УДК 618.56; 547.436; 543.544.5

РІВЕНЬ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ТІОЛІВ ТА ФОЛАТІВ У ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ

О. П. МАРЦЕНЮК[1,2], Ш. МІШЛАНОВА[3], К. Л. РОМАНЕЦЬ[2], Н. М. ТЕПЛЮК[4], М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА[1]

[1]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
[3]Наукове відділення Словацького медичного університету, Братислава;
[4]Відділ клітинної біології та раковий центр, Медична школа Університету Массачусетс, Ворчестер, США;
e-mail: oberih_m@ukr.net

Плацента є органом, в якому відбуваються активні метаболічні процеси і формується певний кількісний та якісний набір речовин, що потрапляють до плоду. З огляду на високий рівень акушерської патології в Україні, в т.ч. прееклампсії, анемії тощо, ми вважали доцільним дослідити у плаценті людини фолатзалежні процеси, з порушенням яких пов'язане виникнення багатьох ускладнень вагітності. Дослідження проводили на 38 зразках зрілої плаценти за перебігу вагітності у жінок без порушень та на 58 зразках за вагітності з ускладненнями, які досить поширені в Україні.

У зразках плаценти визначали рівень фолатів і компонентів метіонінового циклу – метіоніну та гомоцистеїну, цистеїну і глутатіону, а також досліджували поліморфізм метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), яка каталізує необоротне перетворення 5,10-метилентетрагідрофолату на 5-метилтетрагідрофолат – донор метильної групи до метіонінового циклу.

З'ясували, що мутантні генотипи MTHFR – C677T та T677T – присутні здебільшого у плаценті під час ускладненого перебігу вагітності. В разі ускладненої вагітності і носійства C/T-генотипу MTHFR вміст досліджуваних нами амінотіолів та фолатів у її зразках вірогідно, хоча і з неоднаковою спрямованістю, асоціюється з рівнем гомоцистеїну – типового маркера фолатзалежного метіонінового циклу та пов'язаних із ним процесів.

Позитивна кореляція гомоцистеїну з рівнем цистеїну є найістотнішою і спостерігається майже в усіх зразках плаценти (за винятком одного) незалежно від генотипу та наявності/відсутності ускладнень вагітності, що, згідно з нашим припущенням, свідчить про можливість транссульфування гомоцистеїну у плаценті людини.

Ключові слова: амінотіоли, фолати, плацента людини, гомоцистеїн, патологія вагітності.

Фолатний метаболізм активно обговорюється науковцями та акушерами протягом останніх десятиріч у зв'язку з ризиком виникнення вад розвитку у новонароджених та іншими ускладненнями вагітності, що, ймовірно, обумовлено дефіцитом фолатів у раціоні жінки до зачаття і під час вагітності [1–3]. Фолати в організмі містяться у формі моно- та поліглутаматів птероєвої кислоти. Тетрагідрофолати (THF) слугують субстратами в низці залежних метаболічних шляхів, включаючи синтез тимідилату і пуринів (аденіну та гуанідину) в циклі метіоніну, беруть участь у взаємоперетворенні серину і гліцину, а також у метаболізмі гістидину та форміату [2, 4]. Фолати безпосередньо або опосередковано впливають на такі важливі функції клітини, як біосинтез нуклеїнових кислот і протеїнів, трансметилювання, підтримання редокс-статусу фолатзалежними амінотіолами. Ссавці не здатні синтезувати фолати de novo і отримують їх із їжею або як продукти життєдіяльності кишкової флори.

Упродовж вагітності потреби у фолатах до третього триместру гестації постійно зростають через активний катаболізм, ріст плода, плаценти та материнських тканин [4, 5]. На шляху фолатів до плода рецептор концентрує 5-метил-THF на поверхні синцитіотрофобласту і переносить його всередину синцитію шляхом ендоцитозу. Якщо в сироватці крові присутні моноглутаматні форми фолатів, то у клітинах функціонують поліглутаматні (молекули містять 5–8 залишків глутамату), які повільно обмінюються зі зовнішньоклітинними фолатами, і з високою спорідненістю зв'язуються з

фолатзалежними ензимами, спрощуючи перебіг відповідних ензиматичних реакцій [4]. Однак фолатзалежний метаболізм у плаценті [2] досліджено недостатньо, хоча саме в ній формується певний кількісний та якісний склад речовин, які потрапляють до плода. При цьому фолатзалежний обмін, імовірно, відіграє певну роль у формуванні такого складу сполук. Крім того, порушенням плацентарного метаболізму також відводять істотну роль у виникненні ускладнень вагітності [37].

Цикл тетрагідрофолієвої кислоти тісно асоціюється з тіоловим статусом клітини (рис. 1). 5,10-Метилен-THF за участю ключового ензиму фолатзалежного метаболізму – метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR, EC 1.5.1.20) – відновлюється до 5-метил-THF, який слугує донором CH_3-груп для реметилювання гомоцистеїну (Hcy) з утворенням метіоніну (Met). MTHFR належить до поліморфних ензимів. Його алельна форма з C677 → T677-заміною (аланін 222 → валін 222) відзначається значно меншою активністю і асоціюється з підвищеним рівнем Hcy та високим ризиком виникнення ускладнень під час вагітності [2, 6, 7]. Мутована форма ензиму досить часто зустрічається в європейської популяції [8], але моніторинг поширення її в Україні ще й досі знаходиться на початковій стадії.

Реметилювання Hcy відбувається у клітинах усіх типів [9], однак лише в деяких тканинах ссавців (печінці, нирках, тонкому кишечнику та підшлунковій залозі [10–12]) Hcy необоротно перетворюється на цистеїн (Cys) за участю цистатіонін-β-синтази (CBS, EC 4.2.1.22) та цистатіон-γ-ліази (CSE, γ-cystathionase, EC 4.4.1.1). Cys використовується для синтезу глутатіону (GSH), протеїнів або катаболізується до таурину та сульфату (рис. 1). У доступній нам літературі ми не виявили відомостей щодо процесів транссульфування у плаценті людини і, загалом, у ссавців, однак наявність протеїну цистатіонін β-синтази у плаценті людини нещодавно підтверджено в роботі [38].

