

Van İli ve Çevresinde Serebrovasküler Hastalık, Koagülasyon Bozukluğu ve Hipertansiyon Ön Tanısı Alan Hastalarda MTHFR C677T ve A1298C Gen Polimorfizmlerinin Genotip ve Allel Frekansı

Ahmet Dönder¹, Ragıp Balahoroğlu¹, Erdem Çokluk¹, Haluk Dülger², M. Ramazan Şekeroğlu¹, Tahsin Karakoyun¹

¹Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van, Türkiye.

²Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Konya Türkiye.

Eur J Basic Med Sci 2012;2(2):41-45

Received: 14.03.2012

Accepted: 26.06.2012

Poster Bildiri Olarak Sunulmuştur. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Kasım - 2 Aralık 2011, Adana, Türkiye

Correspondence (Yazışma Adresi):
Ahmet DÖNDER, Yüzüncü Yıl Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı,
Van-Türkiye
Tel: 0544 860 54 08
E Mail: ahmetdundar83@hotmail

The Genotype and Allele Distributions of MTHFR C677T and A1298C Gene Polymorphisms in Patients with Cerebrovascular Disease, Coagulation Disorder and those Pre-Diagnosed with Hypertension in Van Province and its Environments

ABSTRACT

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme in folat, methionine and homocysteine metabolism. In this study, our objective is to investigate the genotype and allele distributions of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms in patients with Cerebrovascular disease, Coagulation disorder and those pre-diagnosed with Hypertension in Van province and its environments. The results of the analyses C677T and A1298C gene polymorphisms in 109 patients were evaluated retrospectively. These patients were divided into three groups as Cerebrovascular disease, Hypertension and Coagulation disorder. In the analysis, CVD T (Cardiovascular Disease Thrombosis) Strip assay kit which is based on reverse hybridization technique was used. The three groups pre-diagnosed with Cerebrovascular disease, Hypertension and Coagulation disorder were found to have C677T homozygous genotype frequency of 2.70%, 9.67%, 7.31% heterozygous of 54.05%, 41.93%, 41.46% and normal 43.24%, 48.38%, 51.21%, respectively. C677T C allele frequency was %29.73, %30.64, %28.05. A1298C homozygous genotype frequency 16.21%, 6.45%, 12.19% heterozygous 45.94%, 51.61%, 58.53% normal 37.83%, 41.93%, 29.26%. A1298C A allele frequency was %39.18, %32.25, %41.46 respectively. Combined heterozygous frequency was found as thus: C677T/A1298C 27.02%, 29.03%, 24.39%. No statistically significant difference was found between three groups in terms of genotype and allele frequencies ($p>0.05$). The homozygote genotype frequencies of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in patients pre-diagnosed with Hypertension, Coagulation disorder and Cerebrovascular disease in Van and its environments whereas heterozygote genotypes were found to be higher compared with the population of the combined heterozygote genotype frequencies.

Key words: MTHFR Gene, C677T and A1298C polymorphisms, Allele Frequency

ÖZET

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR); folat, metiyonin ve homosistein metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Bu çalışmada amacımız; Van ili ve çevresinde Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ve Hipertansiyon ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımlarını araştırmaktır. 109 hastanın C677T ve A1298C gen polimorfizm analiz sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Bu hastalar Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ve Hipertansiyon olarak üç gruba ayrıldı. Analizde ters hibridizasyon yöntemini esas alan CVD T (Cardiovascular Disease Tromboz) StripAssay kiti kullanıldı. Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon, Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan üç grupta sırasıyla C677T homozigot genotip frekansı %2.70, %9.67, %7.31 heterozigot %54.05, %41.93, %41.46 normal %43.24, %48.38, %51.21 olarak tespit edildi. C677T T allel frekansı ise %29.73, %30.64, %28.05 idi. A1298C homozigot genotip frekansı %16.21, %6.45, %12.19 heterozigot %45.94, %51.61, %58.53 normal %37.83, %41.93, %29.26 idi. A1298C C allel frekansı ise %39.18, %32.25, %41.46 idi. Bileşik heterozigot frekansı, C677T/A1298C %27.02, %29.03, %24.39 olarak gözlemlendi. Genotip ve allel frekansları için üç grup arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Van ili ve çevresinde Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ve Hipertansiyon ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin homozigot genotip frekanslarının popülasyona göre düşük olduğu, buna karşılık heterozigot genotipleri, bileşik heterozigot genotip frekanslarının popülasyona göre yüksek olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: MTHFR Geni, C677T ve A1298C Polimorfizmleri, Allel Frekansı

