

*Originalni rad/
Original article*

UČESTALOST MUTACIJA U *MTHFR* GENU
KOD BOLESNIKA SA TROMBOZAMA
THE FREQUENCY OF MUTATIONS IN THE
MTHFR GENE IN PATIENTS WITH
THROMBOSIS

Katarina Bačulov¹, Nataša Vučinić², Jelena Stojčević
Maletić³, Jovana Drljača⁴, Iva Barjaktarović⁵

Correspondence to:

Asist. Katarina Bačulov

Katedra opšteobrazovnih predmeta,
Medicinski fakultet
Univerzitet u Novom Sadu,
e-mail: katarina.baculov@mf.uns.ac.rs

¹ Katedra opšteobrazovnih predmeta, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

² Katedra za farmaciju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

³ Katedra za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

⁴ Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

⁵ Katedra opšteobrazovnih predmeta, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Key words

MTHFR polymorphism, C677T mutation, A1298C mutation, myocardial infarction, cerebrovascular insult

Ključne reči

MTHFR polimorfizam, mutacija C677T, mutacija A1298C, infarkt miokarda, cerebrovaskularni insult

Abstract

Introduction: Methyltetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) encodes the enzyme responsible for the metabolism of folic acid, which further participates in the metabolism of homocysteine and its disrupted level in the blood leads to the formation of cardiovascular diseases. The two most common polymorphisms of the *MTHFR* gene are the substitution of cytosine with thymine at position 677 (C677T) and the replacement of adenine with cytosine at position 1298 (A1298C). The main aim of this study was to determine the frequency of *MTHFR* C677T and *MTHFR* A1298C mutations in patients with thromboses. **Material and Methods:** In the research we included patients hospitalized at the Clinical Center of Vojvodina who suffered myocardial infarction or cerebrovascular insult due to the formation of a platelet plug in the blood vessels. Genotypes of *MTHFR* C677T and *MTHFR* A298C polymorphisms for each patient were determined using a real time PCR method. **Results:** For the *MTHFR* C677T polymorphism was found 50% heterozygous, 40% homozygous for wild type alleles, and the homozygous rate for mutated allele was only 10%. For the *MTHFR* A1298C mutation, it has been established that the heterozygote frequency is 25%, the homozygous for the wild type of gene is 70%, and the homozygous for mutated allele is only 5%. **Conclusion:** In this study, we found that the most common type of allele for both *MTHFR* mutations is wild type allele in patients with some form of thrombosis or cerebral hemorrhage, thus the cause of their disease may be the consequence of variant of some other genes that are also important for blood coagulation.

UVOD

Zvanično ime *MTHFR* gena je 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza gen. Citogenetska lokacija *MTHFR* gena je na kratkom kraku hromozoma 1 na poziciji 36.32 (1p36.3)⁽¹⁾. Gen 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*) kodira enzim koji se zove metilentetrahidrofolat reduktaza. Metilentetrahidrofolat reduktaza je važna za hemijske reakcije koje uključuju forme vitamina folata (zvanog još i folna kiselina ili vitamin H). Ovaj enzim konvertuje 5,10-metilentetrahidrofolat u 5-metiltetrahidrofolat. Ova reakcija je jedna od neophodnih za pretvaranje homocisteina u

metionin. Metionin se dalje konvertuje i važan je u mnogim biološkim reakcijama, kao što je metilacija DNK. Glavni kofaktori ovog puta su vitamini B6 i B12^(2,3).

Folat je esencijalan za metabolizam homocisteina, jer pomaže održavanje normalnog nivoa ove aminokiseline. Folat je forma vitamina B čija je funkcija još i da prenosi i aktivira jednogljene jedinice, rastvorljiv je u vodi i nalazi se normalno u hrani. Jednogljene metabolizam je potreban za remetilaciju homocisteina u metionin. Narušavanje normalnog metabolizma jednogljene komponenti (deficit folata) dovodi do nastanka mnogih bolesti.