Підвищений рівень Hcy у тканинах вважається токсичним, зокрема через його потужну відновлювальну активність, здатність хелатуватися з мінералами [13, 14], зв'язування із протеїнами [15] тощо. Нездатність тканин виводити Hcy шляхом транссульфування робить їх особливо чутливими до підвищеного рівня її у тканинах.

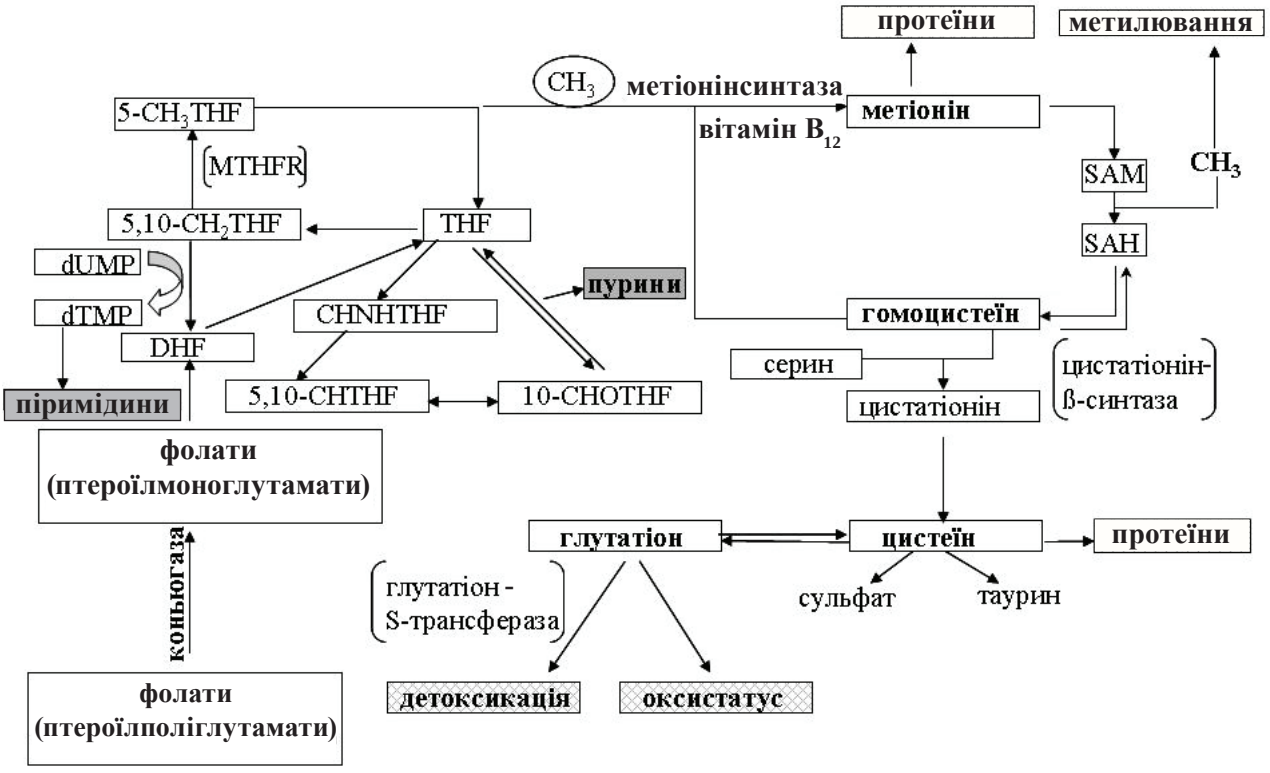

Рис. 1. Схема фолатзалежного метаболізму: 5-CH_3THF – 5-метилтетрагідрофолат, 5,10-CH_2THF – 5,10-метилентетрагідрофолат, DHF – дигідрофолат, THF – тетрагідрофолат, CHNHTHF – формімінотетрагідрофолат, 5,10-CHTHF – 5,10-метенілтетрагідрофолат, 10-CHOTHF – 10-форміл-тетрагідрофолат, SAM – S-аденозилметіонін, SAH – S-аденозилгомоцистеїн

Метою роботи було визначити загальний вміст фолатів, концентрацію Hcy, Met та пов'язаних із ним Cys і GSH залежно від генотипу ензиму MTHFR у зразках зрілої плаценти жінок із фізіологічним та ускладненим перебігом вагітності.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була зріла (38–42 тижні вагітності) плацента людини. Плаценту (n = 96), відібрану відразу після пологів або кесаревого розтину, промивали холодним 0,9%-м NaCl, і обережно підсушували між паперовими рушниками. Зразки (близько 50 г) вирізали з центральної її частини крізь усі шари, заморожували в рідкому азоті та зберігали при -70 °C. Дослідження здійснювали лише на дитячій частині плаценти [16, 17].

Зразки плаценти відбирали після погодження зі співробітниками та породілями у міських пологових будинках № 3 і № 4 Києва, в н-д Інституті педіатрії, акушерства та гінекології АМН України (Київ), на кафедрі акушерства та гінекології Запорізького медичного університету і в міському пологовому будинку № 5 м. Запоріжжя. Кожний зразок супроводжували персональною анкетою з даними щодо стилю життя породіль, зокрема тютюнопаління, вживання алкоголю та професійної роботи із ксенобіотиками. Показники стану новонароджених та матерів було виписано з медичних карток. Дослідження проводили відповідно до вимог Гельсінської декларації. Комітет з етики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України затвердив протокол проведення експериментів із плацентою людини. Всі породіллі погодились на використання плаценти в дослідженнях.

Генотипування MTHFR. Високомолекулярну ДНК виділяли зі зразків плаценти методом S. A. Miller et al. [18]. Генотипування MTHFR здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і наступного рестрикційного аналізу продукту ампліфікації. Для контролю за перебігом реакцій ампліфікації та рестрикції разом із фрагментом гена *MTHFR* ампліфікували фрагмент гена *фібриногену Aα*. У фрагментах останнього та 677T-алелі гена *MTHFR* є сайти рестрикції для рестриктази *Hin*f1. В експериментах застосовували таку послідовність праймерів для ампліфікації фрагментів генів *MTHFR* та *фібриногену Aα* і умови проведення ПЛР, як рекомендовано Van Amerongen et al. у статті [19].