GİRİŞ

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi folat metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. MTHFR nükleotid biosentezinde gerekli olan 5-10 metiltetrahidrofolatı 5-metiltetrahidrofolata katalizler. Homosisteinin metiyonine tekrar metile olmasını sağlar. MTHFR geni 1. kromozomda 1p36.3 bölgede lokalize olmuştur. 11 ekzondan oluşmaktadır. Genelde C677T ve A1298C olarak bilinen iki polimorfizmi bilinmektedir (1). Belirtilen polimorfizmlerin trombozla ilişkisini incelemiş yayınlar bulunmaktadır. Botto ve Yang (2) belirtmiş olduğu gibi; MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri konjenital anomaliler, kardiyovasküler hastalıklar, inme, tromboz ve koagülasyon bozuklukları ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Homosistein düzeylerinin artışına yol açan MTHFR geninin

ısıya duyarlı formunun senteziyle sonuçlanan, enzimin katalitik bölgesinde Alanin-Valin değişiminden sorumlu, MTHFR geninde 677. nükleotidde C-T poliformizmini içeren MTHFR 677 C-T polimorfizmi oldukça sıktır. Beyaz ırkın %60'ı MTHFR allelini taşır ve bunun %5-15'i homozigottur. MTHFR'nin 677. mutasyonunda, CC (Alanin/Alanin) normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir. Ancak A1298C ve C677T gen polimorfizmlerinin birlikte heterozigot olduğu durumlarda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin yaklaşık %50-60'ı arasındadır. Bu aktivite, C677T mutasyonunun heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür (3). MTHFR geninde belirlenen başka bir polimorfizmde, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan (A) Adenin'in (C) Sitozin'e değişimi sonucu meydana gelir, MTHFR proteinindeki Glutamin'in Alanin'e değişimine neden olan polimorfizmdir. MTHFR'nin 1298. mutasyonunda, CC homozigot mutant, AC heterozigot ve AA normal genotipler görülmektedir. Bu şekilde kodlanan enzimin aktivitesi azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda A1298C gen polimorfizmi açısından homozigot olan hastalarda kontrol gruplarına göre homosistein seviyelerinde herhangi bir artışın olmadığı bildirilmiştir (4).

Bu çalışmada amacımız Van ili ve çevresinde Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ve Hipertansiyon ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımlarını araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına farklı kliniklerden (Dahiliye, Nöroloji gibi) gelen hastaların periferik kan örneklerinin mutasyon analizi sonuçları retrospektif olarak incelendi. 2009 Ekim ve 2010 Kasım arasında laboratuvarımıza müracaat eden 109 hastanın CVD T (Cardio Vascular Disease Tromboz) gen mutasyon analizi sonuçları değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen 109 hasta (75 kadın, 34 erkek) üç gruba ayrıldı:

Grup I: Serebrovasküler ön tanısı alan hastalar (n=37)

Grup II: Hipertansiyon ön tanısı alan hastalar (n=31)

Grup III: Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan hastalar (n=41)

Bu çalışmada, ters hibridizasyon yöntemini temel

alan strip test yöntemiyle hazır ticari kit (ViennaLab Labordiagnostika GmbH, Austria) kullanılarak PCR yöntemiyle araştırıldı. CVD T StripAssay testlerde MTHFR C677T ve A1298C gen bölgesi olarak iki polimorfizmi taranmaktadır.

StripAssay yöntemi dört aşamada yapılmaktadır. Standart metotla periferik lökositlerden DNA izolasyonu yapıldı. Genomik DNA elde edildi. Multiplex PCR ile taradığımız mutasyonların buldukları ekzonları biotin ile işaretlenmiş primerler kullanarak amplifikasyon gerçekleştirildi. PCR ile amplifikasyonun ardından %3 lük agaroz jelde PCR ürünleri kontrol edildi. PCR ürünlerinin hibridizasyon safhasında striplere immobilize edilmiş 1 adet wild type ve 1 adet mutant bölgede oligonükleotidlerle PCR ürünleri ile hibridizasyon işlemi yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Genotip ve allel frekansları için tanımlayıcı istatistikler; sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Genotip ve allel frekansları açısından Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon ve Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan gruplarını karşılaştırılmasında; Z testi ile bağımsız oran karşılaştırması testi kullanıldı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için MINITAB for Windows istatistik paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon, Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan hastaların genotip frekansları sırasıyla C677T homozigot %2.70, %9.67, %7.31 heterozigot %54.05, %41.93, %41.46 normal %43.24, %48.38, %51.21 olarak tespit edildi. A1298C homozigot genotip frekansı %16.21, %6.45, %12.19 heterozigot %45.94,

%51.61, %58.53 normal % 37.83, %41.93, %29.26 idi. Bileşik heterozigot genotip frekansı, C677T/A1298C %27.02, %29.03, %24.39 olarak gözlenmiştir (Tablo 1).

