

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

¹ Харьковський національний університет імені В. Н. Каразіна,
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 Харьковський національний медичний університет,
Україна, 61022, г. Харків, пр. Науки, 4, e-mail: Lyollia@mail.ru

⁴ ННЦ Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини,
Україна, 61023, г. Харків, ул. Пушкінська, 83, e-mail: goraichuk@ukr.net

✉ Lyollia@mail.ru, (095) 254-61-99

ВЕРИФИКАЦІЯ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМА ГЕНОВ *MTHFR* І *MTR* У БОЛЬНИХ ПСОРИАЗОМ

Псоріаз представляє собою системне захворювання з вираженими функціональними і морфологічними змінами ряду органів і систем організму. У частини больних псоріазом розвивається псоріатический артрит, нерідко приводящий до інвалідизації. В зв'язі з значительною поширеністю захворювання, хронічним і важким теченням, постійно удосконалюючись схемами лікування, складністю етіології і патогенезу проблема псоріазу являється однією з актуальних в європейській медицині [1]. Серед факторів, передиспонує до розвитку псоріазу, розглядають підвищений рівень гомоцистеїну (ГЦ) в крові, який може бути обумовлений дієтичеськи або генетичеськи детермінований дефіцитом активної форми фолієвої кислоти. Преобразование фолієвої кислоти в активну форму происходит благодаря ферментам фолатного циклу: *MTHFR* (metylenetetrahydrofolatereductase), *MTR* (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase) і *MTRR* (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferasereductase).

Метилентетрагідрофолатредуктаза (*MTHFR*) каталізує відновлення 5, 10-метилентетрагідрофолату в 5-метилтетрагідрофолат. Последний являється активною формою фолієвої кислоти, необхідною для образования метіоніну з гомоцистеїну і далі – S-аденозилметіоніну, іграючого важку роль в процесі метілювання ДНК. Метильна група переноситься на вітамін В12, який затем отдає її гомоцистеїну, образує метіонін з участієм фермента метіонінсинта-

зы (*MTR*). Однак в деяких випадках В12 може окисляється, що приводить до подавлення *MTR*. Відомо, що поліморфний алель G в позиції 2756 гена *MTR* (OMIM 156570) зв'язаний з підвищенням ризику вроджених пороку серця, бесплодія, гіпертонічеської хвороби, раку молочної залози [2–7].

В літературі представлені результати аналізу зв'язі між поліморфним варіантом 677C/T гена *MTHFR* (OMIM 607093) і ризиком розвитку псоріазу [8–12]. Asefi M. et al. показали, що алель T гена *MTHFR* зв'язаний з значительним збільшенням ризику (1,76 і 7,45 рази для TT і CT генотипів, відповідно) псоріазу. Karabacak E. et al. і Campalani E. et al. також повідомили про зв'язі гена *MTHFR* з тяжістю протекання псоріазу. По результатам Kilic S. et al., у всіх пацієнтів з раннім початком псоріазу (<20 років) були виявлені гетерозиготні і/або гомозиготні генотипи поліморфізмів C677T і A1298C гена *MTHFR*, що свідчить про вирішальну роль гена *MTHFR* в патогенезі псоріазу [12]. По даним Li W.-X. et al., генотипи 677TT і 1298AA гена *MTHFR*, 2756GG і 2756AG гена *MTR*, незалежно друг від друга, корелюють з високим ризиком дефіциту фолієвої кислоти. Результати дослідження визначили, що наявність генотипів AG і GG поліморфізму A2756G гена *MTR* привело не тільки до зменшення сироватки фолієвої кислоти в плазмі крові, але і до підвищеному ризику дефіциту фолатів порівняно з генотипом дикого типу. Крім того, у людей з низьким споживанням фолієвої кислоти, вітамі-

© ФЕДОТА А.М., РОЩЕНЮК Л.В., ТЫЖНЕНКО Т.В., АДМАКИНА А.В., ГОРАЙЧУК И.В., ВОРОНЦОВ В.М.

нов В₆ и В₁₂ наличие аллелей 677Т и 2756G генов *MTHFR* и *MTR* является фактором высокого риска рака молочной железы [13].

В то же время в литературе не представлены данные об исследованиях ассоциаций гена *MTR* с риском развития генодерматозов. Сложившаяся ситуация дает возможность 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 А2756G генов одноуглеродного метаболизма *MTHFR* и *MTR* у больных с различными формами псориаза в украинской популяции.