Послідовність праймерів:

MTHFR

A: 5′-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3′
B: 5′-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3′

Фібриноген Aα

C: 5′-CTC CCT TCA CTT TCA GAA CTA CA-3′
D: 5′-GAC CTC TCA GTT TTC ACC TTT A-3′

Реакційна суміш для ПЛР (50 мкл) містила 1 мкг ДНК, чотири нуклеозидтрифосфати (0,2 мМ кожного; MBI Fermentas, Литва), 10 пмоль кожного праймеру (ЗАО «Синтол», Росія) і 2,5 од. Taq-полімерази в 10 мМ трис-HCl-буфері (pH 8,8), до якого було додано 50 мМ KCl та 1,5 мМ $MgCl_2$. Реакцію ампліфікації фрагментів генів *MTHFR* і *фібріногену Aα* здійснювали шляхом попередньої денатурації (94 °C, 4 хв), 30-циклічної ампліфікації (денатурація – 94 °C, 30 с; відпалювання праймерів – 58,5 °C, 30 с; полімеризація – 72 °C, 50 с) і завершувальної полімеризації (72 °C, 7 хв).

Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 2%-у агарозному гелі, що містив 0,5 мкг/мл етидійброміду в буфері 1xTBE. Рестрикцію здійснювали протягом 2–4 год при 37 °C у 10 мМ трис-HCl-буфері (pH 8,5), з 10 мМ $MgCl_2$ та 100 мМ KCl. До загального об'єму реакційної суміші 25 мкл буфера вносили 14 мкл ПЛР-продукту, 10 од. рестриктази Hinf1 та 0,1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Електрофорез продуктів рестрикції здійснювали у 3%-й агарозі TopVision (MBI Fermentas, Литва) і буфері 1xTBE. Електрофореграми візуалізували на приладі Ultroscan. У разі генотипування варіантів гена *MTHFR* – C677C (гомозиготний), C677T (гетерозиготний) та T677T гомозиготний) – одержали фрагменти завдовжки (п.н.): 198; 198, 175 та 23; 175 і 23 відповідно. Рестрикція амплікону фрагмента гена *фібриногену Aα* супроводжується утворенням фрагментів 56, 136, та 350 п.н., які використовують як технічний контроль реакцій ПЛР та рестрикції.

Мікробіологічний метод визначення фолатів. Сумарний вміст фолатів (моно- та поліглутаматних форм, переведених у моноглутаматні форми за дії кон'югази) у зразках плаценти визначали класичним мікробіологічним методом, застосовуючи тест-організм *Lactobacillus casei*, інтенсивність росту якого залежить від концентрації цих сполук у середовищі культивації [20–23]. Через високу специфічність

і чутливість метод широко застосовується на практиці. *L. casei* (№ 3464, ATCC 7469) було люб'язно надано нам ВКПО Державного науково-дослідного інституту генетики РАН. Ліофілізовану культуру поміщали в 1 мл середовища МРС (Інститут мікробіології та вірусології НАН України), інкубували протягом 24 год при 37 °С і інокулювали в агар для лактобактерій (Difco Laboratories, USA). Пересів здійснювали кожні 2 тижні на свіжий агар. За 24 год до вимірювань готували суспензійну культуру бактерій в середовищі Folic Acid Casei Medium (FACM; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) відповідно до рекомендацій виробника. Бактерії культивували при 37 °С.

Кон'югазу (γ-глютамілгідролазу, ЕС 3.4.22.12) отримували з 10 мл крові волонтерів, яку коагулювали при кімнатній температурі [23]. Згусток крові видаляли, а сироватку центрифугували (10 хв, 5000 g). Для очищення сироватки від фолатів близько 2 мл її діалізували при 4 °С протягом 18 год проти 1 л 0,1 М калій-фосфатного буфера (рН 7,0), до якого вносили 2 г активованого вугілля. Діалізовану сироватку зберігали при -20 °С.

Зразки плаценти (близько 200 мг) безпосередньо перед дослідженням гомогенізували в 2 мл розчину 2,0%-го аскорбату натрію. Після 5-хвилинної інкубації на киплячій водяній бані і охолодження на льодяній суспензію додатково гомогенізували (10–15 с) в гомогенізаторі Поттера-Ельвейєма і центрифугували (20 хв, 4000 g). До 500 мкл супернатанту додавали 75 мкл кон'югази із крові людини [23], 5 мкл 575 мМ 2-меркаптоетанолу (Sigma, Німеччина) та 1–2 краплі толуолу, після чого його 24 год інкубували в термостаті при 37 °С. Для осадження протеїнів суспензію 5 хв кип'ятили на водяній бані і центрифугували. У супернатанті визначали вміст фолатів.

Для отримання стандартної кривої готували 1 мМ розчин фолієвої кислоти (ЗАТ «Київський вітамінний завод», Україна) в 0,1 М NaOH, який розбавляли середовищем FACM до концентрації 1 нг/мл. Стандартну криву будували для кожного експерименту. У 10 пробірок вносили по 5 мл розчину фолієвої кислоти в середовищі FACM (кінцева концентрація від 20 до 200 пг/мл). До інших пробірок з 5 мл середовища FACM додавали 100 мкл супернатанту. Їх автоклавували при 1 атм протягом 15 хв разом із пробірками для одержання стандартної кривої. Після швидкого охолодження кожну пробірку у стерильних умовах засівали однією краплею інокуляту *L. casei* і інкубували 48 год у термостаті при 37 °С.

Поглинання світла бактеріальною суспензією вимірювали при $\lambda = 595$ нм. Вміст фолатів у мкг на 1 г маси тканини та на 1 мг протеїну у зразках плаценти визначали за допомогою калібрувальної кривої. Концентрацію протеїну у зразках плаценти тестували стандартним методом M. M. Bradford [24].