Grupları allel frekansı açısından incelediğimizde C677T (T) allel frekansı ise %29.73, %30.64, %28.05, A1298C (C) allel frekansı ise %39.18, %32.25, %41.46 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Karşılaştırma sütununda, grupların ikili karşılaştırmalarına ait p değerleri bulunmaktadır. Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ile Hipertansiyon grupları, genotip ve allel frekansları bakımından karşılaştırılmıştır. Grupların genotip ve allel frekansları açısından ikili karşılaştırılmasında üç grup arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 3).

TARTIŞMA

Vasküler hastalıkların etiopatogenezi sistemik arteriyel hipertansiyon, diabetes mellitus ve sigara içimi gibi risk faktörleri ile ilişkilidir. Son zamanlarda bu risk faktörlerine ilaveten bir diğer önemli risk faktörü olan homosistein olarak belirlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda hiperhomosisteineminin koroner arter hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (5).

Yapılan bu çalışmaya konu olan MTHFR gen polimorfizmi hakkında literatürde çok sayıda araştırma mevcuttur. Söz konusu araştırmalar da, daha çok mevcut bir hastalık ile ilişkili durumu inceleyen araştırmalardır. Bu çalışma ise, üç farklı hasta grubunu araştıran bir çalışmadır. Bu çalışmada hasta gruplarının genotip ve allel frekanslarını yüzdelerle ifade ettik. Grupların genotip ve allel frekansları açısından ikili karşılaştırılmasında ise üç grup arasında istatistiksel bir fark olmadığını tespit ettik ($p>0.05$).

Tablo 1. Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon, Koagülasyon bozukluğuön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerin genotip frekansı

Genotip Frekansı Polimorfizm	Genotip	Serebrovasküler hastalık (n=37)	Hipertansiyon (n=31)	Koagülasyon bozukluğu (n=41)
C677T	T/T	1(%2.70)	3(%9.67)	3(%7.31)
	C/T	20(%54.05)	13(%41.93)	17(%41.46)
	C/C	16(%43.24)	15(%48.38)	21(%51.21)
A1298C	C/C	6(%16.21)	2(%6.45)	5(%12.19)
	A/C	17(%45.94)	16(%51.61)	24(%58.53)
	A/A	14(%37.83)	13(%41.93)	13(%29.26)
C677T/A1298C		10(%27.02)	9(%29.03)	10(%24.39)

Tablo 2. Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon, Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerin allel frekansı

Allel Frekansı Allel	Serebrovasküler hastalık (n=74)	Hipertansiyon (n=62)	Koagülasyon bozukluğu (n=82)
T (667)	22 (%29.73)	19 (%30.64)	23 (%28.05)
C	52 (%70.27)	43 (%69.36)	59 (%71.95)
C (1298)	29 (%39.18)	20 (%32.25)	34 (%41.46)
A	45 (%60.82)	42 (%67.75)	48 (%58.54)

Koroner arter hastalıklara sahip ve bypass geçiren hastalarda yapılan bir çalışmada, koroner arter hastalarında homosistein seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve MTHFR C677T polimorfizminin bu hastalığın patolojisinde bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (6).

MTHFR C677T gen polimorfizm frekansı, coğrafik ve etnik gruplar açısından oldukça farklılık göstermektedir. Çin popülasyonunda %12.3, Kanada da %5-15, Japonya da %11 dir. Hindistan da ise arteriyel inmeli hastalarda %28-32 olduğu bildirilmiştir (7). Han ve ark. (8) Kore popülasyonunda beyin infarktli hastalarda yaptıkları çalışmada MTHFR A1298C polimorfizminin Kore popülasyonu için bir risk faktörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerin Kore popülasyonunda beyin enfarktüsü riskini artırabileceğini öne sürmüşlerdir.

Al-Allawi ve ark. (9) Irak popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada MTHFR C677T TT genotipinin iskemik inmeli

hastalarda önemli bir risk faktörü olduğunu ve TT genotipinin total homosistein seviyesinin artması için bir risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda Serebrovasküler hastalık ön tanısı alan hastalarda TT 677 homozigot genotipini popülasyona göre düşük bir frekansta olduğunu tespit ettik. Ama CT 677 heterozigot genotipi frekansı diğer gruplarla kıyasladığımızda daha yüksekti. A1298C ise homozigot allel frekansı olarak diğer gruplara göre yüksek olduğunu tespit ettik.

Bayan ve ark. (10) idiopatik portal hipertansiyonlu hastalarda yaptıkları bir çalışmada MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizm frekansını kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır. Markan ve ark. (11) 153 hipertansiyonlu vakada yaptıkları çalışmada, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin bileşik heterozigot genotipe sahip olanlarda hipertansiyon riskinin artması ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. MTHFR 1298 CC genotipinin çalışma grubundaki kişilerde homosistein

Tablo 3. Genotip ve allel frekansları için üç grubun karşılaştırması

Polimorfizm Tipi	Karşılaştırmalar			p değeri
	S-H	S-K	H-K	
C677T				
T/T	0.324	0.617	0.724	
C/T	0.315	0.263	0.968	p>0.05
C/C	0.671	0.480	0.812	
A1298C				
C/C	0.275	0.612	0.691	
A/C	0.641	0.263	0.558	p>0.05
A/A	0.731	0.422	0.265	
C677T/A1298C	0.885	0.790	0.660	p>0.05
Allel frekansı				
T (667)	0.908	0.817	0.735	
C	0.908	0.139	0.735	p>0.05
C(1298)	0.339	0.772	0.253	
A	0.399	0.772	0.253	

(S:Serebrovasküler, H:Hipertansiyon, K: Koagülasyon bozukluğu)

seviyesinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, hipertansiyon ön tanılı grubu diğer gruplarla kıyasladığımızda MTHFR C677T ve A1298C homozigot genotip frekansı diğer gruplara göre düşüktü. MTHFR C677T (T) allel frekansı diğer gruplara göre daha yüksek yüzdeliğe sahip olup, keza bileşik heterozigot frekansı da diğer gruplara göre daha yüksek idi.

5-10 metilentetrahidrofolat redüktaz folat, metiyonin ve homosistein metabolizmasında anahtar bir enzimdir. MTHFR aktivitesinde meydana gelen herhangi bir rahatsızlık homosistein seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Hiperhomosisteinemi artması ise koagülasyon kaskadı yolunda bir risk faktörüdür. Bu da ateroskleroza, endotelium üzerinde direkt toksik etkilere, faktör V ve VII aktivasyonuna neden olmaktadır (12). Bu çalışmada Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan hastalarda MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerini diğer gruplarla kıyasladığımızda, MTHFR A1298C heterozigot genotip frekansının (AC) oldukça yüksek bir yüzdeliğe (%58.53) sahip olduğunu tespit ettik.

Serebrovasküler hastalık, Hipertansiyon, Koagülasyon bozukluğu ön tanısı alan hastaların C677T ve A1298C gen polimorfizmlerin T ve C allel frekanslarının popülasyon allel frekansına göre düşük olduğunu gözlemledik. A2398C polimorfizminin (C) allel frekansının ise C677T (T) allel frekansına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, Van ili ve çevresinde Serebrovasküler hastalık, Koagülasyon bozukluğu ve Hipertansiyon ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerin homozigot genotip frekanslarının popülasyona göre düşük olduğunu tespit ettik. Fakat heterozigot genotipleri, bileşik heterozigot genotip frekanslarını popülasyona göre yüksek olduğunu tespit ettik.

KAYNAKLAR

1. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and Mouse Methyltetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9: 652-6.
2. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a Huge review. *Am J Epidemiol* 2000; 151(9): 862-77.
3. Li Z, Sun Li, Zhang H, Liao Y, Wang D, Zhao B, Zhu Z, Zhao J, Ma A, Han Y, Wang Y, Shi Y, Ye J, Hui R. Elevated plasma homocysteine was associated with hemorrhagic and ischemic stroke, but methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T Polymorphism Was a Risk Factor Thrombotic Stroke. 2003; 34(9): 2085-90.

4. Sazcı A, Ergül E, Kaya G, Kara I. Genotype and Allele Frequencies of the Polymorphic Methyltetrahydrofolate Reductase Gene in Turkey. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 51-4.
5. Brustolin S, Giugliani R, Felix TM. Genetics of Homocysteine Metabolism and Associated Disorders. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43(1): 1-7.
6. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiocerebrovascular risks. *J Appl Genet* 2008; 49(3): 267-82.
7. Kalita J, Srivastava R, Bansal V, Agarwal S, Misra UK. Methyltetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Indian stroke patients. *Neurol India* 2006; 54(3): 260-3.
8. Han IB, Kim OJ, Ahn JY, Oh D, Hong SP, Huh R, Chung SS, Kim NK. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T and 1298A>C) polymorphisms and haplotypes with silent brain infarction and homocysteine levels in a Korean population. *Yonsei Med J* 2010; 51(2): 253-60.
9. Al-Allawi NA, Avo AS, Jubrael JM. Methyltetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in Iraqi patients with ischemic stroke. *Neurol India* 2009; 57(5): 631-5.
10. Bayan K, Tüzün Y, Yılmaz S, Canoruc N, Dursun M. Analysis of inherited thrombophilic mutations and natural anti-coagulant deficiency in patients with idiopathic portal hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 28(1): 57-62.
11. Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M. MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem* 2007; 302(1-2):125-31.
12. Kurzwinska G, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Genetic conditioned changes in activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and recurrent miscarriages. *Ginekol Pol* 2009; 80(10): 762-7 (Abstract).