

A metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T mutáció kimutatása kvantitatív valós idejű PCR módszer alkalmazásával HELLP szindrómás betegek mintáiban

NAGY BÁLINT DR., HUPUCZI PETRONELLA DR., SZABÓ GÁBOR DR.,
RIGÓ BARBARA DR., PAPP ZOLTÁN DR.

*Semmelweis Egyetem, ÁOK, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest
(igazgató: Papp Zoltán dr., egyetemi tanár) közleménye*

Összefoglalás: Bevezetés. A metiléntetrahydrofolát-reduktáz C677T mutáció előfordulási gyakoriságát nem vizsgálták még nagyobb számú HELLP szindrómás betegek csoportjában. Praeeklampsziás, HELLP szindrómás és egészséges terhesek csoportjában határoztuk meg az előfordulási gyakoriságát.

Módszer: Kvantitatív valós idejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel határoztuk meg a metiléntetrahydrofolát-reduktáz C677T mutáció előfordulási gyakoriságát 101 praeeklampsziás, 63 HELLP szindrómás és 73 egészséges terhes DNS mintáiban.

Eredmények: Szignifikánsan nagyobb arányban mutattuk ki a TT genotípust a HELLP szindrómás csoportban (25,4%), összehasonlítva az egészséges terhesekkel (8,2%) és a praeeklampsziásokkal (8,9%). A C és T allélok előfordulási gyakorisága szintén ennek megfelelően alakult.

Megbeszélés: Az MTHFR C677T mutáció magasabb előfordulási gyakoriságát figyeeltük meg HELLP szindrómában, míg a praeeklampsziások az egészséges populációban megfigyelhető eloszlást mutatták. Az MTHFR genotípus meghatározás fontos információt adhat a praeeklampsziás és HELLP szindrómás betegek kezelése során.

Kulcsszavak: praeeklampszia, HELLP szindróma, metiléntetrahydrofolát-reduktáz, mutáció, allél

Bevezetés

A terhességek közel 1–5%-a komplikált olyan súlyos klinikai kórképpel, mint a praeeklampszia (PE)(magas vérnyomás, proteinuria). E betegek 20%-ánál kialakulhat a HELLP szindróma, a praeeklampszia életveszélyes formája, ahol az anyai mortalitás akár a 24%-ot, a magzati mortalitás a 50%-ot is elérheti. Weinstein tartotta először önál-

ló entitásnak és nevezte el a jellemző laboratóriumi eltérések alapján (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count) [1, 2, 3, 4].

A praeeklampszia és a HELLP szindróma kialakulási okát még ma sem ismerjük, de feltételezik a genetikai faktor szerepét is [3, 4]. Az elmúlt 10 évben a véralvadási rendszer aktiválódásának kutatása előtérbe került. Számos tanulmány szerint a véralvadásban, a fibrinolízisben bekövet-

kező változások szerepet játszhatnak a pathomechanizmusban [5, 6].

Három mutáció vizsgálata folyik intenzíven a praeclampsia kialakulásában játszott esetleges szerepének a kimutatására. Ezek közül ellentétes eredmények születtek az V. factor Leiden és a metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T mutációkat vizsgáló tanulmányok között praeclampsias betegek csoportjaiban [1, 2].

Nagyobb beteganyagon a HELLP szindrómás betegek csoportjában és homogén populációban nem vizsgálták meg az előfordulási gyakoriságot.

A metiléntetrahidrofolát-reduktáz a folátanyagcsere enzime, amely katalizálja az 5,10-metiléntetrahidrofolát 5-metiltetrahidrofoláttá alakulását, a folyamat során felszabaduló metilcsoport szükséges a homocisztein-metionin átalakuláshoz. Leggyakrabban a C677T (Ala → Val) mutáció fordul elő ezen a génen. A homozigóta mutáns (TT) esetekben az enzimaktivitás közel 70%-kal csökken. A homocisztein-metionin átalakulás hiányos volta miatt a homociszteinszint nő, ami atherosclerosis, stroke, peripheriás vascularis és cardiovascularis betegségek kialakulásához vezethet [7, 8].

Előzőleg praeclampsias betegek csoportjában vizsgáltuk meg az MTHFR C677T mutáció előfordulási gyakoriságát PCR-RFLP módszerrel [9].

A technika fejlődése lehetővé teszi a mutáció kimutatását kvantitatív valós idejű PCR módszerrel, laboratóriumunkban bevezettük *Aslanidis és Schmitz* módszerét [10], és megvizsgáltuk a mutáció előfordulási gyakoriságát praeclampsias, HELLP szindrómás és egészséges terhesek csoportjában.