Визначення низькомолекулярних амінотіолів методом рідинної хроматографії високого тиску (РХВТ) із електрохімічною детекцією без попередньої дериватизації. У зразках визначали вміст Met і сумарних форм (відновленого, окисленого та протеїнзв'язаного) Hcy і GSH [25]. Зразки плаценти близько 200 мг гомогенізували в 2 мл фосфатного буфера (Sigma, Німеччина). Гомогенат центрифугували (14 000 g, 2 хв). До 100 мкл супернатанту додавали 50 мкл внутрішнього стандарту – 50 мкМ пеніциламіну (Fluka, Німеччина) та 40 мкл свіжоприготовленого 1 М боргідриду натрію (Fluka, Німеччина) в 0,1 М NaOH (Merck, Німеччина), який відновлює окислені форми вільних тіолів та розриває дисульфідні зв'язки протеїнів з амінотіолами, вивільнюючи останні. Суміш після перемішування витримували 30 хв на водяній бані при 50 °С. Протеїни осаджували додаванням 100 мкл 0,6 М перхлорної кислоти (Riedel de Haën, Germany) в 1 мМ EDTA (Sigma, Німеччина) та центрифугуванням (14 000 g, 5 хв). Супернатант розбавляли мобільною фазою (1 : 1). Аліквоту розчину (50 мкл) наносили на колонку РХВТ [25, 26].

Вміст амінотіолів визначали, застосовуючи РХВТ, на приладі HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Німеччина), оснащеному квартерною помпою та вакуумним дегазатором, аналітичною колонкою Purospher® STAR RP-18e (250×4,6 мм, I.D., 5 мкм, Merck) та предколонкою LiChrospher 60 RP-select B (4×4 мм, I.D., 5 мкм). У відділенні хроматографа для колонки були охолоджувальні елементи Пелтьера. Мобільна фаза містила 50 мМ одноосновного моногідрату натрійфосфату (Sigma-Aldrich, Німеччина), 1,0 мМ іонзв'язувального реагенту (ОСК 1-октансульфонової кислоти; Sigma, Німеччина) і 2% ацетонітрилу (v/v) фірми Riedel de Haën (Німеччина); рН мобільної фази доводили 85%-ю фосфорною кислотою до 2,7 (Aldrich, Німеччина). Амінотіоли визначали електрохімічним детектором Coulochem II (ESA, Inc., USA), оснащеним аналітичною (Model 5010A) та контрольною (Model 5020) камерами. Електродний потенціал для контрольної камери становив +1400 мВ, а для аналітичних (E1 та E2) +650 та +900 мВ відповідно. Результати аналізів зберігали в HP3D ChemStation (Hewlett-Packard).

Концентровані розчини стандартних речовин – цистеїну, відновленого глутатіону, гомоцистеїну та метіоніну (Sigma, Німеччина) – готували у водному розчині 2 мМ EDTA. Для внутрішнього стандарту використовували концентрований водний розчин 1 мМ пеніциламіну. Калібрувальні криві будували для цистеїну (концентрації 12,5–200 мкМ), відновленого глутатіону (GSH) і гомоцистеїну (концентрації – 1,8–30,0 мкМ) та Met (концентрації 7,5–120 мкМ). Для калібрувальних кривих зразки готували серійним (1 : 2) розведенням концентрованих розчинів із супернатантом контрольного зразка плаценти. Для нульової точки використовували тільки контрольний супернатант плаценти. Калібрувальні криві в межах досліджуваних концентрацій були лінійними.

Статистичне оброблення результатів. Результати оцінювали за нормальністю їхнього розподілу з використанням коефіцієнта Шапіро–Уїлка і наводили медіани, верхні і нижні квартилі (Lq – Uq) та середні арифметичні зі стандартним відхиленням (M ± SD) за довірчого інтервалу 95%. Значущість відмінностей між групами та кореляцію оцінювали за тестами Манна–Уїтні, Спірмена, множинної регресії та *t*-тестом. Статистичний аналіз даних здійснювали у програмі Statistica 7.0 (Stat-Soft, 2004, USA) [27, 28].

Результати та обговорення

Соціальні, економічні, демографічні та клінічні показники вибірки. Згідно з даними анкет, жінки, зразки плацент яких досліджували, були службовцями, отримували середню зарплату, харчувалися відповідно до національних традицій, професійно не працювали із ксенобіотиками, не вживали алкоголь і не курили упродовж вагітності. Згідно з результатом аналізу медичних карток, 38 зразків плаценти були від породілей з фізіологічним перебігом вагітності, а 58 – із ускладненим, переважно прееклампсією, анемією, небезпекою викидню тощо (дані наведено на рис. 2 за зменшенням їхньої частоти). В більшості випадків одночасно діагностували наявність декількох патологій одночасно. Жінки обох груп істотно не відрізнялися за віком, а новонароджені за масою тіла та довжиною, але індекс Апгар виявився вірогідно вищим за відсутності ускладнень вагітності ($P < 0{,}001$, табл. 1). Індекс Апгар, за яким оцінюється стан дитини в перші 5 хв після народження, відображує суму балів за п'ятьма клінічними показниками, кожному з яких надається одне значення: 0, 1 або 2.

Частота C677T мутацій гена MTHFR. Проведене нами дослідження розподілу алельних варіантів гена *MTHFR* у плаценті жінок української популяції є одним із перших. Час-

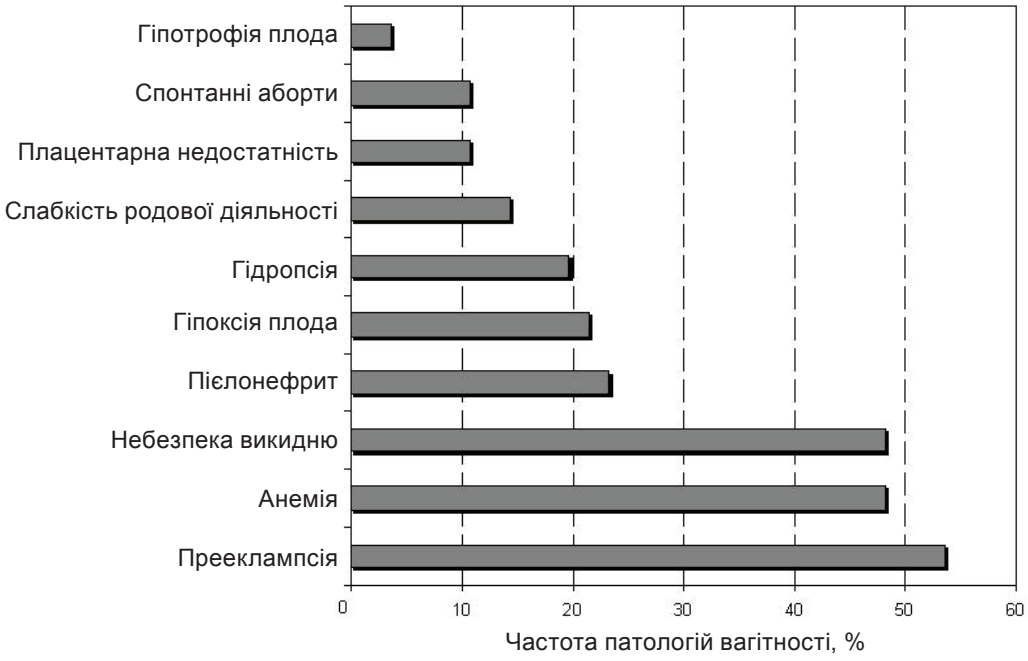

Рис. 2. Різновидності та частота ускладнень вагітності в досліджуваній вибірці
Примітка. Прееклампсія характеризувалася підвищеним артеріальним тиском, наявністю протеїну в сечі, набряками та зміною м'язових рефлексів

