

ФЕДОТА А.М.¹, РОЩЕНЮК Л.В.², ГОРАЙЧУК И.В.³, ТЫЖНЕНКО Т.В.^{1,4}, АДМАКИНА А.В.^{1,5}✉

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: goraichuk@ukr.net

⁴ Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України, Україна, 61002, г. Харків, ул. Алчевських (ул. Артема), 10, e-mail: tyzhnenko@ukr.net

⁵ Харьковський національний медичний університет МОЗ України, Україна, 61022, г. Харків, пр. Леніна, 4, e-mail: Lyollia@mail.ru

✉ Lyollia@mail.ru, (095) 254-61-99

АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *MTHFR* И *MTRR* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

В настоящее время показано участие генов одноуглеродного метаболизма в патогенезе многих мультифакториальных заболеваний [1–5]. Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат. Последний является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования метионина из гомоцистеина и далее – S-аденозилметионина, играющего важную роль в процессе метилирования ДНК. Метильная группа переносится на витамин В₁₂, который затем отдает ее гомоцистеину, образуя метионин с участием фермента метионинсинтазы (*MTR*). Однако в некоторых случаях В₁₂ может окисляться, что приводит к подавлению *MTR*. Для поддержания активности фермента необходимо восстановительное метилирование с помощью фермента метионинсинтазыредуктазы (*MTRR*).

Наиболее изученными SNP генов *MTHFR* и *MTRR* являются однонуклеотидные полиморфизмы С677Т, А1298С и А66G. У гомозигот по полиморфному аллелю Т в позиции 677 гена *MTHFR* отмечается термолабильность метилентетрагидрофолатредуктазы и снижение его активности до 50%, полиморфный аллель С в позиции 1298 в гомозиготном состоянии также снижает активность гена, что приводит к нарушению метаболизма фолатов и процессов метилирования в клетке, к гипергомоцистеинемии, к развитию мультифакториальных патологий [6, 7]. Известно, что наличие полиморфного аллеля G в позиции 66 гена *MTRR* связано с повышением риска хромосомных патологий плода, spinabifida, склонностью к тромбозам, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии [8]. Последние несколько лет исследова-

ние связи между полиморфными вариантами генов фолатного обмена и псориазом привлекает интерес исследователей разных стран. Псориаз является распространенным хроническим и рецидивирующим заболеванием кожи, характеризующимся эпидермальной гиперплазией, аномальной дифференциацией кератиноцитов и локальным накоплением острых и хронических воспалительных клеток [9]. Высокая распространенность псориаза, приблизительно 2% населения во всем мире [10], специфичность клинических проявлений и изменение качества жизни больных делают исследования этого генодерматоза особенно актуальными.

В литературе представлены результаты анализа «случай-контроль» для выявления связи между полиморфным вариантом 677С/Т гена *MTHFR* и риском развития псориаза [11–13]. Не обнаружено статистически значимой связи между полиморфизмом С677Т гена *MTHFR* и псориазом среди населения Малайзии, что согласуется с австрийскими данными [11] и выводами о европеоидной части популяции. По данным Liew и соавт. (2012), также не было выявлено ассоциаций гена с риском возникновения псориаза в китайской, индийской и малайской этнических группах.

По данным Wang и соавт. (2000), выявлена статистически значимая связь между 677С/Т полиморфизмом гена *MTHFR* и псориазом в китайской популяции [14]. По мнению других авторов, эта находка кажется биологически правдоподобной, так как ген *MTHFR* связан с реакциями метилирования ДНК [15] и нарушения этого процесса могут играть определенную роль в этиопатогене-

зе псориаза [16–18]. Результаты исследований в Чехии показали незначительную ассоциацию полиморфного варианта С677Т гена *MTHFR* с развитием болезни у пациентов с продолжительным течением псориаза. По мнению авторов, это может отражать врожденную предрасположенность в комплексном регулировании транспорта одноуглеродных фрагментов у больных псориазом, и поэтому ген *MTHFR* может быть частью «генетической платформы» псориаза [13].

В то же время исследования ассоциаций генов одноуглеродного метаболизма с риском возникновения псориаза остаются немногочисленными. Неоднозначность полученных результатов и их интерпретации, вероятно, могут быть обусловлены как небольшими размерами выборок, так и этническими особенностями пациентов, что объясняет необходимость изучения псориаза в конкретных группах населения для более детального понимания механизмов работы фолатного цикла у больных. В связи с вышеизложенным целью данного исследования стал анализ полиморфных вариантов С677Т, А1298С и А666Г генов одноуглеродного метаболизма *MTHFR* и *MTRR* у больных с различными формами псориаза в украинской популяции.