Poremećen nivo homocisteina u krvi dovodi do mogućeg nastanka kardiovaskularnih bolesti (4-5). Veruje se da povećan nivo homocisteina dovodi do oštećenja endotelijalnih ćelija, smanjenoj fleksibilnosti krvnih sudova i narušenoj homeostazi (6-7).

Dve polimorfne varijante *MTHFR* gena, 677 C>T i 1298 A>C, otkrivene su pre nešto više od 20 godina i od tada su bile predmet ispitivanja i asocijacije sa različitim medicinskim stanjima (8).

Jedna od veoma čestih varijanti širom sveta jeste zamena citozina timinom u poziciji 677 u *MTHFR* genu (C677T)⁽⁹⁾. Ova zamena u *MTHFR* genu produkuje formu metilentetrahidrofolat reduktaze koja ima smanjenu aktivnost na visokim temperaturama, jer u enzimu dolazi do zamene alanina valinom (Ala222Val). Ljudi koji imaju ovakvu formu enzima imaju i povećan nivo homocisteina u krvi. Varijanta C677T povezana je sa povećanim rizikom nastanka kardiovaskularnih oboljenja, uključujući koronarne bolesti srca i cerebrovaskularni insult kod odraslih. Takođe, može uticati i na povećanje krvnog pritiska kod trudnica (9-12).

Opisana je i druga mutacija istog gena. U ovoj mutaciji dolazi do zamene adenina citozinom u nukleotidu 1298 (A1298C) što dovodi do supstitucije glutamina alaninom u *MTHFR* proteinu (Glu429Ala). Mutacija A1298C, kao i C677T mutacija, rezultuje u smanjenju *MTHFR* aktivnosti što je više izraženo kod homozigota (CC) nego kod heterozigota (AC) ili normalnog (AA) genotipa, ali ne dovodi do stvaranja termolabilnog proteina (9). Slično kao i kod C677T varijante, i A1298C mutacija povezana je sa nastankom nekih tipova kancera i leukemije. Kombinacija C677T i A1298C mutacija snažno je povezana sa nastankom Alchajmerove bolesti i migrene (9-11).

Cilj rada bio je da se utvrdi učestalost mutacija *MTHFR* C677T i *MTHFR* A1298C kod bolesnika sa trombozama, koje mogu biti uzrok infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog insulta kao i povezanosti ovih mutacija sa nastankom navedenih bolesti.

MATERIJAL I METODE

U ovom radu korišćeni su uzorci krvi dvadeset pacijenata iz Kliničkog centra Vojvodina. Svi pacijenti su bili hospitalizovani zbog infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog insulta čiji uzrok je formiranje trombocitnog čepa u krvnim sudovima. Svi pacijenti potpisali su informisani pristanak i studija je odobrena od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Novom Sadu kao i Etičke komisije Kliničkog centra Vojvodine. Pacijentima se vadila krv iz prsta koja se zatim pipetirala na sterilni filter papir. Krvne mrlje su se sušile na vazduhu najmanje dva sata i koristile su se za izolaciju DNK.

Jedna krvna mrlja je uzeta i isečen je kvadrat površine 3 x 3 mm koji je potom stavljen u sterilnu epruvetu zapremine 1,5 ml. Pomoću ustaljenog protokola i InstaGene Matrix reagensa (BioRad, Germany) izolovana je DNK. Ovaj reagens lizira membrane, ćelijsku i jedarnu, i istovremeno razgrađuje proteine u uzorku. InstaGene Matrix dozvoljava laku i brzu izolaciju DNK koja se zatim koristi kao matrica u lančanoj reakciji polimeraze (PCR, *polymerase chain reaction*). Jednostavno kuvanje u prisustvu matrixa dovoljno je za lizu ćelija, jer matrix efikasno absorbuje produkte lize ćelija koji mogu da ometaju PCR amplifikaciju.

Za umnožavanje *MTHFR* gena napravljena je reakciona smeša koja je sadržala 12,5 µl master mixa (rastvor nukleotida i Taq polimeraze u odgovarajućem puferu), 1 µl smeše prajmera i probi (sa obeleživačima za normalan i mutiran alel) i dodata je u svaku kivetu u kojoj se već nalazila DNK.

Pacijenti su testirani na prisustvo *MTHFR* C677T i/ili *MTHFR* A1298C mutacija. U ovom radu za detekciju mutacija je korišćena TaqMan PCR metoda. Esej uključuje neobeležene *forward*-nizvodne i *reverse*-uzvodne prajmere kao i dve odgovarajuće fluorescentne TaqMan oligonukleotidne probe (alel 1-specifična proba obeležena sa VIC fluoroforom, alel 2-specifična proba obeležena sa FAM fluoroforom). U specifikaciji za fluorescentne boje je navedeno koja boja označava mutaciju, a koja divlji tip gena. Korišćene su FAM i VIC fluorescentne boje (obeleživači) i to tako da VIC kod *MTHFR* C677T označava divlji tip, a FAM kod *MTHFR* A1298C označava divlji tip. Na grafiku na X osi je uvek VIC.

VIC i FAM reporter boje kovalentno se vezuju za 5' krajnje baze na obe probe, a nefluorescirajući prigušivač se vezuje u blizini 3' krajeva proba. Eseji koji su korišćeni dizajnirani su od strane Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) kompanije i imaju sledeće sekvence:

C677T *forward* prajmer-

5'GCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT;

C677T *reverse* prajmer-

5'CCTCAAAGAAAAGCTGCGTGATG;

C677T reporter 'C', 5'-VIC boja-

ATGAAATCGGCTCCCGC-NFQ;

C677T reporter 'T', 5'FAM boja-ATGAA-

ATCGACTCCCGC-NFQ;

A1298C *forward* prajmer,

5'GGAGGAGCTGCTGAAGATGTG;

A1298C *reverse* prajmer,

5'TGGTTCTCCCGAGAGGTAAGA;

A1298C reporter 'A', 5'-VIC boja CCAGTGAAGAAAGT-GTC-NFQ;

A1298C reporter 'C', 5'-FAM boja CAGTGAAGCAAGT-GTC-NFQ.

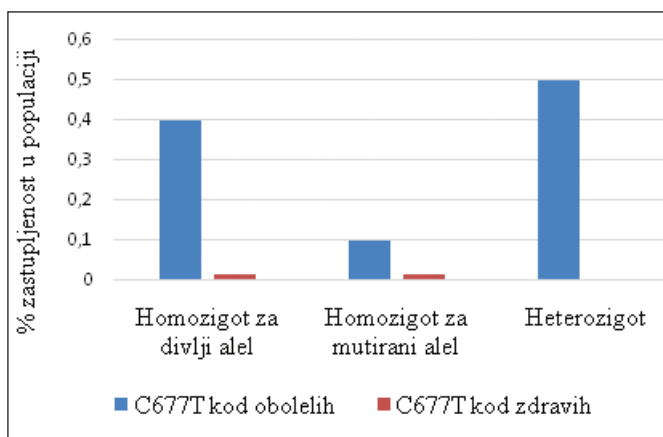
NFQ (ne-fluorescirajući prigušivač);

PCR reakcije su izvođene na Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). U trajanju 50 ciklusa. Sama reakcija je snimana CCD kamerom koja je sastavni deo aparata, registrovana je fluorescencija pre početka rada aparata i posle, a zatim su se vrednosti kompjuterski oduzimale i dobijeni rezultat predstavljao je fluorescenciju koja je beležena. Po završetku rada Real Time PCR mašine, dobijen je grafički prikaz sa kog su očitavani podaci.

Dobijene učestalosti *MTHFR* gena kod pacijenata poređene su sa frekvencijama istih gena kod kontrolne grupe koju su činili potpuno zdravi ljudi.

REZULTATI

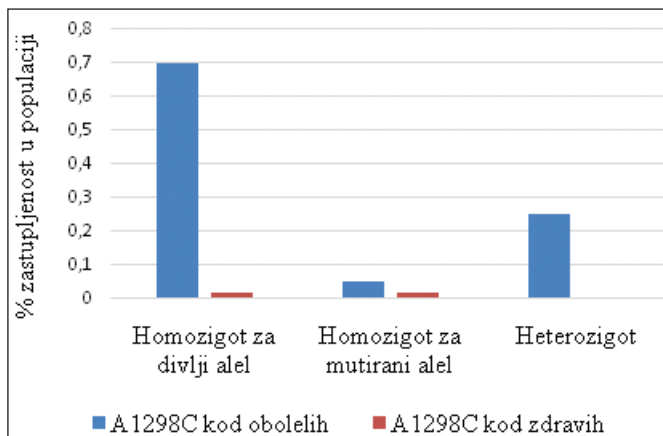
Za *MTHFR* C677T mutaciju kod dvadeset pacijenata obolelih od nekog tipa kardiovaskularnog oboljenja ustanovljeno je da je bilo 50% heterozigota, 40% homozigota za divlji tip alela, a učestalost homozigota za mutiran alel iznosila je svega 10% (Grafik 1.).



Grafik 1. Prikaz učestalosti heterozigota i homozigota za divlji i mutiran alel gena *MTHFR* za polimorfizam C677T kod obolelih pacijenata i kod kontrolne grupe.

Za *MTHFR* A1298C mutaciju pronašli smo da je učestalost heterozigota iznosila 25%, homozigota za divlji tip gena 70%, a homozigota za mutirani alel samo 5% (Grafik 2.).

Nakon izračunavanja frekvencija prikazana je procentualna učestalost homozigota i heterozigota za obe varijante *MTHFR* gena kod dvadeset pacijenata u odnosu na već poznatu učestalost istih gena kod zdravih ljudi (Grafici 1. i 2.).



Grafik 2. Prikaz učestalosti heterozigota i homozigota za divlji i mutiran alel gena *MTHFR* za polimorfizam A1298C kod obolelih pacijenata i kod kontrolne grupe.

DISKUSIJA

Na osnovu do sada poznatih rezultata u zdravoj populaciji u Novom Sadu učestalost homozigota za mutantni i divlji tip alela za obe varijante polimorfizma *MTHFR* gena je 1,6%, heterozigota za *MTHFR* C677T samo 0,44%, a heterozigota za *MTHFR* A1298C 0,4%, (podatak dobijen u laboratoriji sudske medicine u Novom Sadu).

Ukoliko bolesnici imaju obe varijante gena u obliku homozigota za divlji tip (u našem slučaju je to petoro bolesnika), verovatno je da postoji mutacija u nekom od drugih gena, kao što su geni za faktor V koagulacije i faktor II koagulacije, koji su važni za normalnu hemostazu. Nije nađeno da neko od bolesnika ima obe varijante gena u vidu homozigota za mutiran oblik gena, što pokazuje da bi jedna od mutacija u vidu homozigota ili heterozigota mogla biti dovoljna za nastanak bolesti.

Liu F i sar. (13) ustanovili su da je kod 50% pacijenata sa nekom od *MTHFR* mutacija došlo do venozne tromboembolije, za razliku od grupe sa divljim tipom alela gde se bolest dogodila kod svega 28,6% ispitanika. Pacijenti heterozigoti ili homozigoti za neku od *MTHFR* mutacija imali su srednji rizik za nastanak venozne tromboembolije. Ozmen i sar. (14) su utvrdili da je mutacija u genu za faktor V koagulacije (*FVL*) značajno učestalija kod pacijenata sa arterijskim trombozama i pokazano je takođe da je i učestalost mutacija u genu *MTHFR* značajno veća kod takvih bolesnika, ukazujući na to da su *MTHFR* mutacije sinergistički faktor rizika za nastanak tromboza kod pacijenata sa mutacijom u genu za faktor V (*FVL*). Xu i sar. (2) su pokazali da su frekvencije genotipova CC, CT i TT u *MTHFR* C677T 41,58%, 25,74% i 32,67% redom, u grupi pacijenata sa trombozom dubokih vena, i 58,33%, 23,33% i 18,33% u kontrolnoj grupi. Postojala je značajna razlika u frekvenciji TT genotipa između pacijenata i kontrolne grupe ($p < 0,05$).

Učestalost *MTHFR* 677 C>T izmene je u populaciji belih ljudi veća u odnosu na afričku populaciju (1). Polimorfizam 677 C>T je veoma čest u određenim etničkim grupama. U Evropi se učestalost homozigotne mutacije kreće od 8 do 18%, dok se među belcima koji žive van Evrope (Kanada, Amerika, Brazil, Australija) ta učestalost kreće od 10 do 14% (15). U azijskim populacijama učestalost ove izmene je nešto manja, sa oko 11% se javlja kod Japanaca, dok se u afričkim populacijama javlja sa učestalošću od 1-2% (15). To znači da genotip TT može biti faktor rizika za nastanak srčanih oboljenja (16,17). Frekvencija TT genotipa u kavaskim, kineskim i japanskim populacijama je 10-16% (15,17,18).

Prethodna istraživanja gena asociiranih sa trombofilijom u Srbiji pokazala su da postoji asocijacija između polimorfizma *FVL*, gena za faktor II koagulacije 20210 G>A i *MTHFR* 677 C>T i pojave dubokih venskih tromboza, kao i između navedenih polimorfizama i komplikacija tokom trudnoće (3,11).

Studije koje su testirale oba polimorfizma zajedno, 677 C>T i 1298 A>C, su pokazale da prisustvo mutantnog alela na oba lokusa dovodi do povećane redukcije specifične aktivnosti *MTHFR* enzima, povećanog nivoa homocisteina u plazmi, kao i smanjenog nivoa folata (19,20).

ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pokazuje da kod pacijenata sa nekim oblikom tromboze ili cerebralne hemoragije najviše pacijenata ima divlji tip alela za obe *MTHFR* mutacije, što znači da je njihova bolest uzrok mutacija nekih drugih gena koji su takođe važni za regulaciju koagulacije krvi u vaskularnom sistemu. Utvrđeno je da svega 5%, odnosno 10% ispitanika nosi neku od mutacija u formi homozigota, dok je polovina pacijenata bila heterozigotna u oba slučaja.

Ipak, kao što je već rečeno, pored *MTHFR* mutacija još neki geni i njihove mutacije utiču na nastanak tromboze, nekada odvojeno a nekad u sinergizmu sa *MTHFR* mutacijama.

ZAHVALNICA

Ova studija je podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (rešenje broj 175006).