Таблиця 1. Показники, які характеризують матір та новонароджених (M ± SD)

Показники	Вагітність без ускладнень	Вагітність з ускладненнями
Вік матері, роки	26,0 ± 5,1	26,2 ± 5,9
Маса новонародженого, г	3346,5 ± 318,4	3208,7 ± 456,0
Довжина новонародженого, см	52,7 ± 2,1	51,8 ± 2,4
Коефіцієнт Апгар	8,7 ± 1,4*	7,8 ± 0,8*

Примітка. *Різниця між показниками за різного перебігу вагітності вірогідна, $P < 0,05$.

тота їх у загальній вибірці зразків становить: C677C – 45,8 (44/96), C677T – 43,8 (42/96) та T677T – 10,4% (10/96). Вона істотно не відрізняється від розподілу генотипів у європейської популяції [29]. Зразки із C677T- та T677T-генотипами ензиму і, відповідно, з 65- та 30%-ю каталітичною активністю (порівняно з генотипом C/C) частіше зустрічаються в разі ускладненої вагітності [8, 30]. Це статистично підтверджується тим, що 95% довірчих інтервалів частот генотипу T677T у плаценті жінок обох груп (ускладнення вагітності та відсутність її) не перекриваються і становлять 0,13 ± 0,039 та 0,05 ± 0,004 відповідно (рис. 3). Таким чином, виявлено, що мутована форма ензиму до певної міри є істотним чинником ризику виникнення досить поширеного в Україні порушення вагітності.

Вміст фолатів у зразках плаценти людини. Одержані нами дані свідчать, що сумарний вміст фолатів у зразках плаценти людини становить 0,12–0,79 мкг/мг протеїну або 2–32 мкг/г тканини (табл. 2). Якщо середня маса плаценти людини дорівнює близько 400 г, то загальний рівень у ній фолатів – 0,8–12,8 мг. Для порівняння: кількість їх у печінці дитини протягом першого року життя знаходиться в межах 3,8–11,3 мкг/г тканини, в той час як у дорослої людини – 5,2–11,0 мг/г тканини [31].

Рівень фолатів виявився найнижчим у разі збігу C677T-носійства та ускладнення вагітності і відрізнявся від такого у тій самій категорії вагітності лише за C677C-носійства ($P = 0,033$). Це збігається з даними інших авторів щодо впливу C/T-генотипу на вміст фолатів в еритроцитах [32]. Відмінність у кількості фолатів за T677T-носійства статистично не значуща, і, крім того, не обговорюється нами через незначну кількість зразків, узятих для аналізу. Однією із причин зниження фолатів у плаценті при C/T-генотипі може бути дисбаланс, який виникає внаслідок зниження відновленої форми 5-метил-THF та накопичення окислених форм метилен- і формілтетрагідрофолатів, які легше катаболізуються [4].

Рівень амінотіолів у зразках плаценти людини. Метод РХВТ з електрохімічною детекцією уможливлює визначення у зразках профілю амінотіолів протягом одного експерименту. Рівень вмісту кожного тіолу (сума відновленої, окисленої та протеїнзв'язаної форм), визначений в нмолях/мг протеїну, становить для Hcy, Met, Cys та GSH 0,07–0,14, 1,93–11,18, 17,72–28,38, 3,04–27,21 відповідно (табл. 2). Показано, що величина співвідношення Cys/GSH у плаценті дорівнює 3 : 1, тоді як у крові матері 1 : 6, а в ембріональній печінці плода – 1,5 : 1 [32].

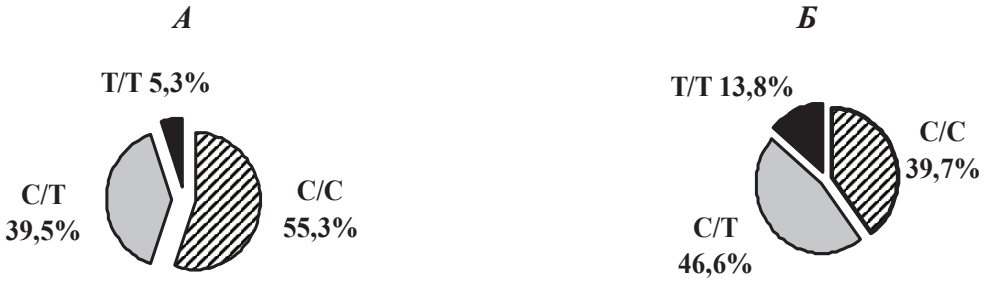

Рис. 3. Частота C677T-алельних варіантів гена MTHFR у плаценті без ускладнень вагітності (А) та з ускладненнями її (Б)

Таблиця 2. Рівень фолатів (мкг/мг протеїну) та амінотіолів (нмоль/мг протеїну) у зразках плаценти

Генотип *MTHFR*	Кількість зразків	Медіана (Lq – Uq)				
		Фолати	Гомоцистеїн	Метіонін	Цистеїн	Глутатіон
Перебіг вагітності без ускладнень						
C/C	21	0,39 (0,17–0,59)	0,09 (0,05–0,19)	5,47 (3,13–10,55)	17,72 (15,71–21,52)	4,18 (2,37–12,26)
C/T	15	0,30 (0,12–0,70)	0,12 (0,09–0,17)	9,73# (6,36–12,38)	21,58 (13,88–31,39)	6,76 (3,99–13,42)
T/T	2	0,60 (0,53–0,66)	0,07 (0,03–0,10)	11,18 (0,39–21,98)	26,05 (14,11–38,00)	27,21 (7,47–46,95)
Перебіг вагітності з ускладненням						
C/C	23	0,52♠ (0,19–0,79)	0,10 (0,09–0,17)	7,37* (5,02–9,16)	21,12 (18,21–25,71)	5,78 (3,86–8,26)
C/T	27	0,18♠ (0,12–0,42)	0,14 (0,09–0,19)	3,89#* (1,16–6,26)	28,38 (17,02–32,62)	7,24 (2,25–19,18)
T/T	8	0,53 (0,38–0,70)	0,07 (0,20–0,11)	1,93 (0,36–7,91)	26,91 (10,17–4,67)	3,04 (0,77–25,90)

Примітка: величини з однаковими позначками в межах однієї колонки статистично відмінні, $P \leq 0,05$ (за тестом Манна–Уїтні).