Материалы и методы

Сбор первичной информации и биологических образцов больных псориазом проводился на базе ОКВД № 1 г. Харькова. Формы псориаза выделены в соответствии с МКБ-10: артропатический псориаз (L40.5), псориаз обыкновенный (L40.0).

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы периферической крови больных, жителей г. Харькова и Харьковской области. Для экстракции ДНК, амплификации и рестрикции в работе использованы реагенты производства «Isogene Lab.Ltd», «АмплиСенс» (РФ), «Fermentas» (Литва). Экстракция ДНК проводилась с помощью наборов «ДНК Diatom DNA Prep 100» («Isogene Lab.Ltd»). Полиморфный вариант С677Т гена *MTHFR* тестируется с помощью наборов «GenPak *MTHFR* PCR test» («Isogene Lab.Ltd») путем аллель-специфической ПЦР. Для выявления и типирования однонуклеотидных полиморфизмов А1298С гена *MTHFR* и А666Г гена *MTRR* использовались олигонуклеотидные праймеры («Metabion», ФРГ), 5'-ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC-3' и 5'-GTCTCC CAACTTACCCTT CTCCC-3', 5'-CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT-3' и 5'-CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG-3',

соответственно, оцененные с помощью программ BioEdit 7.0.9.0 и AmplifX v. 1.4 («Invitrogen», США). Рестрикционный анализ осуществлялся для детекции полиморфных вариантов А1298С гена *MTHFR* (MboII) и А666Г гена *MTRR* (NdeI). Электрофоретический анализ проводился с использованием 2–3% агарозных гелей. Примеры его результатов представлены на рис. 1, 2.

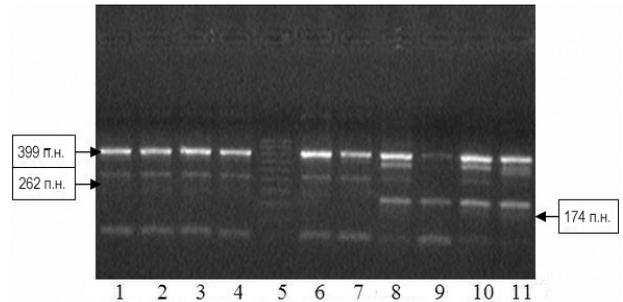


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР специфической последовательности ДНК, генотипированной по однонуклеотидному полиморфизму С677Т гена *MTHFR*: 1–4, 6–7 – гомозиготы по аллелю С; 5 – маркер молекулярной массы; 8, 10 – гетерозиготы СТ; 9, 11 – гомозиготы по аллелю Т

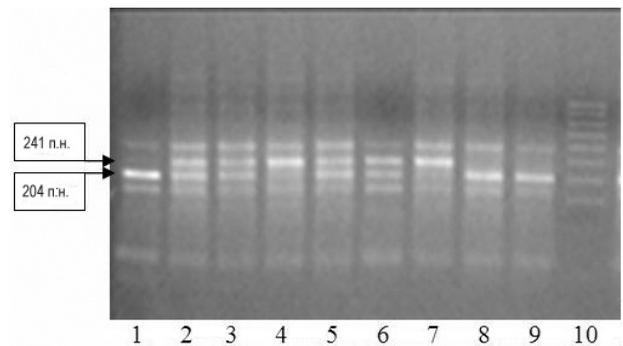


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР (RFLP-PCR) специфической последовательности ДНК, генотипированной по однонуклеотидному полиморфизму А1298С гена *MTHFR*: 1, 8, 9 – гомозиготы по аллелю А; 2, 3, 5, 6 – гетерозиготы АС; 4, 7 – гомозиготы по аллелю С; 10 – маркер молекулярной массы

Проверку распределения количественных дат на соответствие закону нормального распределения выполняли методами Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка [19]. Статистический анализ дат, которые нормально распределяются, проводили параметрическими методами. Оценка равенства рядов распределения выполнена с помощью критерия χ^2 . Статистические гипотезы проверялись на уровнях значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Анализ полиморфных вариантов С677Т, А1298С и А66G генов *MTHFR* и *MTRR* показал, что частоты аллелей однонуклеотидных полиморфизмов для выборки больных в целом составили: $p_c = 0,62$ и $q_T = 0,38$, $p_A = 0,68$ и $q_c = 0,32$, $p_a = 0,34$ и $q_g = 0,66$, соответственно. Для артропатического псориаза частоты аллелей составили: $p_c = 0,67$ и $q_T = 0,33$, $p_A = 0,69$ и $q_c = 0,31$, $p_a = 0,39$ и $q_g = 0,61$, для псориаза обыкновенного: $p_c = 0,58$ и $q_T = 0,42$, $p_A = 0,68$ и $q_c = 0,32$, $p_a = 0,32$ и $q_g = 0,68$. Статистически значимой разницы между формами псориаза по частотам аллелей не обнаружено.