Материалы и методы

Сбор первичной информации и биологических образцов больных псориазом проводился на базе Областного клинического кожно-венерологического диспансера №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. Экстракция ДНК проводилась с помощью наборов «ДНК Diatom DNA Prep 100». Полиморфный вариант С677Т гена *MTHFR* тестирован с использованием наборов «GenPak *MTHFR* PCR test». Для выявления и типирования однонуклеотидного полиморфизма А1298С гена *MTHFR* использовались олигонуклеотидные праймеры («Metabion», ФРГ), представленные в базе данных «GenBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и оцененные с помощью программ BioEdit 7.0.9.0. и AmplifX v. 1.4 («Invitrogen», США). Рестрикционный анализ проведен для детекции полиморфных вариантов А1298С и А2756G генов *MTHFR* (MboII) и *MTR* (HaeIII). Электрофоретический анализ выполнен в 2–3 % агарозных гелях.

Проверку распределения количественных дат на соответствие закону нормального распределения выполняли методами Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка [14]. Статистический анализ дат, подчиняющихся закону нормального распределения, проводили параметрическими методами. Оценка равенства рядов распределения выполнена с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Проведен молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов С677Т и А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* (табл.). Анализ показал, что частоты аллелей для выборки больных в целом составили: $p_c = 0,62$ и $q_T = 0,38$, $p_A = 0,68$ и $q_C = 0,32$, $p_A = 0,75$ и $q_G = 0,25$, соответственно. Для артропатического псориаза частоты аллелей составили: $p_c = 0,67$, $q_T = 0,33$, $p_A = 0,69$ и $q_C = 0,31$, и $p_A = 0,78$, $q_G = 0,22$, для псориаза обыкновенного: $p_c = 0,58$, $q_T = 0,42$, $p_A = 0,68$ и $q_C = 0,32$, и $p_A = 0,74$, $q_G = 0,26$. Статистически значимой разницы между формами псориаза по частотам аллелей не обнаружено ($p > 0,05$).

Структура популяции соответствует соотношению Харди-Вайнберга для всех изученных полиморфных вариантов во всех группах больных (табл.). Анализ распределения частот генотипов больных артропатическим и обыкновенным псориазом показал статистически значимую разницу между ними для однонуклеотидного полиморфизма С677Т – генотип ТТ в 3,5 раза чаще ($p < 0,02$) 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 [15–17], вероятно, развитие артропатического псориаза имеет другие генетические основания.

Среди больных артропатическим псориазом, который является более тяжелой формой псориаза, гомозиготы по аллелю G полиморфного варианта А2756G гена *MTR* и гомозиготы АА по полиморфному варианту А1298С гена *MTHFR* встречаются реже, чем среди больных обыкновенным псориазом. Генотип 2756GG по гену *MTR* у пациентов с артропатическим и обыкновенным псориазом встречался с одинаковой частотой, хотя среди пациентов с обыкновенным псориазом оказалось больше гетерозигот по генотипу 2756AG, чем при артропатическом, 47,9 % при 37 %. Однонуклеотидный полиморфизм А2756G гена *MTR* связан с аминокислотной заменой, заменой аспарагиновой кислоты на глицин в молекуле фермента метионин-синтазы. В результате этой замены активность фермента изменяется, что приводит к повышенному риску развития псориаза.

Таблица. Распределение генотипов по полиморфным вариантам С677Т, А1298С и А2756G генов *MTHFR* и *MTR* 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			
		Фактич.		Теоретич.		Фактич.		Теоретич.		Фактич.		Теоретич.	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
MTHFR C677T	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	39,0	10	37,0	12	44,4	14	29,2	16	33,3
p		< 0,16				< 0,22				< 0,31			
		n=77*				n=27				n=48			
MTHFR A1298C	CC	8	10,4	8	10,4	3	11,1	2	7,5	5	10,4	7	11,7
	AC	33	42,9	33	42,9	11	40,7	12	44,4	21	43,8	29	48,3
	AA	36	46,8	36	46,8	13	48,2	13	48,1	22	45,8	27	40,0
p		< 0,99				< 0,95				< 0,89			
		n=77*				n=27				n=48			
MTR A2756G	GG	2	2,6	5	6,5	1	3,7	1	3,7	1	2,7	3	6,3
	AG	34	44,2	29	37,7	10	37,0	9	33,3	23	47,9	19	39,6
	AA	41	53,3	43	55,8	16	59,3	17	62,9	24	50,0	26	54,2
p		< 0,25				< 0,96				< 0,48			

Примечания: SNP – однонуклеотидный полиморфизм; n – количество больных; % – доля больных; p – уровень значимости; * – у двух пациентов была выявлена другая форма псориаза, поэтому они не включены в группы артропатического и обычного псориаза.