Аналіз рівня тіолів у плаценті відповідно до генотипу *MTHFR* та наявності/відсутності ускладнень вагітності свідчить про певні відмінності між групами (табл. 2). Найнижчий вміст Met спостерігається у зразках за C/T-носійства та ускладненої вагітності. При цьому він відмінний від значень за C/C-носійства у зразках плаценти породілей тієї самої групи та за C/T-носійства у групі з вагітністю без ускладнень (тест Манна–Уїтні, $P = 0,016$ у кожного з двох порівнянь). Рівень Cys свідчить лише про тенденцію до його підвищення за вагітності з ускладненнями порівняно з відсутністю їх і за C/C-носійства (тест Манна–Уїтні, $P = 0,06$).

Згідно з даними кореляційного аналізу, за C/T-носійства і ускладненої вагітності між рівнем Hcy та іншими показниками існує середньої сили і різної спрямованості кореляція (табл. 3): прямий зв'язок між Hcy та Met, Hcy і Cys та негативний між Hcy і фолатами, Hcy та GSH. У цих самих зразках спостерігається негативна кореляція середньої сили між Cys і GSH. Характер зв'язку Hcy – Met зберігається за ускладнення вагітності і C/C-носійства. Якщо перебіг вагітності відбувається без ускладнень, то виявлено тільки одну асоціацію рівня в парі Hcy – Cys за C/C-носійства. Привертає увагу також те, що позитивна залежність кількості Cys від Hcy у плаценті характерна майже для всіх зразків (за винятком одного).

Асоціація Hcy з усіма дослідженими тіолами цілком відповідає його функції – маркера фолатзалежних процесів. Позитивну залежність між Hcy і Met та негативну з фолатами можна пояснити механізмом реакції реметилювання Hcy, в якій фолати є донорами метильної групи. Нижчий рівень фолатів як субстратів реметилювання асоціюється з накопиченням іншого субстрату реакції – Hcy. Негативна асоціація останнього з фолатами підтверджується не тільки кореляційним, але й множинним регресійним аналізом: $\beta = - 1,6$ ($P = 0,006$).

Згідно з нашими даними, Hcy та Cys негативно корелюють із рівнем GSH – основним регулятором оксидативного статусу клітини. Відомо, що підвищений рівень цих амінокислот супроводжує ниркову недостатність, інфаркти, а також такі ускладнення вагітності, як прееклампсія, передчасні пологи та низька маса новонароджених [34]. Механізм, за яким ці амінотіоли негативно впливають на клітинний метаболізм, достеменно не вивчено. На сьогодні найпоширенішим є уявлення стосовно ролі оксидативного стресу як патогенетичного чинника гіпергомоцистеїнемії [35]. З цим поглядом узгоджуються одержані нами дані щодо зниженого рівня GSH на тлі підвищеного рівня Hcy та Cys. Вільний відновлений Cys лімітує синтез GSH, оскільки його концентрація у

Таблиця 3. Результати кореляційного аналізу за Спірменом (r_s) між рівнем амінотіолів та фолатів залежно від перебігу вагітності

Порівнювані показники	Вагітність без ускладнень		Вагітність з ускладненнями	
	генотип C/C	генотип C/T	генотип C/C	генотип C/T
Hcy – Фолати	-0,39	0,09	-0,24	-0,47 (P = 0,038)*
Hcy – Met	0,20	-0,21	0,46 (P = 0,033)*	0,44 (P = 0,029)*
Hcy – Cys	0,51 (P = 0,021)*	0,24	0,47 (P = 0,029)*	0,63 (P <0,0001)*
Hcy – GSH	-0,20	-0,11	0,30	-0,54 (P = 0,006)*
Cys – GSH	0,35	-0,3	-0,08	-0,55 (P = 0,005)*

Примітка. * Різниця між показниками вірогідна.

клітині значно нижча за $\underline{K}_m$ для γ-глутамілцистеїнсинтази (ЕС 2.3.2.2) [36], яка каталізує першу лімітувальну реакцію в синтезі GSH – утворення γ-глутамілцистеїну. З огляду на це, можна було б очікувати позитивну кореляцію між Cys та GSH. Однак ми, як і Raijmarkers et al. [33], що досліджували вміст амінотіолів у різних органах ембріона людини, спостерігали протилежний зв'язок. Це свідчить, що основні клітинні тіол-дисульфідні системи, в т.ч. відновлений/окислений GSH та Cys/цистин, не знаходяться в редоксній рівновазі і неоднаково змінюються за патофізіологічних умов. Як і D. P. Jones [37], ми припускаємо, що кожна з тіол-дисульфідних пар індивідуально впливає на загальний тіол-дисульфідний баланс.

Особливу увагу привертає той факт, що кореляції між зазначеними вище показниками виявляються, переважно, в разі ускладнення вагітності та за носійства C/T-генотипу. Тобто є підстава вважати, що два чинники – мутована форма ензиму та ускладнення вагітності – адитивні і сприяють тіснішій взаємодії між компонентами системи. Відповідно до сучасних уявлень прееклампсія, яка здебільшого спостерігається при патологічній вагітності, виникає, насамперед, через патологічні процеси у плаценті внаслідок оксидативного стресу в ній, чим спричинюється порушення кровообігу під час її розвитку [34]. Невизначений плацентарний фактор або, ймовірніше, комбінація остаточно нез'ясованих факторів, до яких, вірогідно, належать фрагменти незміненої або апоптотичної плацентарної тканини, пероксиди ліпідів, реактивні похідні кисню тощо, потрапляють до крові матері і призводять безпосередньо до оксидативного стресу в організмі або активують нейтрофіли, зумовлюючи запальну реакцію і окислювальний спалах [38]. Вважають, що існує генетична схильність до виникнення прееклампсії. Згідно з нашими даними, певну роль у цих процесах відіграє носійство мутованої форми *MTHFR*. Як зазначалося вище, інгібування відновлення 5,10-метилен-THF супроводжується накопиченням окисленіших форм THF, які легше катаболізуються [4] і, у такий спосіб, зменшують рівень внутрішньоклітинних фолатів та зумовлюють накопичення Hcy.

Ензими фолатзалежного метаболізму належать до редоксчутливих [35]. Так, за окислювальних умов активність метіонінсинтази зменшується через окислення кофактора кобаламіну та/або Cys у критичному Zn-зв'язувальному домені протеїну. Натомість, активність цистатіонін β-синтази при цьому стимулюється майже вдвічі [35].

Однак досі ще не з'ясовано, чи відбувається транссульфування у плаценті людини, хоча відповідно до даних кореляційного і множинного регресійного аналізу найтісніша кореляція порівняно з іншими показниками спостерігається між вмістом Hcy та Cys (β = 0,38, P = 0,006). Рівень Cys у тканинах залежить від кількох чинників, у т.ч. від надходження його до організму з їжею, синтезу внаслідок транссульфування в обмеженій кількості тканин, транспортування в інші тканини із кров'ю та утворення під час катаболізму протеїнів. Зважаючи на тісну кореляцію між Hcy і Cys у плаценті людини, ми припускаємо наявність у ній шляху трассульфування Hcy.

Отже, оксидативний стрес у плаценті, який є наслідком розвитку прееклампсії та носійства C/T-генотипу *MTHFR*, супроводжується зміною активності фолатзалежних ензимів, що, ймовірно, зумовлює тіснішу асоціацію між продуктами взаємозалежних реакцій. Шляхом трассульфування у плаценті можливе перетворення надлишкової кількості Hcy на Cys і такі його похідні, як таурин. Проте це припущення вимагає подальших досліджень.

Таким чином, установлено, що рівень ключових амінотіолів та фолатів у зразках зрілої плаценти змінюється залежно від присутності у тканині алельних варіантів гена *MTHFR* та наявності/відсутності ускладнень вагітності.

Носійство мутованих форм C677T та T677T гена *MTHFR* у плаценті людини здебільшого зустрічається у зразках плаценти за вагітності з ускладненнями. В разі ускладнення вагітності і наявності C677T-алельних варіантів гена *MTHFR* рівень фолатів та Met знижується порівняно з C677C-носійством і у зразках плаценти за відсутності ускладнень під час вагітності з C677T-генотипом *MTHFR*.

У плаценті людини носійство C677T-алельного варіанта гена *MTHFR* та фенотипові вияви ускладнення вагітності мають адитивний ефект і сприяють тіснішій кореляції між фолатзалежними амінотіолами.

Роботу виконано за підтримання грантами МОН №152-2006, 28-2008, INTAS YSF 06-1000014-5961 та гранта Президента України для обдарованої молоді 2006 року.

УРОВЕНЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ И ФОЛАТОВ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА

О. П. Марценюк[1,2], Ш. Мишланова[3], К. Л. Романец[2], Н. М. Теплюк[4], М. Ю. Оболенская[1]

[1]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
[2]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
[3]Научное отделение Словацкого медицинского университета, Братислава;
[4]Отдел клеточной биологии и раковый центр, Медицинская школа Университета Ворчестер, США;
e-mail: oberih_m@ukr.net

Плацента – это орган, в котором происходят активные метаболические процессы и формируется определенный количественный и качественный набор веществ, поступающих в плод. В связи с высоким уровнем акушерской патологии в Украине, в частности преэклампсии, анемии и др., мы исследовали в плаценте человека фолатзависимые процессы, с нарушением которых связывают возникновение осложнений беременности. Исследование проведено на 38 образцах зрелой плаценты, полученных после беременности без осложнений, и на 58 образцах, полученных после беременности с распространенными в Украине осложнениями.

Мы определили уровень фолатов, компонентов метионинового цикла – метионина и гомоцистеина, связанных с метиониновым циклом цистеина и глутатиона, а также исследовали полиморфизм метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), которая катализирует необратимое превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат – донор метильной группы в метиониновом цикле.

Выяснилось, что генотипы C677T- и T677T *MTHFR* чаще всего наблюдаются в образцах с осложнениями беременности. В образцах плаценты после осложнений беременности и при носительстве C/T-генотипа *MTHFR* уровень всех исследованных аминотиолов и фолатов статистически достоверно, но с неодинаковым направлением, ассоциируется з уровнем гомоцистеина как типичного маркера фолатзависимого метионинового цикла и связанных с ним процессов.

Положительная корреляция гомоцистеина с уровнем цистеина является наиболее значительной и прослеживается во всех вариантах (кроме одного) в зависимости от генотипа, а также наличия–отсутствия осложнений беременности, что в соответствии с нашим предположением не исключает возможного существования пути транссульфирования гомоцистеина в плаценте человека.

Ключевые слова: аминотиолы, фолаты, плацента человека, гомоцистеин, патология беременности.

THE LEVEL OF LOW MOLECULAR THIOLS AND FOLATE IN HUMAN

O. P. Martsenyuk[1,2], C. Mislanova[3], K. L. Romanets[2], N. M. Teplyuk[4], M. Y. Obolenskaya[1]

[1]Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
[2] Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
[3]Slovak Medical University, Bratislava;
[4]Department of Cell Biology and Cancer Center, University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA;
e-mail: oberih_m@ukr.net

Summary

Human placenta is an active metabolic organ. It defines a final set of quantitative and qualitative substances, transferred to the fetus. In view of high level of obstetric complications in Ukraine, in particular, preeclampsia, anemia, etc., we have undertaken a study of folate-dependent metabolism in human placenta. Disturbances of folate-dependent metabolism are considered as causes of pregnancy complications. Investigations carried out on 38 samples of term placenta, obtained after physiological pregnancy, and 58 samples obtained after pregnancy with wide-spread complications typical of Ukraine.