Sažetak

Uvod: Metiltetrahydrofolat reduktaza (*MTHFR*) kodira istoimeni enzim odgovoran za metabolizam folne kiseline koja dalje učestvuje u metabolisanju homocisteina čiji poremećen nivo u krvi dovodi do nastanka kardiovaskularnih bolesti (KVB). Dva najčešća polimorfizma *MTHFR* gena su supstitucija citozina timinom na poziciji 677 (*C677T*) i zamena adenina citozinom na poziciji 1298 (*A1298C*). Cilj rada bio je da se utvrdi učestalost mutacija *MTHFR C677T* i *MTHFR A1298C* kod bolesnika sa trombozama. **Materijal i metode:** U istraživanje su bili uključeni pacijenti hospitalizovani u Kliničkom Centru Vojvodine zbog infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog insulta čiji uzrok je formiranje trombocitnog čepa u krvnim sudovima. Svaki ispitanik je testiran na prisustvo *MTHFR C677T* i/ili *MTHFR A1298C* mutacije pomoću real time PCR metode. **Rezultati:** Za *MTHFR C677T* mutaciju ustanovljeno je da je bilo 50% heterozigota, 40% homozigota za divlji tip alela, a učestalost homozigota za mutiran alel iznosila je svega 10%. Za *MTHFR A1298C* mutaciju utvrđena je učestalost heterozigota od 25%, homozigota za divlji tip gena 70%, a homozigota za mutirani alel samo 5%. **Zaključak:** U istraživanju je prikazano da je kod pacijenata sa nekim oblikom tromboze ili cerebralne hemoragije najviše zastupljen divlji tip alela za obe *MTHFR* mutacije, te uzrok njihove bolesti predstavljaju varijante nekih drugih gena koji su takođe važni za koagulaciju krvi.

LITERATURA

- Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, et al. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet.* 2002;70(3):758–762.
- Xu J, Li K, Zhou W. Relationship between genetic polymorphism of *MTHFR C677T* and lower extremities deep venous thrombosis. *Hematology* 2019;24:108–111.
- Đurović J. Analiza polimorfizama gena za receptor za vitamin D i gena asociiranih sa trombofilijom kod žena sa idiopatskim infertilitetom [dissertacija]. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet;2017.
- Bagly PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):13217–13220.
- Krajinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard É, Théorêt Y, Moghrabi A et al. Role of *MTHFR* genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252–257.
- Baszczuk A, Kopczyński Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease [Abstract] *Postepy Hig Med Dosw.*2014;68:579.
- Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015;14:6.
- Levin BL, Varga E. *MTHFR*: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *J Genet Couns.* 2016;25(5):901–11.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey Sh, et al. A Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma Total Homocysteine and Folate Concentrations. *Journal of Nutrition* 1999;129: 1656–1661.
- Hanson NQ, Aras Ö, Yang F, Tsai MY. *C677T* and *A1298C* Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Incidence and Effect of Combined Genotypes on Plasma Fasting and Post-Methionine Load Homocysteine in Vascular Disease. *Clinical Chemistry* 2001;47:661–666.
- Đorđević V, Rakićević Lj, Spasić M, Miljić P, Miković D, Kovač M et al. Mutacije *FV Leiden*, *FII G20210A* i *MTHFR C677T* kao faktori rizika za nastanak tromboze dubokih vena u toku trudnoće ili puerperijuma. *Vojnosanit Pregl* 2005;62(3):201–205.
- Yamada K, Chen Zh, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *PNAS* 2001;98(26):14853–14858.
- Liu F, Silva D, Malone MV, Seetharaman K. *MTHFR A1298C* and *C677T* Polymorphisms Are Associated with Increased Risk of Venous Thromboembolism: A Retrospective Chart Review Study. *Acta Haematol.* 2017;138(4):208–215.
- Ozmen F, Ozmen MM, Ozalp N, Akar N. The prevalence of factor V (*G1691A*), *MTHFR (C677T)* and *PT (G20210A)* gene mutations in arterial thrombosis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2009;15(2):113–9.
- Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862–77.
- Alam MA, Husain SA, Narang R, Chauhan SS, Kabra M, et al. Association of polymorphism in the thermolabile 5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia with coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 2008; 310:111–117.
- Alam MA. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Diseases. *Cell Dev Biol* 2016;5:2.
- Spronk KJ, Olivero AD, Haw MP, Vettukattil JJ. Methylenetetrahydrofolate reductase *C677T*: hypoplastic left heart and thrombosis. *World J Pediatr Congenit Heart Surg* 2015;6:643–645.
- Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, et al. The *1298A→C* polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis.* 2001;156(2):409–15.
- Brustolin S, Giugliani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(1):1–7.