лежать як набуті, так і спадкові чинники (генетичний поліморфізм за антитромбіном III, протеїном С (лейденська мутація), протеїном S, кофактором гепарину II, фібриногеном, глікопротеїном-1, -2 та -3, інгібітором активатора плазміногену, метилентетрагідрофолатредуктазою тощо), внесок яких у формування тромбоемболічних ускладнень у хворих на СЧВ оцінений меншою мірою.

Особливу увагу приділяють мутації Ц677Т в гені 5, 10-метилентетрагідрофолатредуктази (МТГФР), яка пов'язана із заміною цитозину на тимін в нуклеотиді 677 (677Ц→Т) у відкритій рамці зчитування гена МТГФР і асоціюється з посиленням тромбогенного потенціалу крові (Пентюк О.О. та співавт., 2003). Відомо, що частота Ц677Т-поліморфізму досить висока серед представників європеїдної та монголоїдної раси (10–13% Т/Т-гомозигот і 50% Ц/Т-гетерозигот), але рідко серед представників негроїдної раси. У гомозигот з цією мутацією активність МТГФР становить лише приблизно 35–50% такої у осіб без мутації і зумовлює зменшення утворення метилтетрагідрофолату, що обмежує перетворення гомоцистеїну (ГЦ) в метіонін і зумовлює його накопичення (Molloy A.M., 2004).

На сьогодні в Україні відсутні дослідження щодо поширеності мутації Ц677Т в гені 5, 10-МТГФР як в цілому в українській популяції, так і серед хворих на СЧВ. Невідомо також, якою мірою у хворих на СЧВ ця мутація асоціюється з гіпергомоцистеїнемією (ГЦ) та АФС і ризиком виникнення судинних уражень.

Мета дослідження — вивчити поширеність мутації Ц677Т в гені 5, 10-МТГФР у хворих на СЧВ та проаналізувати її зв'язок з ГЦ, АФС і розвитком тромботичних ускладнень.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 118 хворих на СЧВ та 35 осіб контрольної групи, які представляли переважно Центральний та Західний регіони України. Діагноз СЧВ встановлювали на основі критеріїв ACR (1997) і формулювали згідно з класифікацією, рекомендованою Асоціацією ревматологів України (2002).

Визначений АФС констатували за наявності не менше 2 клінічних критеріїв та високих рівнів антитіл до кардіоліпіну IgG в сироватці крові. Ймовірний АФС встановлювали за наявності 2 клінічних критеріїв та помірного підвищення рівнів антитіл до кардіоліпіну IgG або одного клінічного критерію та високих рівнів антитіл до кардіоліпіну IgG.

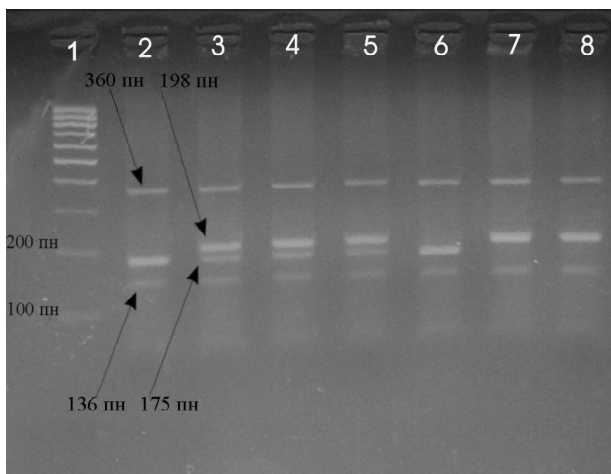
Вміст сумарних антитіл до кардіоліпіну, фосфатидилсерину, фосфатидилінозитолу та фосфатидної кислоти класу IgG та антитіл до β2-глікопротеїну-1 класів IgG, IgA, IgM в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційного набору фірми «ORGenТес», Німеччина. Рівень ГЦ визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на апараті «Hewlett Packard» після відновлення його дисульфідів трибутилфосфі-

ном та наступною дериватизацією з парахлор меркурибензоатом (Ільченко та співавт., 2002).

