

ФЕДОТА А. М.¹, РОЩЕНЮК Л. В.², АДМАКИНА А. В.¹, СОЛОДЯНКИН А. С.³

¹ Харьковський національний університет імені В.Н. Каразіна МОН України, Україна, 61077, г. Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: afedota@mail.ru

² Харьковський обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер № 1, Україна, 61000, г. Харків, ул. Карла Маркса, 17, e-mail: okkvd1@gmail.com

³ ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини, Україна, 61023, г. Харків, ул. Пушкінська, 83, e-mail: alex_solod@mail.ru

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ C677T И A1298C ГЕНА *MTHFR* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*, Methylene tetrahydrofolate reductase, 1p36.3, OMIM 607093) расположена в локусе p36.3 длинного плеча 1-й хромосомы. *MTHFR* играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Наиболее изученными SNP гена *MTHFR* являются однонуклеотидные полиморфизмы C677T и A1298C. У гомозигот по полиморфному аллелю T в позиции 677 гена *MTHFR* отмечается термоллабильность фермента и снижение его активности до 70% от среднего значения, полиморфный вариант C в позиции 1298 в гомозиготном состоянии снижает активность *MTHFR* до 60%, что приводит не только к нарушению метаболизма фолатов и процессов метилирования в клетке, но и избыточному накоплению гомоцистеина в плазме крови [5, 12–13, 16]. У дигетерозигот отмечается депрессия функции фермента [5]. В настоящее время известно, что гипергомоцистеинемия является фактором риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, атеросклероза, атеротромбоза, осложнений беременности [7, 17], приводящих к врожденным порокам развития [11], предраковых и раковых состояний колоректальной области [14–15]. Поскольку комбинации генотипов по полиморфным вариантам позиций 677 и 1298 гена *MTHFR* могут приводить к снижению активности фермента и гипергомоцистеинемии в различной степени, представляется актуальным проанализировать распределение генотипов по рассматриваемым SNP у больных псориазом [2–4].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови 201 больного с различными формами псориаза, находящегося на диспансерном учете в ХОККВД № 1. От всех участников исследования или их родственников было получено информированное согласие

на участие в данной работе. Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции «ДНК Diatom DNA Prep 100» («Isogene Lab. Ltd.»). Для полиморфного варианта C677T реакция амплификации проведена с использованием наборов «GenPak *MTHFR* PCR test» («Isogene Lab. Ltd») на термоциклере BIOMETRA T3000 по стандартной методике. Генотипирование полиморфизма A1298C проводилось методом ПДРФ, с использованием однонуклеотидных праймеров [8] и эндонуклеазы рестрикции MboI. Электрофоретический анализ проведен с помощью наборов для электрофореза производителя «АмплиСенс» в 2% и 3% агарозном геле. Маркером молекулярной массы служила ДНК Ladder M50.

Оценка равенства рядов распределения проведена с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 и 0,001 [1].

Результаты и обсуждение

Анализ полиморфных вариантов гена *MTHFR* как возможных предикторов для развития псориаза показал, что частоты аллелей полиморфизмов C677T и A1298C у больных псориазом составили: $P_C = 0,719$, $P_T = 0,281$ и $P_A = 0,667$, $P_C = 0,333$, соответственно.

На основании частот анализируемых аллелей получено теоретическое число генотипов для панмиксной популяции.

Структура популяции соответствует соотношению Харди-Вайнберга, фактическое распределение генотипов статистически значимо не отличается от теоретически ожидаемого при равновесии (табл. 1, 2) для полиморфных вариантов C677T ($df = 2$, $\chi^2_{ст} = 5,99$, $\chi^2_{ф} = 3,04$, $p > 0,05$) и A1298C ($df = 2$, $\chi^2_{ст} = 5,99$, $\chi^2_{ф} = 3,54$, $p > 0,05$) гена *MTHFR*.