Anyagok és módszerek

Betegek

A vizsgálatokba bevont betegeket három csoportba soroltuk, egészséges terhes (n=73), súlyos praeclampsias (PE)(n=101) és HELLP szindrómás (n=63). A súlyos PE és a HELLP szindrómás csoportba az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium ajánlása szerint soroltuk be a betegeket. Röviden, PE esetén a szisztolés vérnyomás >160 Hgmm, a diasztolés vérnyomás >90 Hgmm, szignifikáns proteinuriával, HELLP esetén, hemolysis (laktát dehidrogenáz >600 IU/L), emelkedett májenzim értékek (emelkedett aszpartát-aminotranszferáz és alanin-aminotranszferáz (>70 IU/L) és thrombocytopenia megléte voltak a besorolási kritériumok.

A Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte a vizsgálatot, a betegeket tájékoztattuk, és ők beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

MTHFR C677T meghatározás

A betegektől 3 ml EDTA-s vér levétele után 200 µl vérből a DNS-izolálás szilika-adszorpciós módszerrel történt a gyártó utasításai szerint (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche, Mannheim, Németország) [11].

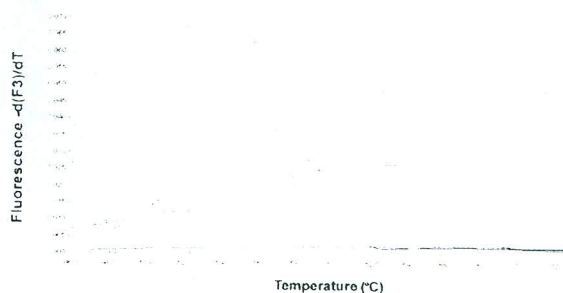
A kvantitatív valós idejű PCR meghatározás *Aslanidis és Schmitz* módszerével történt, az általuk tervezett primerek és próbák (TIB Molbiol, Berlin, Németország) kerültek felhasználásra [10]. Egy mikroliter DNS-t mértünk be a 0,25 µM forward és reverse primert, a 0,2 µM hibridizációs próbákat, a 2,5 mM MgCl₂-t és az egy µl LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes-t (Roche, Penzance, Németország) tartalmazó PCR elegyhez, 10 µl végtérfogatba. A PCR során a kezdeti 10 perces 95 °C-on történő denaturálás után 36 ciklusban, denaturációs (95 °C: 0 sec), annealing (55 °C: 10 sec) és extenziós (72 °C: 20 sec) lépések következtek. Minden futtatáshoz homozigóta és heterozigóta standardokat tettünk fel. Az amplifikációt olvadási görbe analízis követte [5]. A C allél PCR termékének olvadáspontja 61 °C, a T allél PCR termékének olvadáspontja 53 °C, a CT genotípus mindkettőt mutatja.

Statisztikai kiértékelés

Az adatok statisztikai kiértékelése Chi² próbával történt, a szignifikancia szintje p<0,05 értékben határoztuk meg, 95%-os konfidencia intervallummal.

Eredmények

A MTHFR C677T kvantitatív valós idejű PCR módszerrel történő meghatározását *Aslanidis és Schmitz* módszere szerint vezettük be laboratóriumunkban [10]. Az 1. ábra a TT, a



1. ábra A metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T mutáció meghatározása valós idejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel.

(Az ábrán a metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T mutáció kimutatása során keletkező jellegzetes olvadási görbék láthatók. A C allélt hordozó PCR termék olvadási pontja 63°C-nál, a T allélt hordozó PCR termék olvadási pontja 55°C-nál jelentkezik, heterozigóta minta esetében mindkét termék kimutatható.)

CC és a TC genotípusok jellemző olvadási görbét mutatja. Az egyes típusok megbízhatóan elkülöníthetők a PCR termékek olvadáspontjának a meghatározásával.

Az I. táblázat mutatja a MTHFR C677T meghatározások eredményét. Szignifikánsan magasabb arányban fordult elő a TT genotípus (25,4%) a HELLP szindrómás csoportban,

összehasonlítva az egészséges terhesek (8,2%) és súlyos PE (8,9%) csoportjaival ($p=0,03$).

A II. táblázat a C és T allélok előfordulási gyakoriságát mutatja a három csoportban, a T allél 45,2%-ban fordul elő a HELLP szindrómában, míg 32,2% ($p=0,03$) az egészséges terhesekben és 30,2% a súlyos PE-ben ($p=0,008$). Nem mutatkozott különbség a két utóbbi csoportban.