We have estimated the level of folate, components of methionine cycle – methionine and homocysteine, and related with methionine cycle cysteine and glutathione and polymorphism of methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalyzes the irreversible conversion of 5,10-methyl-enetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, which serves as supplier of methyl group for methionine cycle.

We have revealed, that C677T and T677T genotypes of MTHFR are represented more frequently in the samples from complicated pregnancies. In the samples-carriers of C/T genotype of MTHFR and in the group with complicated pregnancies the content of aminothiols and folates correlate in different directions with homocysteine level which serves as a marker of folate-dependent methionine cycle and related processes.

On the basis of possitive correlation between homocysteine and cysteine in all investigated groups with different genotypes and the presence/absence of obstetrical complication we suggest the existence of transsulfuration pathway of homocysteine in the human placenta.

Key words: aminothiols, folate, human placenta, homocysteine, pathology of pregnancy.

1. *Ueland P. M., Vollset S. E.* // Clin. Chem. – 2004. – **50**, N 8. – P. 1293–1295.
2. *Van der Put N. M. J., van Straaten H. W. M., Trijbels F. J. M., Blom H. J.* // Exp. Biol. Med. – 2001. – **226**, N 4. – P. 243–270.
3. *Finkelstein J. D.* // Nutr. Rev. – 2000. – **58**, N 7. – P. 193–204.
4. *Suh J. R., Herbig A. K., Stover P. J.* // Annu. Rev. Nutr. – 2001. – **21**, N 1. – P. 255–282.
5. *Higgins J. R., Quinlivan E. P., McPartlin J. et al.* // BJOG. – 2000. – **107**, N 9. – P. 1149–1154.
6. *de Franchis R., Sebastio G., Mandato C. et al.* // Lancet. – 1995. – **346**, N 8991–8992. – P. 1703.
7. *Shields D. C., Kirke P. N., Mills J. L. et al.* // Am. J. Hum. Genet. – 1999. – **64**, N 4. – P. 1045–1055.
8. *Frosst P., Blom H. J., Milos R. et al.* // Nat. Genet. – 1995. – **10**, N 1. – P. 111–113.
9. *Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Андрушко І. І., Постовітенко К. П.* // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, N 1. – P. 5–17.
10. *Kery V., Poneleit L., Kraus J. P.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – **355**, N 2. – P. 222–232.
11. *Finkelstein J. D.* // J. Nutr. Biochem. – 1990. – **1**, N 5. – P. 228–237.
12. *Finkelstein J. D.* // Semin. Thromb. Hemost. – 2000. – **26**, N 3. – P. 219–225.
13. *Baker D. H., Czarnecki-Maulden G. L.* // J. Nutr. – 1987. – **117**, N 6. – P. 1003–1010.
14. *El-Khairy L., Vollset S. E., Refsum H., Ueland P. M.* // Am. J. Clin Nutr. – 2003. – **77**, N 2. – P. 467–472.
15. *Baker D. H.* // J. Nutr. – 2006. – **136**, N 6. – P. 1670S–1675.
16. *Теплюк Н. М., Лебедева Л. М, Коломиец Л. И. et al.* // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, N 3. – P. 126–134.
17. *Оболенська М. Ю., Чайковська Т. Л., Лебедєва Л. М. та ін.* // Там само. – 1997. – **70**, N 2. – P. 89–97.
18. *Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F.* // Nucl. Acids Res. – 1988. – **16**, N 3. – P. 1215.
19. *Van Amerongen G., Mathonnet F., Boucly C. et al.* // Clin. Chem. – 1998. – **44**, N 5. – P. 1045–1047.
20. *Степанова Е. Н., Коновалова Л. В., Андрейчук Т. В.* // Вопр. питания. – 1972. – N 4. – P. 84–91.
21. *Grossowicz N., Waxman S., Schreiber C.* // Clin. Chem. – 1981. – **27**, N 5. – P. 745–747.
22. *Grossowicz N., Mandelbaum-Shavit F., Davidoff R., Aronovitch J.* // Blood. – 1962. – **20**. – P. 609–616.

23. *Wilson S. D., Horne D. W.* // Clin. Chem. – 1982. – **28**, N 5. – P. 1198–1200.
24. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
25. *Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I. et al.* // J. Nutr. Biochem. – 1999. – **10**, N 8. – P. 490–497.
26. *Houze P., Gamra S., Madelaine I. et al.* // J. Clin. Lab. Anal. – 2001. – **15**, N 3. – P. 144–153.
27. *Реброва О. Ю.* Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с.
28. *Fitzgerald S., Dimitrov D., Rumrill P.* // Work. – 2001. – **16**, N 3. – P. 287–292.
29. *Gasparovic J., Raslova K., Basistova Z. et al.* // Physiol. Res. – 2004. – **53**, N 2. – P. 215–218.
30. *Kang S. S., Wong P. W., Susmano A. et al.* // Am. J. Hum. Genet. – 1991. – **4**8, N 3. – P. 536–545.
31. *Hoppner K., Lampi B.* // Am. J. Clin. Nutr. – 1980. – **33**, N 4. – P. 862–864.
32. *Parle-McDermott A., Mills J. L., Molloy A. M. et al.* // Mol. Genet. Metab. – 2006. – **88**, N 3. – P. 290–294.
33. *Raijmakers M. T. M., Steegers E. A. P., Peers W. H. M.* // Hum. Reprod. – 2001. – **16**, N 11. – P. 2445–2450.
34. *Raijmakers M. T., Zusterzeel P. L., Steegers E. A. et al.* // Obstet. Gynecol. – 2000. – **95**, N 2. – P. 180–184.
35. *Zou C. G., Banerjee R.* // Antioxid. Redox Signal. – 2005. – **7**, N 5–6. – P. 547–559.
36. *Jones D. P.* // Ibid. – 2006. – **8**, N 9–10. – P. 1865–1879.
37. *Raijmakers M. T., Peters W. H., Steegers E. A., Poston L.* // Curr. Pharm. Des. – 2005. – **11**, N 6. – P. 711–734.
38. *Patel P., Vatish M., Heptinstall J., Wang R., Carson R. J.* // Reprod. Biol. Endocrinol. – 1996. – **54**, N 1. – Pt 1. – P. 1–30.

Отримано 23.12.2008