

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА C667T ГЕНА *MTHFR* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У РУССКИХ ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

© Бушуева О.Ю.¹, Долженкова Е.М.¹, Барышев А.С.¹, Иванова Н.В.¹,
Рыжаева В.Н.¹, Разинькова Н.С.², Полоников А.В.¹

¹ Кафедра биологии, медицинской генетики и экологии, ² кафедра педиатрии
Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: olga.bushueva@inbox.ru

Известно, что повышенный уровень гомоцистеина является одним из основных факторов риска развития ишемической болезни сердца (ИБС). Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) вовлечена в метаболизм фолиевой кислоты и влияет на уровни гомоцистеина в плазме крови. Полиморфизм C677T гена *MTHFR* приводит к снижению функциональной активности фермента. Целью исследования было изучение ассоциации C677T полиморфизма гена *MTHFR* с предрасположенностью к ИБС у русских жителей Центральной России. Материалом для исследования послужили 946 образцов ДНК: 549 пациентов с ИБС и 397 относительно здоровых индивидуумов, сопоставимых по полу и возрасту, без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе и с нормальным уровнем артериального давления. Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени путём дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов. При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов C677T полиморфизма гена *MTHFR* различий между исследуемыми группами обнаружено не было. Таким образом, C677T полиморфизм гена *MTHFR* не оказывает влияния на развитие ИБС у русских жителей Центральной России.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, наследственная предрасположенность, ген *MTHFR*, гомоцистеин.

THE RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM C667T OF THE *MTHFR* GENE AND ISCHEMIC HEART DISEASE RISK IN RUSSIAN POPULATION OF CENTRAL RUSSIA

Bushueva O.Yu.¹, Dolzhenkova E.M.¹, Baryshev A.S.¹, Ivanova N.V.¹,
Ryzhaeva V.N.¹, Razinkova N.S.², Polonikov A.V.¹

¹ Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, ² Department of Pediatrics
of Kursk State Medical University, Kursk

It is well known that individuals with elevated levels of plasma homocysteine are high-risk group for ischemic heart disease (IHD). The methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) enzyme is involved in folate metabolism and influences plasma homocysteine concentrations. The common variant C677T in *MTHFR* gene is associated with the decreased enzyme activity. The aim of this study was to investigate the association of polymorphisms C677T (rs1801133) of the *MTHFR* gene with the risk for IHD in population of Central Russia. We studied DNA samples obtained from 946 subjects, including 549 IHD patients and 397 sex- and age-matched healthy individuals. The polymorphisms were genotyped through a real-time PCR using TaqMan allele-discrimination assays. The comparative analysis showed no difference in allele and genotype frequencies of the *MTHFR* polymorphism between the cases and control groups. The analysis stratified by gender did not reveal the associations of the *MTHFR* gene C677T polymorphism with the IHD risk. The study showed that polymorphism C677T of the *MTHFR* gene is not a susceptibility gene for ischemic heart disease in Central Russia population.

Keywords: ischemic heart disease, genetic predisposition, *MTHFR* gene, plasma homocysteine level.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) в связи с большой распространённостью и неуклонной тенденцией к росту по-прежнему представляет собой серьёзную медико-социальную проблему. Мультифакториальная природа ИБС в настоящее время не вызывает сомнений. Были установлены сотни генов-кандидатов ИБС, однако ведущие молекулярно-генетические механизмы болезни остаются недостаточно изученными [4]. Одним из генов-кандидатов развития ИБС является ген метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), локализованный в коротком плече хромосомы 1p36.3. Наиболее изучен полиморфизм C667T гена *MTHFR* (rs1801133), в котором нуклеотид цитозин С в позиции 677 заменен тимидином Т,

что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата и снижению активности фермента [8, 12].

В литературе имеются исследования взаимосвязи между функциональным полиморфизмом C677T гена *MTHFR* и развитием ИБС, однако результаты данных исследований противоречивы [2, 3, 6, 7, 14, 15, 19].