I. táblázat.

Metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T genotípus előfordulási gyakorisága egészséges terhes, súlyos praeclampsias és HELLP szindrómás betegek csoportjaiban

Csoport	„Vad” típus (CC)	Heterozigóta (CT)	Homozigóta (TT)
Egészséges terhes (n=73)	32 (43,8%)	35 (47,9%)	6 (8,2%)
Súlyos praeclampsias (n=101)	49 (48,5%)	43 (42,5%)	9 (8,9%)
HELLP szindrómás (n=63)	22 (34,9%)	25 (39,6%)	16 (25,4%)*

$p=0,03$

II. táblázat

Metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T allélok előfordulási gyakorisága egészséges terhes, súlyos praeclampsias és HELLP szindrómás betegek csoportjaiban

Csoport	C allél	T allél
Egészséges terhes (n=73)	99 (67,8%)	47 (32,2%)
Súlyos praeclampsias (n=101)	141 (69,8%)	61 (30,2%)
HELLP szindrómás (n=63)	69 (54,8%)	57 (45,2%) ^{1,2}

¹ $p=0,03$ (Odds ratio 1.74)

HELLP összehasonlítva az egészséges terhesekkel

² $p=0,008$ (Odds ratio 1.909)

HELLP összehasonlítva a súlyos praeclampsiasokkal

Megbeszélés

Az MTHFR C677T mutáció előfordulási gyakoriságát kvantitatív valósidejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel határoztuk meg magyar terhes populációban. A vizsgált személyek közül 101 súlyos praeclampsias, 63 HELLP szindrómás és 73 egészséges terhes volt. Az egészségesek és a praeclampsiasok között nem mutatkozott különbség az MTHFR C677T genotípusok között. Előzőleg már hasonló eredményeket kaptunk PCR-RFLP módszerrel is [9]. Viszont a HELLP szindrómás csoportban a TT genotípus gyakoribb előfordulása volt megfigyelhető, amely lényegesen különbözik a másik két tanulmányozott csoporttól. A kimutatott C és T allél előfordulási gyakoriságánál is ezt figyeltük meg.

A PE csoportban kapott eredményeink megerősítik Laivuori és mtsai, O'Saughnessy és mtsai, valamint több kutató eredményeit, amelyek különböző populációkból származnak. A legnagyobb beteganyag 283 PE eset adatait tartalmazza [7, 12, 13, 14, 15, 16]. Viszont ezekkel ellentmondó eredményeket közöltek Grandone és mtsai, valamint Sohda és mtsai [17, 18] (olasz-japán). Érdekes, hogy egy populáción belül (két olasz tanulmány) is egymással ellentétes eredményeket közöl [14, 17].

A nemzetközi irodalmat áttekintve egy publikációt találtunk, amely 31 beteg, köztük HELLP szindrómás és egyéb betegek összegyűjtött csoportjában tanulmányozta az MTHFR C677T előfordulási gyakoriságát. A kevert betegcsoport ellenére eredményeik megegyeznek az általunk most közöltekkel [19].

Az irodalomban három thrombophiliával kapcsolatos gén mutációjának a vizsgálata fordul elő leggyakrabban praeclampsias betegeknél. Ezek közül egyedül a II. faktor prothrombin-mutáció-vizsgálatai hoztak egyértelmű eredményeket: nincs összefüggés az előfordu-

lási gyakoriság és a praeeclampsia kialakulásával [1, 2]. Az V. faktor Leiden mutáció meghatározása viszont már ellentétes eredményeket hozott, vannak, akik magasabb előfordulási gyakoriságot találtak PE-ban, köztük mi is, valamint olyanok is, akik azt találták, hogy nincs lényeges eltérés az egészségesektől. Az eltérések a beteg csoportok kialakítása és a vizsgálatba bevont populáció közötti különbségekből adódhatnak. Ez figyelhető meg az MTHFR C677T mutáció vizsgálat során is. Itt egyértelműen megállapítható, hogy PE-ban nincs különbség az előfordulási gyakoriságban, viszont HELLP szindrómában van.

Az egészséges magyar populációban az allél előfordulási gyakorisága megegyezik egy horvát vizsgálat eredményeivel [20].

A vizsgálataink során talált magas T allél előfordulási gyakoriság segít megmagyarázni a HELLP szindróma súlyos kimenetelét