Структура популяции соответствует соотношению Харди-Вайнберга, фактическое распределение генотипов статистически значимо не отличается от теоретически ожидаемого при равновесии для полиморфных вариантов С677Т и А1298С гена *MTHFR* для всех групп больных (табл. 1). Для полиморфного варианта А66G гена *MTRR* отмечается отклонение от равновесия в общей группе больных.

Анализ распределения частот генотипов больных артропатическим и обыкновенным псориазом показал статистически значимую разницу между ними для полиморфного варианта А66G ($p < 0,002$) – среди больных обыкновенным псориазом гомозигот по аллелю дикого типа А меньше.

Значимая разница между анализируемыми группами отмечается также и для однонуклеотидного полиморфизма С677С ($p < 0,02$) – генотип ТТ чаще встречается у больных обыкновенным псориазом. И хотя известно, что носительство аллеля Т в позиции 677 *MTHFR* в гомозиготном состоянии показано как существенный компонент высокого риска развития тяжелых, например, предраковых и раковых состояний, вероятно, развитие артропатического псориаза имеет другие генетические основания. В то же время, по данным Е. Karabasak, более тяжелые формы псориаза встречаются чаще среди больных гетерозигот по полиморфному варианту С677Т гена *MTHFR*, чем среди гомозигот, но степень тяжести заболевания не связана непосредственно с наличием или количеством у больных аллеля Т [20]. Наблюдаемые несоответствия результатов из разных источников об особенностях связи генотипов с отдельными клиническими формами псориаза необходимо анализировать с учетом географических и этнических характеристик населения и больных [21, 22], и они вполне ожидаемы, как уже было показано для полиморфных вариантов гена *MTHFR* [23, 24]. В то же время данных, описывающих участие полиморфного

Таблица 1

Распределение генотипов по полиморфным вариантам С677Т и А66G генов *MTHFR* и *MTRR* у больных псориазом

Ген SNP	Генотип	Фактическое и теоретическое распределение генотипов у больных с разными формами псориаза											
		Псориаз, n=77				Артропатический псориаз, n=27				Обыкновенный псориаз, n=48			
		фак- тич.	теоре- тич.	фак- тич.	теоре- тич.	фак- тич.	теоре- тич.	фак- тич.	теоре- тич.	фак- тич.	теоре- тич.	фак- тич.	теоре- тич.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>MTHFR</i> С677Т	ТТ	7	9,1	11	14,3	1	3,7	3	11,1	6	12,5	9	18,8
	СТ	44	57,1	36	46,8	16	59,3	12	44,4	28	58,3	23	47,9
	СС	26	33,8	30	38,9	10	37,0	12	44,4	14	29,2	16	33,3
p		< 0,16				< 0,22				< 0,31			
<i>MTRR</i> А66G	GG	29	37,7	34	43,6	9	33,3	10	37,0	19	39,6	22	45,8
	AG	44	57,1	35	44,9	15	55,6	13	48,2	27	56,3	21	43,8
	AA	4	5,2	9	11,5	3	11,1	4	14,8	2	4,1	5	10,4
p		< 0,05				< 0,68				< 0,14			
<i>MTHFR</i> А1298С	СС	8	10,4	8	10,4	3	11,1	2	7,4	5	10,4	5	10,4
	АС	33	42,9	33	42,9	11	40,7	12	44,4	21	43,8	21	43,8
	АА	36	46,8	36	46,8	13	48,2	13	48,2	22	45,8	22	45,8
p		< 0,99				< 0,95				< 1,0			

Примечания: SNP – однонуклеотидный полиморфизм, n – количество больных, % – доля больных, p – уровень значимости.

Частоты генотипов по однонуклеотидным полиморфизмам С677Т, С1298Т и А66G генов MTHFR и MTRR у больных псориазом

Генотип	Частота генотипа	Количество больных		Генотип	Частота генотипа	Количество больных	
		теор. ожид.	фактич.			теор. ожид.	фактич.
tT GG	0,034	3	2	CC GG	0,039	3	6
TT AG	0,052	4	3	CC AG	0,059	4	2
TT AA	0,005	1	2	CC AA	0,005	1	0
CT GG	0,215	17	15	AC GG	0,162	12	10
CT AG	0,325	24	28	AC AG	0,245	18	20
CT AA	0,030	2	1	AC AA	0,022	1	2
CC GG	0,127	9	12	AA GG	0,176	14	12
CC AG	0,193	15	13	AA AG	0,267	20	21
CC AA	0,018	1	0	AAAA	0,024	2	2
p	< 0,14	p	< 0,05				

Примечание. p – уровень значимости.