По результатам исследования ученых [12] выявлен повышенный риск развития псориаза в 12,4 раза и 17,0 раз у пациентов с ранней манифестацией, имеющих точковые мутации в позициях 677 и 1298 гена *MTHFR* соответственно. Согласно Li W.-X. et al. [17], генотипы ТТ, АГ и GG, АГ и GG полиморфных вариантов С677Т, А66G, А2756G генов *MTHFR*, *MTRR* и *MTR* соответственно независимо друг от друга, снижают уровень сывороточного фолата и повышают риск дефицита фолиевой кислоты. Исследования связи однонуклеотидных полиморфизмов гена *MTHFR* с обыкновенным псориазом в различных странах показали противоречивые данные, что является результатом различия этнических групп [8, 9, 18, 19]. Частота аллеля Т гена *MTHFR* меняется в различных регионах мира и среди этнических групп, распространенность полиморфизма С677Т гена *MTHFR* колеблется от 0,20 до 0,55 среди групп населения [5, 12, 20].

Наблюдаемые несоответствия результатов из разных источников об особенностях связи генотипов с отдельными клиническими форма-

ми псориаза необходимо анализировать с учетом географических и этнических характеристик населения и больных, как уже было показано для полиморфных вариантов гена *MTHFR*. В то же время данных, описывающих участие полиморфного варианта А2657G гена *MTR* в развитии псориаза, в литературе представлено мало, что открывает перспективы для дальнейших исследований этого гена одноуглеродного метаболизма у больных генодерматозами.

Анализ рядов распределения генотипов по двум генам больных псориазом в целом не показал значимой разницы между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими для полиморфных вариантов С677Т и А2756G генов *MTHFR* и *MTR* ($\chi^2 = 6,25$, $\chi_{cm} = 15,51$, $p > 0,05$), что требует дальнейшего анализа гаплотипов у больных псориазом. У больных псориазом ни разу не встретилось сочетание ССGG генотипов. В то же время более частым оказалось сочетание СТАГ и СТАА. Комбинация СТАА встречалась с одинаковой частотой среди паци-

ентов с обыкновенным и артропатическим псориазом (54,16 % при 45,83 % соответственно $p > 0,05$). Генотип СТАГ в группе пациентов с артропатическим псориазом встречался в 3,75 раза реже, чем среди пациентов с обыкновенным псориазом (21,05 % и 78,94 % соответственно, $p < 0,01$). Отдельные сочетания аллелей разных локусов (гаплотипы) могут давать высокоприспособленный фенотип, сочетание других аллелей дает фенотипы с пониженной адаптивностью.

Выводы

Больные артропатическим псориазом (более тяжелой формой) в два раза реже являются носителями низкофункционального аллеля G полиморфного варианта A2756G гена *MTR* и реже гомозиготами TT по полиморфному варианту C667T гена *MTHFR*, чем больные обыкновенным псориазом, что является одним из аргументов генетической гетерогенности псориаза. Лица с гомозиготными и/или гетерозиготными генотипами имеют дополнительный фактор риска развития псориаза из-за плейотропного действия гена *MTHFR*, которое влияет на метаболизм фолиевой кислоты в результате дисрегуляции эпигенетического механизма.

Литература

1. Брынина А.В., Хворик Д.Ф. Роль триггерных факторов в патогенезе псориаза, ассоциированного с сердечно-сосудистой патологией // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 4. – С. 10–14.
2. López-Cortés A., Jaramillo-Koupermann G., J. Muñoz M., Cabrera A., Echeverría C., Paz-y-Miño C. Genetic polymorphisms in *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G) and *MTRR* (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the ecuadorian population // The American Journal of the Med Sciences. – 2013. – V. 346, № 6. – P. 447–454.
3. De Cássia R., Barbosa C., Menezes Da Costa D., Francellino Cordeiro D.E., Freitas Vieira A.P., Baram Rabenhorst S.H. Interaction of *MTHFR* C677T and A1298C, and *MTR* A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in north-east Brazil // Anticancer research. – 2012. – № 32. – P. 4805–4812.
4. Qin X., Li J., Cui Y., Liu Z., Zhao Z., Ge J., Guan D., Hu J., Wang Y., Zhang F., Xu X., Wang X., Xu X., Huo Y. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults // Nutrition Journal. – 2012. – № 1. – P. 2–11.
5. Weiner A.S., Boyarskikh U.A., Voronina E.N., Mishukova O.V., Filipenko M.L. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level // Gene. – 2014. – V. 533, № 1. – P. 168–172.
6. Zhao J.Y., Qiao B., Duan W.Y., Gong X.H., Peng Q.Q., Jiang S.S., Lu C.Q., Chen Y.J., Shen H.B., Huang G.Y., Jin L., Wang H.Y. Genetic variants reducing MTR gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations // Eur Heart J. – 2014. – V. 35, № 11. – P. 42–733.
7. Kurzawski M., Wajda A., Malinowski D., Kazienko A., Kurzawa R., Drozdziak M. Association study of folate-related enzymes (MTHFR, MTR, MTRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population // Genet. Mol. Biol. – 2015. – V. 38, № 1. – P. 42–47.
8. Wu D., Shi D., Yang L., Zhu X. Association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and psoriasis: A meta-analysis // J Dermatol. – 2016. – № 43. – P. 162–169.
9. Vasku V., Bienertova-Vasku J., Necas M., Vasku A. MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) C677T polymorphism and psoriasis // ClinExp Med. – 2009. – № 9. – P. 31–327.
10. Asefi M., Vaisi-Raygani A., Khodarahmi R., Nemati H., Rahimi Z., Vaisi-Raygani H., Tavilani H., Pourmotabbed T. Methylenetetrahydrofolate reductase (rs1801133) polymorphism and psoriasis: contribution to oxidative stress, lipid peroxidation and correlation with vascular adhesion protein 1, preliminary report // J. Eur. Acad. Dermatol Vener. – 2014. – № 28. – P. 8–1192.
11. Karabacak E., Aydin E., Ozcan O., Dogan B., Gulpepe M., Cosar A., Muftuoglu T. Methylenetetrahydrofolate 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.
12. Kilic S., Ozdemir O., Silan F., Isik S., Yildiz O., Karaagacli D., Silan C., Ogretmen Z. Possible association between germline methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and psoriasis risk in a Turkish population // ClinExpDerma. – 2015. – № 42. – P. 8–13.
13. Qiao J.H., Jiao D.C., Lu Z.D., Cui S.D., Liu Z.Z. Association of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms with breast cancer risk and interaction with folate, vitamin B6, and vitamin B12 intakes // Tumour. Biol. – 2014. – № 35. – P. 11895–11901.
14. Атраментова Л.О., Утєвська О.М. Статистичні методи в біології. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.
15. Weiwei Z., Liping C., Dequan L. Association between dietary intake of folate, Vitamin B6, B12 and MTHFR, MTR and breast cancer risk // Pak. J. Med. Sci. – 2014. – № 30 (1). – P. 106–110.
16. Zhang J., Zhou Y.W., Shi H.P., Wang Y.Z., Li G.L., Yu H.T., Xie X.Y. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTRR), and methionine synthase reductase (MTR) gene polymorphisms and adult meningioma risk // J Neurooncol. – 2013. – № 115 (2). – P. 9–233.

17. Li W.-X., Dai S.-X., Zheng J.-J., Liu J.-Q., Huang J.-F. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G and *MTRR* A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency // *Nutrients*. – 2015. – № 7 (8). – P. 6670–6687.
18. Kofink D., Boks M.P., Timmers H., Kas M.J. Epigenetic dynamics in psychiatric disorders: environmental programming of neurodevelopmental processes // *NeurosciBiobehav Rev*. – 2013. – № 37. – P. 45–831.
19. Baiqiu W., Songbin F., Guiyin Z., Pu L. Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of methylenetetrahydrofolate reductase // *Chin Med Sci J*. – 2000. – № 15. – P. 20–119.
20. Zhao M., Wang L.T., Liang G.P., Zhang P., Deng X.J., Tang Q., Zhai H.Y., Chang C.C., Su Y.W., Lu Q.J. Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4T cells of psoriasis vulgaris // *ClinImmunol*. – 2013. – № 150. – P. 22–30.

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

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 Kharkiv National Medical University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Nauky av., 4, e-mail: Lyollia@mail.ru

⁴ National Scientific Centre "Institute an experimental and clinical of veterinary medicine",

Ukraine, 61023, Kharkiv, Pushkinska str., 83, e-mail: goraichuk@ukr.net

VERIFICATION ALLELIC POLYMORPHISM'S OF GENES *MTHFR* AND *MTR* IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Aim. Analysis of single nucleotide polymorphisms C677T, A1298C and A2756G of *MTHFR* and *MTR* 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 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 A2756G of *MTHFR* and *MTR* genes. **Conclusions.** Among patients with arthropathic psoriasis, which is the most severe form of psoriasis, the homozygotes for the wild-type allele G of A2756G of *MTR* gene are more rarely, homozygotes of the TT of C677T of *MTHFR* gene are found more common 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, *MTR* gene.