При условии, что полиморфные аллели исследуемых позиций внутри одного гена не являются сцепленными, следует ожидать, что ана-

Таблица 1

Распределение генотипов СС, СТ, ТТ по полиморфному варианту С677Т гена *MTHFR* у больных псориазом

Распределение	ТТ		СТ		СС	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
Фактическое	11	5,5	91	45,3	99	49,3
Теоретическое	8	7,9	98	40,4	95	51,7

Таблица 2

Распределение генотипов АА, АС, СС по полиморфному варианту А1298С гена *MTHFR* у больных псориазом

Распределение	АА		АС		СС	
	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
Фактическое	43	43	47	47	9	10
Теоретическое	48	38	44	56	7	6

Таблица 3

Частоты генотипов по полиморфным вариантам С677Т и А1298С гена *MTHFR* у больных псориазом

Генотип	Частота генотипа	Количество наблюдений		Статистики
		теоретически	фактически	
ТТ СС	0,002	6	0	df = 8, $\chi^2_{ст} = 26,12$, $\chi^2_{ф} = 44,0$ p < 0,001
ТТ АС	0,003	12	0	
ТТ АА	0,095	6	9	
СТ СС	0,032	12	3	
СТ АС	0,316	24	30	
СТ АА	0,200	12	19	
СС СС	0,053	6	5	
СС АС	0,168	12	16	
СС АА	0,147	6	14	

лизируемая выборка будет равновесной по всем независимым комбинациям.

Анализ рядов распределения генотипов больных по полиморфизмам С677Т и А1298С показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими (df = 8, $\chi^2_{ст} = 44,0$, $\chi^2_{ф} = 26,12$, p < 0,001) (табл. 3).

Подобные отклонения от равновесия могут означать, что носители одних генотипов, вероятно, обладают селективным преимуществом, других, например ТТСС, ТТАС, — пониженной адаптивностью, и их отсутствие может быть обусловлено действием отбора. Например, исследователями показано [10], что хотя полиморфные варианты гена *MTHFR* вносят вклад в развитие сердечно-сосудистой патологии, являются фактором риска развития артериальной гипертензии, участвуют в патогенезе левожелудочковой систолической дисфункции (*LVSJ*), гетерозиготы по обоим аллелям СТ АС менее склонны к развитию этой патологии, и авторы заключают, что протективность этого генотипа может являться примером молекулярного гетерозиса.

Полученная информация о частотах аллелей и генотипов по исследуемому гену может

быть использована для анализа структуры популяции и процессов, которые в ней происходят, поскольку в различных популяциях, этнических группах и климатогеографических зонах эти параметры неодинаковы. Среди некоторых групп населения и в разных этнических группах генотипы [9], влияющие на обмен гомоцистеина, могут встречаться с частотой до 20%, поскольку нарушения метаболизма могут корректироваться пищевыми фолатами. Супрессия доступности фолиевой кислоты, наблюдаемая при курении, может еще больше усилить вклад отдельных генотипов по полиморфным вариантам гена *MTHFR* в развитие гипергомоцистеинемии [5], что важно учесть при работе с больными псориазом.