Несогласованность результатов генетико-эпидемиологических исследований в какой-то степени можно объяснить относительно небольшими размерами исследованных выборок, генетической неоднородностью исследованных популяций, различиями в критериях отбора пациентов и другими факторами, что диктует

необходимость дальнейшего изучения вклада данного гена в предрасположенность к ИБС в других популяциях. Целью настоящего исследования было изучение ассоциации полиморфизма С667Т гена *MTHFR* с риском развития ИБС у русских жителей Центральной России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК популяционной выборки русских жителей, проживающих в Курской области. В исследование было вовлечено 549 больных ИБС, находившихся на стационарном лечении в кардиологических отделениях Курской областной клинической больницы и городской больницы скорой медицинской помощи. Группу сравнения составили 397 практически здоровых добровольцев. Пациенты включались в исследуемую группу после верификации окончательного диагноза заболевания, подтверждённого с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования. Критерием включения индивидов в контрольную группу было отсутствие у них хронических заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, нормальный уровень артериального давления. По полу и возрасту больные не отличались от контрольной группы ($p < 0,05$).

У всех пациентов проводился забор венозной крови. Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма С677Т гена *MTHFR* проводилось методом ПЦР в режиме «реального времени» путём дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием праймеров и зондов, синтезированных компанией «Синтол» (Москва).

Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов с риском развития ИБС использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica 8.0 («StatSoft») и MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма С677Т гена *MTHFR* соответствовало популяционному равновесию Харди–Вайнберга. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов исследуемого полиморфизма гена *MTHFR* в группах больных ИБС и здоровых индивидов представлен в табл. 1.

Из данных таблицы видно, что статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма С677Т гена *MTHFR* между группами не установлено.

Таблица 1

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма С677Т гена *MTHFR* у пациентов с ИБС и здоровых лиц

Аллели, генотипы		Больные (n = 549) n (%) ¹	Контрольная группа (n = 397) n (%) ¹	χ^2 (p) ²	OR (95% CI) ³
Аллели	677С	0,433	0,454	0,02 (0,89)	0,99 (0,81-1,21)
	677Т	0,567	0,546		
Генотипы	677СС	280 (51,0)	196 (49,4)	0,38 (0,54) 1,02 (0,31) 0,40 (0,53)	0,86 (0,54-1,38) 0,79 (0,49-1,26) 1,28 (0,59-2,77)
	677СТ	219 (39,9)	169 (42,6)		
	677ТТ	50 (9,1)	32 (8,1)		

Примечание:

¹ Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом;

² Хи-квадрат и p -уровень значимости ($df = 1$);

³ Отношение шансов с 95% доверительными интервалами.

Таблица 2

Сравнительный анализ частот аллелей полиморфизма C677T гена *MTHFR*
у пациентов с ИБС и здоровых мужчин

Аллели, генотипы		Больные (n = 346) n (%) ¹	Контрольная группа (n = 226) n (%) ¹	χ^2 (p) ²	OR (95% CI) ³
Аллели	677C	0,720	0,695	0,83	0,89
	677T	0,280	0,305	(0,36)	(0,68-1,15)
Генотипы	677CC	183 (52,9)	106 (46,9)	1,96 (0,16)	0,79 (0,56-1,10)
	677CT	132 (38,2)	102 (45,1)	2,76 (0,10)	0,75 (0,53-1,05)
	677TT	31 (9,0)	18 (8,0)	0,17 (0,68)	1,14 (0,62-2,09)

Примечание:

¹ Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом;

² Хи-квадрат и *p*-уровень значимости (*df* = 1);

³ Отношение шансов с 95% доверительными интервалами.

Таблица 3

Сравнительный анализ частот аллелей полиморфизма C677T гена *MTHFR*
у пациентов с ИБС и здоровых женщин

Аллели, генотипы		Больные (n = 203) n (%) ¹	Контрольная группа (n = 171) n (%) ¹	χ^2 (p) ²	OR (95% CI) ³
Аллели	677C	0,692	0,722	0,81	1,16
	677T	0,308	0,278	(0,37)	(0,84-1,59)
Генотипы	677CC	97 (47,8)	90 (52,6)	0,87 (0,35)	1,21 (0,81-1,82)
	677CT	87 (42,9)	67 (39,2)	0,52 (0,47)	1,16 (0,77-1,76)
	677TT	19 (9,4)	14 (8,2)	0,16 (0,69)	1,16(0,56-2,38)

Примечание:

¹ Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом;

² Хи-квадрат и *p*-уровень значимости (*df* = 1);

³ Отношение шансов с 95% доверительными интервалами.