Генотипування МТГФР проводили за допомогою ампліфікації фрагмента гена МТГФР, який містить поліморфний нуклеотид, з подальшим рестрикційним аналізом продукту ампліфікації. Для контролю проходження реакції рестрикції разом із фрагментом МТГФР ампліфікували фрагмент гена фібриногену Аα, що містить сайт рестрикції для рестриктази, яку використовують у рестрикційному аналізі гена МТГФР. Ампліфікацію (табл. 1) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та рестрикцію проводили за модифікованим методом Р. Frosst та співавторів (1995).

**Таблиця 1**  
Для ампліфікації обох фрагментів використано дві пари праймерів

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



**Рис. 1.** Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованих фрагментів генів МТГФР та фібриногена Аα

Статистичний аналіз результатів (рис. 1) проводили за допомогою стандартних методів із застосуванням пакета прикладних програм Microsoft «Excel 7,0». Для порівняння даних застосовували критерії Стьюдента та Фішера.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед 118 обстежених хворих на СЧВ Ц677Ц-гомозиготи дикого типу реєстрували у 46,6% випадків, Ц677Т-гетерозиготи та Т677Т-гомозиготи за термолабільним варіантом ферменту — відповідно у 37,3 та 16,1%.

На першому етапі оцінювали рівень ГЦ у хворих на СЧВ та осіб контрольної групи. Результати аналізу свідчать (табл. 2), що серед хворих основної групи лише у 34,2% осіб визначали нормальний рівень ГЦ, у 27,2% — субнормальний, а у 38,6% реєстрували ГГЦ, тоді як у контролі у 74,3% реєструвались нормальний рівень ГЦ, субнормальний — у 14,3%, у 11,2% — ГГЦ. Середній рівень ГЦ у хворих на СЧВ на 36,8% перевищував цей показник у контролі. Рівень ГЦ у хворих на СЧВ тісно асоціювався з генетичним поліморфізмом за МТГФР. Зокрема, його середній рівень виявився найнижчим у Ц677Ц-гомозигот порівняно з Ц677Т-

гетерозиготами і, особливо, з Т677Т-гомозиготами (на 8,4 та 32% відповідно). Крім того, порівняно із хворими з генотипом Ц677Ц, в осіб з генотипом Ц677Т і Т677Т виявляли зменшення частки осіб з нормальним рівнем ГЦ та відповідно збільшення частки осіб з ГГЦ (особливо серед гомозигот). Кореляційний аналіз підтвердив наростання рівня ГЦ у Т677Т-гомозигот (коефіцієнт кореляції становив 0,32,  $p < 0,05$ ).

**Таблиця 2**  
Рівень ГЦ у хворих на СЧВ залежно від генетичного поліморфізму за МТГФР, ммоль/л (%)

Група	ГЦ	Нормальний ГЦ < 10,0	Субнормальний ГЦ = 10–15	ГГЦ > 15
Контроль (n=35)	10,43±0,70	26 (74,3)	5 (14,3)	4 (11,4)
Всі хворі на СЧВ (n=114)	14,2±0,69*	39 (34,2)*	31 (27,2)*	44 (38,6)*
Ц/Ц-генотип (n=53)	13,1±1,05*	25 (47,2)*	13 (24,5)*	15 (28,3)*
Ц/Т-генотип (n=42)	14,2±1,15*	14 (33,3)*	10 (23,8)*	18 (42,9)*
Т/Т-генотип (n=19)	17,3±1,26*#	0 (0,0)*#	8 (42,1)*	11 (57,9)*#

\*Вірогідні відмінності щодо контрольної групи; #щодо ЦЦ-гомозигот.

Нами проаналізовано можливість існування зв'язку між мутацією в гені МТГФР із розвитком АФС (табл. 3). Серед обстежених хворих на СЧВ з АФС мутацію Ц677Т в гені МТГФР виявлено у 17 (27%) з 63 хворих, з них у 10 (22,7%) — Ц677Т-гетерозиготний варіант, у 7 (36,8%) — Т677Т-гомозиготний. Дані аналізу свідчать, що серед гомозигот Т677Т в 3,4 раза частіше були хворі з визначеним АФС. Встановлена тенденція до зростання рівнів антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 у Ц677Т-гетерозигот та Т677Т-гомозигот порівняно з гомозиготами дикого типу. Зокрема, у носіїв Т/Т-варіанта гена МТГФР рівень антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 був вищим, ніж у носіїв Ц/Ц-варіанта гена, на 51 та 35% відповідно.