Вывод

Генетический анализ полиморфных вариантов С677Т и А1298С гена *MTHFR*, являющихся факторами риска развития нарушений с широким спектром клинических симптомов, показал актуальность их исследования у больных псориазом, что будет продолжено в следующих работах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології.— Харків, 2007.— 288 с.
2. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова.— СПб: Изд-во Н-Л, 2009.— 528 с.
3. Горовенко Н. Г., Ольхович Н. В., Россоха З. І., Пічкур Н. О., Кир'яченко С. П. Вплив поліморфізму С677Т гена МТНFR на фолатний статус та рівень гомоцистеїну в сироватці крові у дітей з когнітивними розладами // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.— К.— Луганськ, 2010.— С. 61–70.
4. Гречанина Е. Я., Гусар В. А. Распространенность полиморфизмов С677Т МТНFR и А66G МТRR генов системы фолатного цикла в популяциях восточной Украины // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.— К.— Луганськ, 2010.— С. 91–97.
5. Родзинский В. Е., Иткес А. В., Галина Т. В., Карпова Е. В., Хотайт Г. Я. Мяндина Г. И. Корреляция различных форм гестоза с генотипом по гену GPIIIα β-цепи интегринина // Акушерство и гинекология.— 2001.— № 6.— С. 53–57.
6. Рыжко П. П., Федота А. М., Воронцов В. М. Генодерматозы: буллезный эпидермолиз, ихтиоз, псориаз.— Харьков: Фолио, 2004.— 334 с.
7. Чорна Л. Б., Макух Г. В., Акопян Г. Р., Заставна Д. В., Прокопчук Н. М. Аналіз поліморфних варіантів генів МТНFR, МTR, МТRR та мутацій генів FV // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.— 2011.— Вип. 13, № 947.— С. 118–124.
8. Armitage P., Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed.— Blackwell Scientific Publications, 1994.— 620 p.
9. Bagheri M., Rad I. A., Omrani M. D., Nanbaksh F. C677T MTHFR and A1298C Mutations in the Methylentetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Recurrent Abortion from the Iranian Azeri Turkish // In. J. of Fert. And Ster.— 2010.— N 3.— P. 134–139.
10. Strauss E., Supinski W, Gluszek J. Pawlak A. L. Compound heterozygosity of MTHFR (677Ct/1298Ac) protects, both normotensive and hypertensive males with cad, against the left ventricular systolic heart insufficiency // J. Hypertension.— 2010.— 28.— P. 344.
11. Doolin M.-T., Barbaux S., McDonnell M., Hoess K., Whitehead A. S., Mitchell L. E. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida // Am. J. Hum. Genet.— 2002.— N 71.— P. 1222–1226.
12. Ioannidis J. P., Ntzani E. E., Trikalinos T. A. 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases // Nat. Genet.— 2004.— N 36 (12).— P. 1243–1244.
13. Guttormsen A. B., Ueland P. M., Nesthus I., Nygard D., Schneede J., Vollse S. E., Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study // J. Clin. Invest.— 1996.— N 98 (9).— P. 2174–2183.
14. Martin D. N., Boersma B. J., Howe T. M., Goodman J. E. Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival BMC // Cancer.— 2006.— № 6.— P. 257.
15. Sazci A., Ergul E., Bayulkem K. Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylentetrahydrofolat reductase gene in patients with essential tremor in Turkey // Mov. Disord.— 2004.— 19.— P. 1472–1476.
16. Tatarsky P., Kucherenko A., Livshits L. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukrain // Cytology and genetics.— 2010.— 44.— N 3.— P. 129–133.
17. Zetterberg H., Regland B., Palmér M., Ricksten A. Increased frequency of combined methylentetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos // Eur. J. Hum. Genet.— 2002.— N 10 (10).— P. 578–579.

FEDOTA A.M.¹, RASCHELYUK L.B.², ADMAKINA A.B.¹, SOLODYANKIN A.S.³

¹ V.N. Karazina Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda str., 4, e-mail: afedota@mail.ru

² Kharkiv regional clinical skin and venereal diseases dispensary № 1,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Karl Marx str., 17, e-mail: okkvd1@gmail.com

³ National Scientific Centre «Institute an experimental and clinical of veterinary medicine»,
Ukraine, 61023, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: alex_solod@mail.ru

ANALYSIS OF POLYMORPHIC VARIANTS C677T AND A1298C OF *MTHFR* GENE IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Aim. Analysis of DNA samples for the study of psoriasis patients SNP C677T and A1298C gene methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). **Methods.** Genealogical analysis of 201 probands and relatives was carried out. Genomic DNA of 201 patients was analyzed by polymerase chain reaction. Testing statistical hypotheses about the association studied genotypes with disease and evaluation of equality of distribution series conducted using χ^2 test at a significance level of 0.05, 0.01 and 0.001. **Results.** Population structure corresponds to the correlation of the Hardy-Weinberg balance, the actual distribution of genotypes was not significantly different from the theoretically expected at balance C677T polymorphisms (df = 2, st = 5.99, f = 3.04, p > 0,05) and A1298C (df = 2, st = 5.99, f = 3.54, p > 0.05). Analysis of the distribution series genotype frequencies for polymorphisms C677T and A1298C *MTHFR* gene in patients showed a statistically significant difference between the theoretically expected and actual frequencies (F = 44.0, p < 0.001). **Conclusion.** The sample of patients with psoriasis shows deviations from balance by combinations of genotypes that are analyzed in the positions of the C677T and A1298 gene *MTHFR*. Such deviation from balance may mean that some genotypes carriers probably have a selective advantage, others — low adaptability.

Keywords: psoriasis, folic acid, homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase.