

УДК 616.831-005.1/6:548.33]:616-074

## ЧАСТОТА ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ С677Т ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ В ОСІБ РІЗНОЇ СТАТІ

*Сухарєва В. А., Гарбузова В. Ю.\*, Атаман О. В.  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2, Суми, Україна, 40007  
(отримано 05.11.2013, опубліковано 15.12.2013)*

Наведено результати визначення С677Т (rs 1801133) поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТНFR) у 124 практично здорових осіб. Встановлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Т) і гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) становить 46, 48,4 і 5,6 %. Серед чоловіків частота осіб-носіїв мінорного алеля (С/Т + Т/Т) більша, ніж серед жінок (P = 0,061). У жінок-носіїв мінорного алеля (С/Т + Т/Т) показники зростання достовірно нижчі, а ІМТ вищий порівняно із жінками, гомозиготними за основним алелем (С/С) (P < 0,001, P = 0,034 відповідно).

**Ключові слова:** однонуклеотидний поліморфізм, метилентетрагідрофолатредуктаза, стать, індекс маси тіла.

\* vikgarbuzova@yandex.ru

### Вступ

Метилентетрагідрофолатредуктаза (МТНFR) – внутрішньоклітинний фермент, що відіграє ключову роль у метаболізмі фолієвої кислоти. Він каталізує відновлення 5, 10-метилентетрагідрофолату в 5-метилтетрагідрофолат. Останній є активною формою фолієвої кислоти, необхідної для утворення метіоніну з гомоцистеїну і далі – S-аденозил-метіоніну, що забезпечує процес метилювання ДНК [1].

Ген МТНFR у людини локалізований на короткому плечі 1 хромосоми (1p36.3), має довжину 20335 п. н. і складається з 11 екзонів, які розділені 10 інтронами [2]. Дефекти в цьому гені є причиною абсолютно різних захворювань із широким спектром клінічних симптомів: відставання у фізичному і розумовому розвитку, перинатальна смерть, васкулярні й нейродегенеративні хвороби, діабет, рак та інші [3; 4; 5]. Сьогодні відомо 686 поліморфізмів поодиноких нуклеотидів гена МТНFR, з них близько 20 призводять до порушень функцій ферменту. Найбільш вивченим є поліморфізм С677Т (rs 1801133), при якому цитозин (С) у 9783 позиції гена замінений на тимін (Т) (677 – позиція нуклеотиду в мРНК). У результаті відбувається перебудова первинної структури білка у сайті

зв'язування фолату – заміна аланіну на валін у 222-й позиції ензиму. При зміні амінокислотної послідовності цієї ділянки дисоціація ферменту з кофактором відбувається занадто швидко для здійснення повноцінної каталітичної функції. Варіант генотипу Т/Т призводить до зниження активності ферменту приблизно до 35 % від середніх значень [6].

Мутантний алель Т677 поширений у різних популяціях світу з високою гетерогенністю. Його частота серед населення нашої планети варіює від повної відсутності у деяких африканських племен до 0,55 в іспанців [7]. З урахуванням цього **метою** даної роботи стало визначення частоти алельних варіантів гена МТНFR в українській популяції серед осіб різної статі.

Подану роботу виконано в рамках науково-дослідної теми "Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб", № держреєстрації 0110 U 005038.

### Матеріали і методи

У дослідженні використана венозна кров 124 практично здорових донорів (63,7 % чоловіків і 36,3 % жінок) віком від 40 до 83 років. Відсутність основних мультифакторіальних хвороб підтверджувалася шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску, проведення біохімічних досліджень.

Поліморфізм 4-го екзона гена MTHFR визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Для цього ампліфікували ділянку промотору зазначеного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'GTGATCCCTATTGGCAGGTTAC3' і зворотного (antisense) – 5'CTGAGAGGAGATCTGGGAAGAA3'.

Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента промотора складалася із 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) та елонгація – 72°C (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С протягом 20 годин із 3 ОД рестриктази HinfI ("Thermo Scientific", США) у буфері R такого складу: 10 мМ тріс-НCl (рН 8,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 9783-й позиції гена MTHFR цитозину перешкоджає рестрикції, а при його заміні на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 334-ї пари азотистих основ) на два фрагменти – 241-ї і 93-ї пар основ (рис. 1).

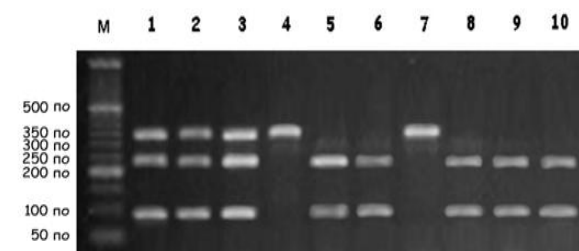


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу C677T поліморфізму гена MTHFR. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 4,7 відповідають C/C-генотипу; доріжки 1, 2, 3 – C/T-генотипу; 5, 6, 8, 9, 10 – T/T-генотипу

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після

електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

**Результати та їх обговорення**

Частота генотипів та алелей за поліморфізмом C677T гена MTHFR відповідала рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 1). Співвідношення генотипів C/C, C/T і T/T серед практично здорових осіб становило відповідно 46,0, 48,4 і 5,6 % (рис. 2). Відмінності у розподілі різних варіантів генотипу між особами чоловічої і жіночої статей за вивченим поліморфізмом виявилися статистично недостовірними (рис. 3). Проте показник  $P$ , визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,061 і був дуже близький до рівня статистичної значущості. Серед чоловіків частота осіб-носіїв мінорного алеля (C/T +T/T) більша, ніж серед жінок.

**Таблиця 1**

Частота генотипів та алелів за поліморфізмом C677T гена MTHFR

Генотипи	n (%)
Гомозиготи C/C	57 (46,0)
Гетерозиготи C/T	60 (48,4)
Гомозиготи T/T	7 (5,6)
C-алель	0,7
T-алель	0,3
	$\chi^2 = 3$
	$P > 0,05$

Примітка. n – кількість пацієнтів;  $\chi^2$  і P відображають відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга

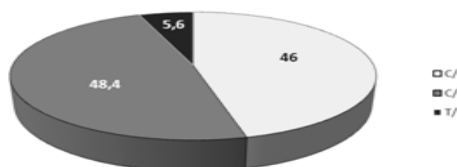


Рис. 2. Частота алельних варіантів гена MTHFR за поліморфізмом C677T серед практично здорових осіб

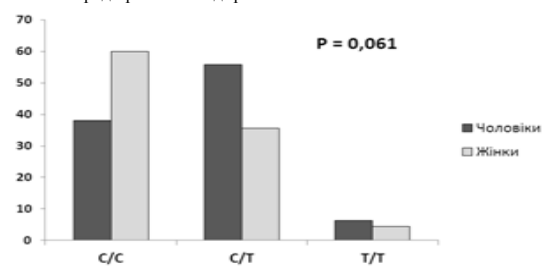


Рис. 3. Частота алельних варіантів гена MTHFR за поліморфізмом C677T у чоловіків (чорні стовпчики) і в жінок (сірі стовпчики). P – статистична значимість відмінності показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона

Порівняння антропометричних показників (зріст, маса тіла, індекс маси тіла (ІМТ)) в осіб чоловічої та жіночої статей залежно від генотипу пацієнтів за С677Т-поліморфізмом гена МТНFR дало такі результати. Гомозиготи за основним алелем (С/С) жіночої статі мали достовірно вищий зріст ( $169,8 \pm 3,7$  см), ніж жінки-носії мінорного алеля (С/Т і Т/Т) ( $156,5 \pm 1,2$  см і  $157,1 \pm 1,3$  см відповідно). Відмінностей у масі тіла серед обстежених жінок з різними варіантами генотипів не виявлено. Розрахунок індексу маси тіла показав, що у жінок із генотипом С/С його величина менша, ніж у носіїв С/Т- і Т/Т-генотипів жіночої статі. Вивчені антропометричні показники достовірно не відрізнялися серед чоловіків з різними генотипами (табл. 2).

Таблиця 2

Антропометричні показники в осіб різної статі залежно від варіантів генотипу за С677Т-поліморфізмом гена МТНFR ( $M \pm m$ )

Показники	Стать	С/С	С/Т	Т/Т	F	P
Зріст, см	Жінки	$169,8 \pm 3,7$ (27)	$156,5 \pm 1,2$ (16)	$157,1 \pm 1,3$ (2)	10,00	< 0,001
	Чоловіки	$167,5 \pm 1,2$ (30)	$168,3 \pm 0,9$ (44)	$168,6 \pm 1,8$ (5)	0,175	0,840
Маса тіла, кг	Жінки	$69,3 \pm 3,88$	$70,9 \pm 1,79$	$69,3 \pm 2,41$	0,177	0,838
	Чоловіки	$75,0 \pm 1,55$	$76,7 \pm 1,69$	$74,2 \pm 2,99$	0,420	0,658
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	Жінки	$23,6 \pm 0,61$	$29,4 \pm 0,78$	$28,4 \pm 0,96$	3,537	0,034
	Чоловіки	$26,6 \pm 0,45$	$27,1 \pm 0,56$	$25,9 \pm 0,87$	0,620	0,539

Примітка. F – критерій Фішера; P – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу; у дужках – кількість пацієнтів

За даними літератури частота Т-алеля коливається у межах від 0,20 до 0,55 серед європейців [8; 9], від 0,11 до 0,35 серед населення Північної Америки [10], від 0 до 0,094 у жителів Африки [11; 12] та від 0,04 до 0,38 в азіатській популяції. За результатами наших досліджень частота мінорного алеля серед обстежених становить 0,30, що відповідає даним для європейської популяції. Частота гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) є достатньо низькою (5,6%), що також знаходиться в межах середньоєвропейських значень [13].

В отриманих нами даних серед чоловіків частота мінорного Т-алеля була більшою, ніж серед жінок. Протилежні результати наведені у праці А. Radha Rama Devi et al. [14]. Серед індійців частота Т-алеля є більшою в осіб

жіночої статі. Останнє підтверджує факт про високу гетерогенність поширення Т-алеля за поліморфізмом С677Т гена МТНFR у різних популяціях та серед осіб різної статі.

Серед досліджених нами антропометричних показників були виявлені відмінності у значенні маси тіла та ІМТ лише серед осіб жіночої статі, що є носіями різних генотипів. У жінок-носіїв мінорного алеля (С/Т і Т/Т) показники зросту були достовірно нижчими, а ІМТ вищими, якщо порівняти із жінками, гомозиготними за основним алелем. Подібні результати були отримані і в дослідженні I. Lambrou et al. у грецькій популяції [15]. Авторами було показано, що серед здорових жінок у постменопаузі ІМТ був достовірно вищий у носіїв мінорного алеля, ніж у гомозигот за основним алелем. Проте в праці T. Taguchi et al. не виявлено зв'язку між генотипом за С677Т поліморфізмом гена МТНFR і величиною ІМТ серед молодих здорових японок [16].

З літературних джерел відомо, що поліморфізм С677Т гена МТНFR асоційований з ризиком вроджених вад розвитку плода (ізолювані дефекти нервової трубки, розщеплення верхньої губи та піднебіння), виникненням серцево-судинних захворювань (ішемічна хвороба серця, ішемічний інфаркт головного мозку, атеросклероз, гіпертонічна хвороба, тромбози та ін.), онкологічної патології (колоноректальний рак, рак молочної залози, яєчників), ускладнень перебігу вагітності, психоневрологічних розладів (мігрень, депресія, безсоння, амнезія, шизофренія)[17; 18; 19; 20]. Вивчення генотипу за цим генетичним маркером має значення у генетичному консультуванні хворих, обстежених вагітників жінок, розробленні ефективних курсів хіміотерапії.

#### Висновки

Співвідношення генотипів С/С, С/Т і Т/Т серед практично здорових осіб становило відповідно 46,0, 48,4 і 5,6 %. У жінок-носіїв мінорного алеля (С/Т+Т/Т) показники зросту достовірно нижчі, а ІМТ вищий порівняно з жінками, гомозиготними за основним алелем (С/С) ( $P < 0,001$ ,  $P = 0,034$  відповідно). Вивчені антропометричні показники достовірно не відрізнялися серед чоловіків з різними генотипами.

#### Перспективи подальших досліджень

З урахуванням ролі С677Т-поліморфізму гена МТНFR у розвитку мультифакторіальних

хвороб подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення асоціації даного генетичного маркера з гострим коронарним синдромом, ішемічним інсультом, цукровим діабетом та ін.

### Список літератури

1. Фетисова И. Н. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / И. Н. Фетисова, М. А. Липин, А. В. Поляков // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 10, № 1. – С. 7–12.
2. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) / P. Goyette, A. Pai, R. Milos [et al.] // *Mamm Genome*. – 1998. – Vol. 9. – P. 652–665.
3. Genetic Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Coronary Artery Disease / F. Rassoul, V. Richte, T. Kuntze [et al.] // *International Journal of Angiology*. – 2000. – Vol. 9. – P. 205–207.
4. Analysis of the MTHFR Gene Linkage Disequilibrium Structure and Association Polymorphic Gene Variants with Coronary Atherosclerosis / E. A. Trifonova, M. G. Spiridonova, T. V. Gabidulina [et al.] // *Russian Journal of Genetics*. – 2012. – Vol. 48, No. 10. – P. 1035–1047.
5. MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. Shrubsole / Y. T. Gao, Q. Cai, X. O. Shu [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2004. – Vol. 13 (2). – P. 190–196.
6. Трифонова Е. А. Генетическое разнообразие и неравновесие по сцеплению в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы / Е. А. Трифонова, М. Г. Спиридонова, В. А. Степанов // *Генетика*. – 2008. – Т. 44 (10). – С. 1410–1419.
7. Спиридонова М. Г. О роли полиморфных вариантов гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний / М. Г. Спиридонова, В. А. Степанова, В. П. Пузырев // *Клинич. Медицина*. – 2001. – Т. 2. – С. 10–16.
8. Van der Put N. M. Is the common 677CT mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis / N. M. van der Put, T. K. Eskes, H. J. Blom // *Q J Med*. – 1997. – Vol. 90. – P. 111–115.
9. Heterogeneity in world distribution of thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase / G. Pepe, O. C. Venegas, B. Giusti [et al.] // *Am J Hum Genet*. – 1998. – Vol. 63. – P. 917–920.
10. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation / J. A. Scheinder, D. C. Rees, Y. T. Liu [et al.] // *Am J Hum Genet*. – 1998. – Vol. 62. – P. 1258–1260.
11. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese and Africans / N. Rosenberg, M. Murata, Y. Ikeda [et al.] // *Am J Hum Genet*. – 2002. – Vol. 70. – P. 758–762.
12. Low frequency of mutated methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C genetics single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Sub-Saharan populations / C. E. Adjalla, E. K. Amouzou, A. Sanni [et al.] // *Clin Chem Lab Med*. – 2003. – Vol. 41. – P. 1028–1032.
13. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide / B. Wilcken, F. Bamforth, Z. Li [et al.] // *J Med Genet*. – 2003. – Vol. 40. – P. 619–625.
14. Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in South Indian population / A. Radha Rama Devi, V. Govindaiah, G. Ramakrishna [et al.] // *Current science*. – 2004. – Vol. 86. – P. 440–443.
15. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with central adiposity and increased androgenicity in healthy postmenopausal women / I. Lambrinou, G. Kaparos, D. Papadimitriou [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. – 2008. – Vol. 159. – P. 233–240.
16. Serum folate, total homocysteine levels and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism in young healthy female Japanese / T. Taguchi, H. Mori, A. Hamada [et al.] // *Asia Pac J Clin Nutr*. – 2012. – Vol. 21 (2). – P. 291–295.

17. Li P. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and susceptibility to ischemic stroke: A meta-analysis / P. Li, C. Qin // *Gene*. – 2013. – P. 378 – 388.
18. Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis / X. Wu, L. Zhao, H. Zhu // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2012. – P. 806-811.
19. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome offspring: a meta-analysis / X. Wu, X. Wang, Y. Chan, S. Jia // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. – 2013. – Vol. 167 (2). – P. 154-159.
20. Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and the Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / D. A. Kennedy, S. J. Stern, I. Matok, M. E. Moretti // *J Cancer Epidemiol*. – 2012. – Vol. 10. – P. 952 – 958.

**ЧАСТОТА ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА C677T ГЕНА  
МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ У ЛИЦ РАЗНОГО ПОЛА**

*Сухарева В. А., Гарбузова В. Ю., Атаман А. В.  
Сумский государственный университет,  
ул. Римского-Корсакова, 2, Сумы, Украина, 40007*

Приведены результаты определения C677T (rs 1801133) полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) у 124 практически здоровых лиц. Установлено, что соотношение гомозигот по основному аллелю (C/C), гетерозигот (C/T) и гомозигот по минорному аллелю (T/T) составляет 46, 48,4 и 5,6 %. Среди мужчин частота лиц-носителей минорного аллеля (C/T+T/T) больше, чем среди женщин (P = 0,061). У женщин-носителей минорного аллеля (C/T+T/T) показатели роста достоверно ниже, а ИМТ выше по сравнению с женщинами, гомозиготными по основному аллелю (C/C) (P < 0,001, P = 0,034 соответственно).

**Ключевые слова:** однонуклеотидный полиморфизм, метилентетрагидрофолатредуктаза, пол, индекс массы тела.

**THE FREQUENCY OF METHYLENETETRAHYDROFOLATEREDUCTASE GENE C677T SINGLE  
NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN INDIVIDUALS OF DIFFERENT SEX**

*Sukhareva V. A., Garbuzova V. Yu., Ataman A. V.  
Sumy State University,  
2, Rymskogo-Korsakova St., Sumy, Ukraine, 40007*

C677T polymorphism (rs 1801133) of methylenetetrahydrofolatereductase gene (MTHFR) in 124 healthy individuals was determined. It was shown that the ratio of major homozygous allele (C/C), heterozygotes (C/T) and homozygotes for the minor allele (T/T) was 46 %, 48.4 % and 5.6 %. Frequency of individuals-carriers of the minor allele (C/T+T/T) among men was higher than among women (P = 0.061). Female carriers minor allele (C/T+T/T) growth was significantly lower, and BMI was higher compared with women who were homozygous for major allele (C/C) (P < 0.001, P = 0.034 respectively).

**Key words:** gene polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase, sex, body mass index.