Таким чином, мутація Ц677Т виявляла певний (помірний) зв'язок з АФС, що проявлялося наростанням рівнів антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 серед Ц/Т-гетерозигот, а особливо Т/Т-гомозигот і вірогідним збільшенням частки осіб з визначеним АФС серед носіїв Т/Т-гомозиготного варіанта мутації за МТГФР.

**Таблиця 3**  
Зв'язок між розвитком АФС у хворих на СЧВ і генетичним поліморфізмом за МТГФР

Показник	Група хворих на СЧВ, n (%)			
	Всі хворі на СЧВ (n=118)	Ц/Ц-генотип (n=55)	Ц/Т-генотип (n=44)	Т/Т-генотип (n=19)
<b>АФС</b>				
Визначений АФС	23 (19,5)	6 (10,9)	10 (22,7)	7 (36,8)*
Ймовірний АФС	10 (8,5)	4 (7,3)	4 (9,0)	2 (10,6)
Рівень АФЛ-АТ	6,67±0,81	5,18±0,96	6,83±1,15	7,86±1,76
Антитіла до бета-2-глікопротеїну	21,9±1,30	17,7±2,14	23,3±1,46	23,9±2,26

\*Вірогідні відмінності щодо хворих із генотипом ЦЦ; достовірність відмінностей вираховано за точним методом Фішера.

Враховуючи, що наші попередні дослідження виявили наявність тісного зв'язку ГГЦ з мутацією в МТГФР, а ГГЦ є відомим фактором ризику захворю-

вань серцево-судинної системи і тромбоемболічних ускладнень, ми спробували проаналізувати, наскільки ця мутація асоціюється з серцево-судинними ураженнями у хворих на СЧВ (тобто чи мутація в МТГФР має патогенетичне значення за умов вітамінного дефіциту). Результати аналізу (табл. 4) свідчать, що серед хворих із гомозиготною мутацією Т677Т і гетерозиготною Ц677Ц, порівняно з гомозиготами дикого типу Ц677Ц, вірогідно частіше (від 3,2 до 4,4 раза) виявляли інфаркт міокарда та стенокардію, інсульт і транзиторні ішемічні атаки (ТІА), венозний тромбоз. Водночас поліморфізм за МТГФР менш тісно асоціювався з артеріальною гіпертензією, порушеннями ритму серця та ураженнями клапанного апарату.

**Таблиця 4**  
Частота серцево-судинної патології у хворих на СЧВ залежно від генетичного поліморфізму за МТГФР

Показник	Група хворих на СЧВ, n (%)			
	Всі хворі на СЧВ (n=118)	ЦЦ-генотип (n=55)	ЦТ-генотип (n=44)	ТТ-генотип (n=19)
Інфаркт і стенокардія	26 (22,0)	11 (20,0)	9 (20,5)	8 (42,0)*
Інсульт і ТІА	18 (15,2)	5 (9,1)	8 (18,2)	5 (26,3)*
Тромбоз венозний	12 (10,2)	2 (3,6)	7 (15,9)*	3 (15,8)*
Миготлива аритмія та пароксизмальна тахікардія	2 (1,7)	0 (0,0)	2 (4,5)	0 (0,0)
Артеріальна гіпертензія	54 (45,8)	24 (43,6)	20 (45,5)	10 (52,6)
Ураження клапанного апарату	11 (21,5)	4 (18,1)	4 (18,1)	3 (42,8)

\*Вірогідні відмінності щодо хворих із ЦЦ-генотипом; достовірність відмінностей вирахована за точним методом Фішера. Ураження клапанного апарату визначали у 22 хворих з ЦЦ-генотипом, у 22 – з ЦТ-генотипом, у 7 – з ТТ-генотипом.

Таким чином, результати нашого дослідження свідчать, що серед 118 обстежених хворих на СЧВ мутацію Ц677Т в гені МТГФР виявлено у 53,4% хворих, в тому числі гетерозиготний варіант — у 37,3%, гомозиготний (Т677Т) за термолабільним варіантом ферменту — у 16,1% хворих.