варианта А66G гена *MTRR* в развитии псориаза, в изученной литературе мы не встретили, что открывает перспективы для дальнейших исследований этого гена одноуглеродного метаболизма у больных генодерматозами.

При условии, что полиморфные аллели исследуемых генов не являются сцепленными, ген *MTHFR* локализован в 1p36.3, ген *MTRR* – в 5p15.3-p15.2, следует ожидать, что анализируемые выборки будут равновесными по всем независимым комбинациям. Анализ рядов распределения генотипов по двум генам больных псориазом в целом показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими для полиморфных вариантов А1298С и А66G генов *MTHFR* и *MTRR* (табл. 2), что требует дальнейшего анализа гаплотипов у больных псориазом.

Выводы

Среди больных артропатическим псориазом, который является более тяжелой формой псориаза, гомозиготы по аллелю дикого типа А полиморфного варианта А66G гена *MTRR* встречаются чаще, гомозиготы ТТ по полиморфному варианту С667Т гена *MTHFR* – реже, чем среди больных обыкновенным псориазом, что может свидетельствовать о вкладе других генов в развитие артропатического псориаза. Генетический анализ полиморфных вариантов С667Т и А66G генов *MTHFR* и *MTRR*, являющихся факторами риска развития нарушений с широким спектром клинических симптомов, показывает актуальность их исследования у больных псориазом для развития персонализированной фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nazkia F.H., Sameerb A.S., Ganaie B.Ah. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases // Gene. – 533. – 2014. – P. 11–20.
2. Upendra Y., Pradeep K., Sushil K., Yadav OmP., Mishra V.R. Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis // Metabolic Brain Disease. – 2015. – 30. – P. 7–24.
3. Bueno O., Molloy A.M., Fernandez-Ballart J.D., Garcia-Minguillon C.J., Ceruelo S., Rnos L., Ueland P.M., Meyer K., Murphy M.M. Common Polymorphisms That Affect Folate Transport or Metabolism Modify the Effect of the MTHFR 677C > T Polymorphism on Folate Status // The journal of nutrition. – 2016. – 146, № 1. – P. 1–8.
4. Crider K.S., Yang T.P., Berry R.J., Bailey L.B. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role // Adv. Nutr. – 2012. – 3, № 1. – P. 21–38.
5. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Оденбах Л.А., Ефремова И.В. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 39–43.
6. Tatarsky P., Kucherenko A., Livshits L. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukrain // Cytology and genetics. – 2010. – 44, № 3. – P. 129–133.
7. Owen S.A., Lunt M., Bowes J., Hider S.L., Bruce I.N., Thomson W., Barton A. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms // The Pharmacogenomics Journal. – 2013. – № 13. – P. 137–147.
8. O'Leary V.B., Mills J.L., Pangilinan F., Kirke P.N., Cox C., Conley M., Weiler A., Peng K., Shane B., Scott J.M., Parle-McDermott A., Molloy A.M., Brody L.C. Members of the Birth Defects Research Group: Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association // Molec. Genet. Metab. – № 85. – 2005. – P. 220–227.