Далее было проведено исследование ассоциаций полиморфизма C677T гена *MTHFR* отдельно у мужчин и женщин. В табл. 2 представлены распределения частот аллелей и генотипов у мужчин исследуемой и контрольной групп. Как видно в представленных в таблице 2 данных, статистически значимых различий между группой больных ИБС и контрольной группой среди мужчин по исследуемому полиморфизму выявлено не было.

Следующим этапом был проведён сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма C677T гена *MTHFR* между группами больных ИБС и здоровыми женщинами (результаты представлены в таблице 3). Однако статистически значимых различий

между группами по исследуемому полиморфизму не наблюдалось.

Фермент *MTHFR* необратимо преобразует 5,10-метилентетрагидрофолат в 5-метилтетрагидрофолат, который является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для синтеза метионина из гомоцистеина (ГЦ). Активность данного фермента может снижаться в результате нуклеотидных замен в кодирующем его гене. Вследствие этого нарушается метаболический путь превращения ГЦ и его содержание в плазме крови увеличивается [5, 11].

Повышение уровня ГЦ в настоящий момент считается одним из факторов риска развития ИБС [10, 18]. Существует несколько теорий, объясняющих механизм патогенеза данного

феномена, к ним относятся эндотелиальная дисфункция клеток, агрегация тромбоцитов, проокислительное воздействие, стимулирование аккумуляции белков в атероме, биосинтез коллагена и т.д. [16].

В крови ГЦ подвергается процессу окисления, в результате которого освобождаются свободные радикалы в виде перекиси водорода и супероксида кислорода, которые оказывают повреждающее действие на эндотелий сосудов. Кроме того, под влиянием ГЦ липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) окисляются с образованием атерогенных частиц, что приводит к ещё большему повреждению эндотелия сосудистой стенки, способствуя отложению в ней холестерина и липидов, пропитыванию белками, нарушению проницаемости, а также тромбогенезу [9]. Вследствие высвобождения активных форм кислорода, перекисное окисление липидов способствует уменьшению активности эндотелиальной синтазы оксида азота (NO), благодаря которой происходит продукция NO, обладающего защитными свойствами, включая вазодилатацию, торможение пролиферации гладкомышечных клеток, снижение агрегации тромбоцитов и других клеток крови. Однако эти защитные свойства NO не могут реализоваться в условиях повышенного уровня ГЦ, что способствует развитию тромбоза [17].

Также одним из эффектов увеличения уровня ГЦ является уплотнение сосудистой стенки из-за увеличения синтеза и накопления в ней коллагена, причём накопление коллагена в клеточном слое происходит параллельно с нарастанием концентрации ГЦ. Независимые исследования продемонстрировали, что свободная тиоловая группа ГЦ играет главную роль в этом процессе. Таким образом, в результате накопления коллагена и пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки происходят её деформация, утолщение и повышение ригидности, что также способствует развитию ИБС [13].

В литературе имеются публикации по исследованию взаимосвязи функционально значимого полиморфизма C677T гена *MTHFR* с риском развития ИБС, однако результаты их противоречивы. В частности, P. Ramkaran et al. обнаружили ассоциацию полиморфизма C677T с риском развития ИБС при анализе популяции жителей Южной Африки [14]. Также W. Chen et al. в своём исследовании подтвердили ассоциацию при исследовании китайской популяции [7]. В недавно проведённом исследовании мы обнаружили ассоциацию данного полиморфизма с развитием атеросклероза нижних конечностей [1].

Однако во многих исследованиях не удалось обнаружить ассоциации вариаций в гене *MTHFR* с развитием ИБС, в частности исследование данных индонезийской популяции A.H. Sadewa et al., как и данные J.L. Anderson et al., подтверждают отсутствие корреляции [3, 15].

Проведённый нами анализ ассоциации полиморфизма C677T гена *MTHFR* не позволил установить взаимосвязи данного локуса с риском развития ИБС в популяции русских жителей Центрального Черноземья. По всей видимости, данный полиморфизм не оказывает влияния на риск развития ИБС в исследованной нами популяции.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-10010).