Поліморфізм за МТГФР асоціювався з ГГЦ. Так, якщо серед гомозигот дикого типу частка осіб із ГГЦ становила 28,3%, то серед гетерозигот Ц677Т — 42,9%, а серед гомозигот Т677Т — 57,9%. При цьому у гетерозиготних носіїв мутації Ц677Т рівень гомоцистеїну виявився вищим, ніж у гомозигот дикого типу на 10%, а в гомозигот Т677Т — на 28%. Дані літератури також підтверджують, що поліморфізм за МТГФР здатен стимулювати накопичення гомоцистеїну в плазмі крові. Зокрема, наявність асоціативного зв'язку генетичного поліморфізму за МТГФР (Т/Т-генотипом) із ГГЦ виявлено у хворих на цукровий діабет І типу (Wotherspoon F. et al., 2003).

Проведені дослідження показали, що носійство Т/Т-варіанта гена МТГФР у хворих на СЧВ асоціюється з підвищенням частоти АФС. Так, серед носіїв Т/Т-гомозиготного варіанта мутації в гені МТГФР порівняно з Ц/Ц-гомозиготами дикого типу реєструють більше ніж у 3 рази більшу частку осіб з визначеним АФС. Однак статистично значимих відмінностей в рівнях антитіл до кардіоліпіну та бета-2-глікопротеїну-1 між Ц677Ц-гомозиготами і

Ц677Т-гетерозиготами або Т677Т-гомозиготами нами не виявлено. Статистично значимий зв'язок генетичного поліморфізму за МТГФР з АФС встановлено також у російській популяції хворих на СЧВ (Решетняк Т.М. и соавт., 2002).

Питання, через які молекулярні механізми реалізується негативний вплив мутації Ц677Т на організм її носія і зокрема на судинну систему, залишається відкритим. Проведені дослідження дають підставу пов'язати підвищення частоти розвитку серцево-судинної патології серед Т677Т-гомозигот із ГГЦ. Адже відомо, що надмірна кількість ГЦ здатна не лише пошкоджувати ендотелій судин, але й прямо стимулювати агрегацію тромбоцитів (Пентюк О.О. та співавт., 2003; Заїчко Н.В, Пентюк О.О., 2006).

Наші дані засвідчили, що мутація Ц677Т у гені МТГФР є фактором ризику розвитку тромботичних ускладнень, про що свідчить наявність асоціативних взаємозв'язків між розвитком деяких серцево-судинних вражень та поліморфізмом за МТГФР. Зокрема, частка хворих з інфарктом міокарда, стенокардією, інсультом, ТІА і венозним тромбозом серед Т677Т-гомозигот була від 2 до 4 разів вищою, ніж у Ц677Ц-гомозигот дикого типу.

Однозначних результатів щодо зв'язку мутації Ц677Т в гені МТГФР з ризиком тромботичних ускладнень у хворих на СЧВ в інших дослідженнях не отримано. При дослідженні голландської популяції значення мутації за МТГФР як незалежного фактора ризику артеріального та венозного тромбозу у хворих на СЧВ не доведено (Fijnheer R. et al., 1998). При вивченні італійської популяції хворих на СЧВ цей зв'язок був виявлений (Afeltra A. et al., 2005). Автори розцінюють мутацію Ц677Т за МТГФР як важливий фактор ризику виникнення артеріального та венозного тромбозу у хворих на СЧВ.

Таким чином, дані проведених досліджень свідчать, що поліморфізм Т/Т-гена МТГФР за 677 нуклеотидом у хворих на СЧВ є фактором ризику розвитку тромбоемболічних уражень у хворих на СЧВ, який асоціюється переважно з ГГЦ і частково з АФС. Тестування хворих на СЧВ на носійство мутації Ц677Т в гені 5,10-МТГФР дозволить виявити пацієнтів із найвищим ризиком щодо розвитку серцево-судинних уражень.

## ВИСНОВКИ

**1.** У хворих на СЧВ Ц677Ц-гомозиготи дикого типу виявляють у 46,6% випадків, Ц677Т-гетерозиготи і Т677Т-гомозиготи за термолабільним варіантом ферменту — у 37,3 та 16,1% осіб відповідно.

**2.** Поліморфізм Т/Т-гена МТГФР за 677 нуклеотидом у хворих на СЧВ асоціюється з ГГЦ і меншою мірою — з АФС. Серед Ц/Ц-гомозигот дикого типу частка осіб з ГГЦ становила 28,3%, серед Ц/Т-гетерозигот — 42,9%, серед Т/Т-гомозигот — 57,9%.