9. Krueger J.G., Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – № 64. – P. 6–30.
10. Ni C., Chiu M. Psoriasis and comorbidities: links and risks // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* – 2014. – № 7. – P. 119–132.
11. Liew S., Das-Gupta E., Wong S., Lee N., Safdar N., Jamil A. Association of Methylentetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) 677 C>T gene polymorphism and homocysteine levels in psoriasis vulgaris patients from Malaysia: a case-control study // *Nutrition Journal.* – 2012. – № 11. – P. 1–7.
12. Weger W., Hofer A., Stanger O., Wolf P., El-Shabrawi Y., Renner W., Kerl H., Salmhofer W. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T gene polymorphism is not associated with chronic plaque psoriasis // *Exp. Dermatol.* – 2008. – № 17. – P. 748–751.
13. Vasku V., Bienertova-Vasku J., Necas M., Vasku A. *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase) C677T polymorphism and psoriasis // *Clin. Exp. Med.* – 2009. – № 9. – P. 327–331.
14. Wang B., Fu S., Zhang G., Pu L. Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of methylenetetrahydrofolate reductase // *Chin. Med. Sci. J.* – 2000. – № 15. – P. 119–120.
15. Stern L.L., Mason J.B., Selhub J. Choi S.W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2000. – № 9. – P. 849–853.
16. Ruchatsawat K., Wongpiyabovorn J., Shuangshoti S., Hirankarn N. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis // *J. Mol. Med.* – 2006. – № 84. – P. 175–182.
17. Zhang K., Zhang R., Li X., Yin G., Niu X., Hou R. The mRNA expression and promoter methylation status of the p16 gene in colony-forming cells with high proliferative potential in patients with psoriasis // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2007. – № 32. – P. 702–708.
18. Хайрутдинов В.Р. Генетический паспорт больного псориазом // *Vestn Dermatol Venerol.* – 2011. – № 4. – С. 14–19.
19. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.
20. Karabacak E., Aydin E., Ozcan O., Dogan B., Gultepe M., Cosar A., Muftuoglu T. Methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C>T gene polymorphism as a possible factor for reducing clinical severity of psoriasis // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – № 7 (3). – P. 697–702.
21. Федота А.М., Солодянкин А.С., Солодянкина Е.А., Меренкова И.Н. Структура населения Харьковской области по полиморфизму С 677 Т гена *MTHFR* // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, кліні. імунології та мед. генетики.* – 2011. – Вип. 22. – С. 332–342.
22. Федота А.М., Рыжко П.П., Рощенюк Л.В., Воронцов В.М., Солодянкин А.С. Полиморфизм С677Т гена *MTHFR* у больных псориазом // *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія.* – 2010. – Вип. 12, № 920. – С. 37–41.
23. Wilcken B., Bamforth F., Li Z., Zhu H., Ritvanen A., Redlund M., Stoll C., Alembik Y., Dott B., Czeizel A., Gelman-Kohan Z., Scarano G., Bianca S., Ettore G., Tenconi R., Bellato S., Scala I., Mutchinick O., Lopez M., de Walle H., Hofstra R., Joutchenko L., Kavteladze L., Bermejo E., Martinez-Frias M., Gallagher M., Erickson J., Vollset S., Mastroiaco P., Andria G., Botto L. Geographical and ethnic variation of the 677 C-T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide // *J. Med. Genet.* – 2003. – 40. – P. 619–625.
24. Федота О.М. Генодерматози в дослідженні проблем генетичної безпеки людини: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.15 / Олена Михайлівна Федота. – Харків: Б.в., 2012. – 40 с.

FEDOTA O.M.¹, ROSCHENYUK L.V.², GORAICHUK I.V.³, TYZHNEKO T.V.^{1,4}, ADMAKINA A.V.^{1,5}

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 NSC «Institute an experimental and clinical of veterinary medicine», Ukraine, 61023, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: goraichuk@ukr.net

⁴ Institute of Endocrine Pathology Problems, Ukraine, 61002, Kharkiv, Alchevskih str. (Artyoma str.), 10, e-mail: tyzhnenko@ukr.net

⁵ Kharkiv National Medical University, Ukraine, 61022, Kharkiv, Lenin av., 4, e-mail: Lyollia@mail.ru

ANALYSIS OF SNP'S OF *MTHFR* AND *MTRR* GENES IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Aim. Analysis of single nucleotide polymorphisms C677T, A1298C and A66G of *MTHFR* and *MTRR* one-carbon metabolism genes in patients with various forms of psoriasis in Ukrainian population. **Methods.** A molecular genetic analysis of 77 patients with vulgaris and arthropathic psoriasis by PCR-RFLP was carried out. **Results.** In patients with vulgaris and arthropathic psoriasis analysis of the distribution of frequencies of genotypes showed a statistically significant difference between them for A66G and C677T polymorphic variants. In patients with psoriasis analysis of genotype distribution of series in the two genes as a whole, showed a statistically significant difference between the theoretically expected and actual frequencies for single nucleotide polymorphisms A1298T and A66G of *MTHFR* and *MTRR* genes. **Conclusions.** Among patients with arthropathic psoriasis, which is the most severe form of psoriasis, the homozygotes for the wild-type allele A of A66G of *MTRR* gene are more common, homozygotes of the TT of C667T of *MTHFR* gene are found more rarely than among psoriasis vulgaris patients, which may indicate the contribution of other genes to the development of arthropathic psoriasis.

Keywords: psoriasis, arthropathic psoriasis, folate cycle, *MTHFR* gene, *MTRR* gene.