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Ю.И., Бушуева О.Ю., Жабин С.Н., Иванов С.В., Полоников А.В. Курение как провоцирующий фактор развития диабетической ангиопатии нижних конечностей у мужчин с генотипом 677TT гена метилентетрагидрофолатредуктазы // Клиническая медицина. – 2015. – Т. 93 № 7. – Р. 45-49.
2. Abbate R., Sardi I., Pepe G., Marcucci R., Brunelli T., Prisco D., Fatini C., Capanni M., Simonetti I., Gensini G.F. The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD) // *Thromb Haemost.* – 1998. – Vol. 79, N. 4. – P. 727-730.
3. Anderson J.L., King G.J., Thomson M.J., Todd M., Bair T.L., Muhlestein J.B., Carlquist J.F. A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology.* – 1997. – Vol. 30, N 5. – P. 1206-1211.
4. Andreassi M.G., Botto N., Cocci F., Battaglia D., Antonioli E., Masetti S., Manfredi S., Colombo M.G., Biagini A., Clerico A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease // *Human genetics.* – 2003. – Vol. 112, N 2. – P. 171-177.
5. Banerjee R.V., Matthews R.G. Cobalamin-dependent methionine synthase // *The FASEB journal.* – 1990. – Vol. 4, N 5. – P. 1450-1459.
6. Brugada R., Marian A.J. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction // *Atherosclerosis.* – 1997. – Vol. 128, N 1. – P. 107-112.
7. Chen W., Hua K., Gu H., Zhang J., Wang L. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Disease in a Chinese Population //

- Scandinavian journal of immunology. – 2014. – Vol. 80, N 5. – P. 346-353.
8. *Graham I.M., Daly L.E., Refsum H.M., Robinson K., Brattström L.E., Ueland P.M., Uiterwaal C.S.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project // *Jama*. – 1997. – Vol. 277, N 22. – P. 1775-1781.
9. *Jacobsen D.W.* Hyperhomocysteinemia and oxidative stress time for a reality check? // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2000. – Vol. 20, N 5. – P. 1182-1184.
10. *Klerk M., Verhoef P., Clarke R., Blom H.J., Kok F.J., Schouten E.G.; MTHFR Studies Collaboration Group.* MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis // *Jama*. – 2002. – Vol. 288, N 16. – P. 2023-2031.
11. *Kluijtmans L.A.J., Whitehead A.S.* Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease // *Eur Heart J*. – 2001. – Vol. 22. – P. 294-299.
12. *Langevin S.M., Lin D., Matsuo K., Gao C.M., Takezaki T., Stolzenberg-Solomon R.Z., Vasavi M., Hasan Q., Taioli E.* Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer // *Toxicology letters*. – 2009. – Vol. 184, N 2. – P. 73-80.
13. *Meleady R., Graham I.* Plasma homocysteine as a cardiovascular risk factor: causal, consequential, or of no consequence? // *Nutrition reviews*. – 1999. – Vol. 57, N 10. – P. 299-305.
14. *Ramkaran P., Phulukdaree A., Khan S., Moodley D., Chuturgoon A.A.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indians // *Gene*. – 2015. – Vol. 571, N 1. – P. 28-32.
15. *Sadewa A.H., Sunarti, Sutomo R., Hayashi C., Lee M.J., Ayaki H., Sofro A.S., Matsuo M., Nishio H.* The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Indonesian Javanese population // *Kobe Journal of Medical Sciences*. – 2002. – Vol. 48, N 5/6. – P. 137-144.
16. *Stanger O., Semmelrock H.J., Wonisch W., Bös U., Pabst E., Wascher T.C.* Effects of folate treatment and homocysteine lowering on resistance vessel reactivity in atherosclerotic subjects // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2002. – Vol. 303, N 1. – P. 158-162.
17. *Tanriverdi H., Evrengul H., Tanriverdi S., Kuru O., Selecki D., Enli Y., Kaftan A., Kilic M.* Carotid intima-media thickness in coronary slow flow: relationship with plasma homocysteine levels // *Coronary artery disease*. – 2006. – Vol. 17, N 4. – P. 331-337.
18. *Ueland P.M., Refsum H., Beresford S.A., Vollset S.E.* The controversy over homocysteine and cardiovascular risk // *The American journal of clinical nutrition*. – 2000. – Vol. 72, N 2. – P. 324-332.
19. *Wilcken D.E., Wang X.L., Sim A.S., McCredie R.M.* Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 1996. – Vol. 16, N 7. – P. 878-882.