**3.** Мутація Ц677Т в гені МТГФР у хворих на СЧВ є фактором ризику розвитку серцево-судинних уражень. Серед осіб з Ц/Т-гетерозиготним варіантом мутації, а особливо з Т/Т-гомозиготним її варіантом, від 2 до 4 разів вища частка хворих з інфарктом міокарда, стенокардією, інсультом, ТІА і венозним тромбозом.

## ЛІТЕРАТУРА

**Заїчко Н.В., Пентюк О.О.** (2006) Вплив тіолових сполук та їх дисульфідних форм на агрегацію тромбоцитів людини. Мед. хімія, 8 (3): 45–47.

**Ільченко О.В., Пентюк О.О., Розгонюк В.Л. та ін.** (2002) Спосіб визначення концентрації тіолів у біологічній рідині. Деклараційний патент на винахід. 47645 А.7. А61В5/145. Україна.

**Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П.** (2003) Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології. Укр. біохім. журн., 75(1): 5–17.

**Решетняк Т.М., Патрушев Л.И., Тихонова Т.Л., Коваленко Т.Ф., Александрова Е.Н., Мирошников А.И., Насонова В.А.** (2002) Мутация в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы при системной красной волчанке и антифосфолипидном синдроме. Тер. арх., 5: 28–32.

**Afeltra A., Vadacca M., Conti L., Galluzzo S., Mitterhofer A.P., Ferri G.M., Del Porto F., Caccavo D., Gandolfo G.M., Amoroso A.** (2005) Thrombosis in systemic lupus erythematosus: congenital and acquired risk factors. Arthritis Rheum., 53(3): 452–459.

**Fijnheer R., Roest M., Haas F.J., De Groot P.G., Derksen R.H.** (1998) Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, antiphospholipid antibodies, and thromboembolic events in systemic lupus erythematosus: a retrospective cohort study. J. Rheumatol., 25(9): 1737–1742.

**Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P. et al.** (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat. Genet., 10: 111–113.

**Molloy A.M.** (2004) Folate and homocysteine interrelationships including genetics of the relevant enzymes. Curr. Opin. Lipidol. 15(1): 49–57.

**Wotherspoon F., Laight D., Shaw K., Cummings M.** (2003) Homocysteine, endothelial dysfunction and oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. Br. J. Diabetes Vasc. Dis.; 3 (5): 334–340.

### СВЯЗЬ МУТАЦИИ Ц677Т В ГЕНЕ 5,10-МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ, АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ И ТРОМБОТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ

**С.В. Шевчук, О.О. Пентюк**

**Резюме.** Проведено оцінку розповсющенності мутації Ц677Т в гені 5,10-метилентетрагід

рофолатредуктазы у больных системной красной волчанкой (СКВ). Ц677Т-гомозиготы дико-го типа определяют в 46,6% случаев, Ц677Т-гетерозиготы и Т677Т-гомозиготы по термолabileному варианту фермента — у 37,3 и 16,1% пациентов соответственно. Полиморфизм Т/Т-гена МТГФР по 677 нуклеотиду у больных СКВ является фактором риска развития тромбоэмболических осложнений у пациентов с СКВ, который ассоциируется преимущественно с гипергомоцистеинемией и частично с антифосфолипидным синдромом.

**Ключевые слова:** системная красная волчанка, мутация Ц667Т в гене 5,10-МТГФР, гомоцистеин.

### ASSOCIATION OF C677T MUTATION IN 5,10-METHYLENTETRAHYDROFOLATREDUCTASE GENE IN SLE PATIENTS WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA, ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME AND THROMBOTIC COMPLICATIONS

**S.V. Shevchuk, O.O. Pentyuk**

**Summary.** C677T mutation spreading was assessed in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in SLE patients. C677T homozygotes of wild type were found to occur in 46,6% of cases, C677T heterozygotes and T677T homozygotes according to thermolabile. Variant of enzyme occur in 37,3% and 16,1% of patients respectively. Polymorphism T/T gene МТГФР by 677 nucleotide in SLE patients is a risk factor of thromboembolic impairment development in SLE patients which is mainly associated with hyperhomocysteinemia and partly with antiphospholipid syndrome.

**Key words:** systemic lupus erythematosus, C677T mutation in 5,10 МТГФР, homocystein.

**Адреса для листування:**

Шевчук Сергій Вікторович  
21029, Вінниця, вул. Писарева, 6/72