Irodalom

- [1] *Kupferminc MJ.* Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 111–133.
- [2] *Kupferminc MJ.* Thrombophilia and preeclampsia: the evidence so far. *Clin Obstet Gynecol* 2005; 48: 406–415.
- [3] *Nagy B, Rigo J, Fintor L, Romics L, Papp Z, Karadi I.* Distribution of apolipoprotein(a) isoforms in normotensive and severe preeclamptic women. *J Mat Fet Medicine* 1999; 8: 270–274.
- [4] *Nagy B, Toth T, Rigo J, Karadi I, Romics L, Papp Z.* Detection of factor V Leiden mutation in severe preeclamptic Hungarian women. *Clin Genet* 1998; 53: 478–491.
- [5] *Dekker GA, Sibai BM.* Etiology and pathogenesis of preeclampsia. Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1359–1375.
- [6] *Ness RB, Roberts JM.* Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1365–1370.
- [7] *O'Shaughnessy KM, Fu B, Ferraro F, Lewis I, Downing S, Morris NH.* Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in an East Anglian preeclampsia cohort. *Hypertension* 1999; 33: 1338–1341.
- [8] *Raijmakers MT, Zusterzeel PL, Steegers EA, Peters WH.* Hyperhomocysteinemia: a risk factor for preeclampsia? *Eur J Obstet Gynecol* 2001; 95: 226–228.
- [9] *Rigo J Jr, Nagy B, Fintor L, Tanyi J, Beke A, Karadi I, Papp Z.* Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Hypertens Pregnancy* 2000; 19: 163–172.
- [10] *Aslanidis C, Schmitz G.* High-speed methylenetetrahydrofolate reductase C 677 mutation detection on the Light Cycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. Eds. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K-I, Springer, Berlin, 2001.
- [11] *Nagy B, Ban Z, Papp Z.* The DNA isolation method has effect on allele drop-out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 128–132.
- [12] *Laivuori H, Kaaja R, Ylikorkala O, Hiltunen T, Kontula K.* 677 C 677 T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 277–280.
- [13] *Davalos IP, Moran MC, Martinez-Abundis E, Gonzalez-Ortiz M, Flores-Martinez SE, Machorro V, Sandoval L, Figueroa LE, Mena JP, Oliva JM, Tlacuilo-Parra JA, Sanchez-Corona J, Salazar-Paramo M.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 66–69.
- [14] *D'Elia AV, Driul L, Giacomello R, Colaone R, Fabbro D, Di Leonardo C, Florio P, Petraglia F, Marchesoni D, Damante G.* Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 84–87.
- [15] *Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK.* Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 66: 23–29.
- [16] *Kim YJ, Williamson RA, Murray JC, Andrews J, Pletscher JJ, Peraud PJ, Merrill DC.* Genetic susceptibility to preeclampsia: Roles of cytosine-to-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase. 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene cystathione β -synthase, and factor V Leiden. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1211–1217.
- [17] *Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Cappucci G, Paladini D, Martinelli P, Montanaro S, Pavone G, Di Minno G.* Factor V Leiden, C 677 T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1052–1054.
- [18] *Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet* 1997; 34: 525–526.
- [19] *Tranquilli AL, Giannubilo SR, Dell'Uomo B, Grandone E.* Adverse pregnancy outcomes are associated with multiple maternal thrombophilic factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117: 144–147.
- [20] *Lovricevic I, Franjic BD, Tomicic M, Vrkic N, De Syo D, Hudorovic N, Sonicki Z, Loncar R.* 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C 677 T genetic polymorphism in 228 Croatian volunteers. *Coll Antropol* 2004; 28: 647–654.

Nagy B., Hupuczi P., Szabó G., Rigó B., Papp Z.: *Detection of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation by qu-*

quantitative real-time PCR method in patients with HELLP syndrome

The frequency of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism has not been studied in patients with HELLP syndrome. We decided to determine it in Hungarian severe preeclamptic and HELLP syndrome patients.

We determined the distribution of the MTHFR C677T mutation in DNA samples of 73 healthy pregnant, 101 severe preeclamptic and 63 HELLP syndrome effected women using the quantitative real-time PCR method.

We found a significantly higher number of TT genotype (25.4%) in the HELLP syndrome group as compared to the healthy (8.2%) and also in the severe preeclamptics (8.9%)($p=0.03$). However, we found almost the same genotype distribution in the healthy pregnant and preeclamptic groups. The distribution of the C and T alleles showed the same phenomenon. The frequency of the mutant T allele was 45.2% in HELLP syndrome, while it was 32.2% in the healthy pregnant ($p=0.03$), and 30.2% ($p=0.008$) in the severe preeclamptic patients.

We detected a higher frequency of MTHFR C677T mutation in HELLP syndrome patients, using the quantitative real-time PCR method. It can explain the premature vascular disease and venous thrombosis observed in these patients. Determination of MTHFR genotype and the measurement of homocystein levels could be a helpful information in the management of patients having preeclampsia and HELLP syndrome.

Keywords: preeclampsia, HELLP syndrome, methylenetetrahydrofolate reductase, mutation, allele frequency

Levelezési cím:

DR. NAGY BÁLINT

1088 Budapest, Baross u. 27.

Telefon: 459-1500/4248

Fax: 317-6174

E-mail: nabal@noi1.sote.hu
