



İnme Öyküsü Olan Hastalarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz C677T Gen Polimorfizminin ve Mutasyonların Sıklığı

Fidan Gökçeçicek Gülyaz¹, Şebnem Tekin Neijmann², Alev Kural², Ebru Alioğlu Kalem³

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul

²Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, İstanbul

³Esenyurt Devlet Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul

ÖZET

İnme öyküsü olan hastalarda metilentetrahidrofolat redüktaz C677T gen polimorfizminin ve mutasyonların sıklığı

Amaç: İnme, kalp hastalığı ve kanserden sonra dünyada en sık görülen üçüncü ölüm nedeni olup morbiditenin ise en sık sebebidir. Metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi plazmadaki homosistin düzeylerini ayarlamada önemli bir rol oynar. Hiperhomosistin inme için bir risk faktörüdür. Metilentetrahidrofolat redüktaz gen C677T polimorfizmi enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. Bu çalışmada, inme hastalarında metilentetrahidrofolat geni C677T polimorfizmi genotip ve allel sıklıklarını belirlemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 40 inme hasta ve 38 sağlıklı kişide yapılmıştır. Tüm araştırma grubu bireylerinin periferik kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak Light Cycle (LC) cihazında Real Time (RT) Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) yöntemi uygulanarak MTHFR enzimi kodlayan genin C677T polimorfizminin genotipleri tayin edildi.

Bulgular: Kontrol ve çalışma grubunda sırasıyla MTHFR C677T (%63.15 CC, %34.21 CT, %2.63 TT) (%35 CC, %52.5 CT, %12.5 TT) genotipleri açısından analiz edildiğinde aralarında istatistiksel farklılık gözlenmiştir ($\chi^2=4.462$ $p<0.05$).

Sonuç: MTHFR C677T gen polimorfizmlerinin inme hastalarında risk faktörü oluşturduğu saptanmıştır. Olgu sayısının arttırılıp, homosistin ölçümleri ile birlikte araştırmamızın genişletilmesine karar verdik.

Anahtar kelimeler: İnme, C677T, metilentetrahidrofolat redüktaz, RT PCR

ABSTRACT

The frequency of metilentetrahidrofolat reductase C677T gene polymorphysm and mutations in patients with a history of stroke

Objective: Stroke, following heart disease and cancer, is the third most common cause of mortality and is the most common cause of morbidity in the world. The enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) plays a critical role in modulating the levels of plasma homocysteine. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for stroke. The polymorphysm in the methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T results in reduced enzyme activity. This study was performed to observe the rate of MTHFR C677T genetic polymorphysm and its effect to hyperhomocysteinemia as a risk factor.

Material and Methods: In this study, 40 stroke patients and 38 control subjects without any history of stroke were assessed. DNA was extracted from preripheral blood samples of the patients and controls. C677T genotype and alleles in the MTHFR gene were identified in Light Cycle (LC) device by Real Time (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR) methods.

Results: In control and study groups MTHFR C677T (63.15% CC, 34.21% CT, 2.63% TT) (35% CC, 52.5% CT, 12.5% TT) genotypes were analyzed respectively and statistically significant difference was observed.

Conclusion: MTHFR C677T polymorphism was a risk factor for in stroke patients. We thought to extend our study by increasing the size and adding the homocysteine measurements for better results.

Key words: Stroke, C677T, methylenetetrahydrofolate reductase, RT PCR

Bakırköy Tıp Dergisi 2015;11:99-102

Yazışma adresi / Address reprint requests to: Dr. Fidan Gökçeçicek Gülyaz
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul

Telefon / Phone: +90-212-414-7346

Elektronik posta adresi / E-mail address: gokcegulyaz@yahoo.com

Geliş tarihi / Date of receipt: 13 Kasım 2014 / November 13, 2014

Kabul tarihi / Date of acceptance: 20 Nisan 2015 / April 20, 2015

GİRİŞ

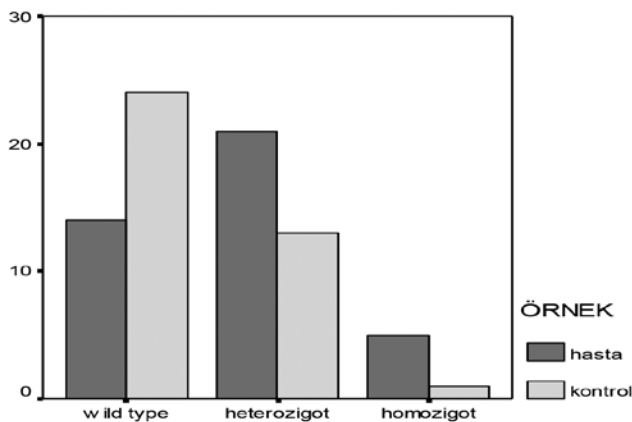
İnme pek çok ülkede en fazla ölüme yol açan ve en fazla sakat bırakan hastalıklar arasındadır (1). İnmeli hastaların yaklaşık %20-50'sinde, orta şiddette hiperhomosistinemi ortaya çıkabilir (2,3). MTHFR genindeki bazı mutasyonlar, MTHFR enzim aktivitesinde azalmaya yol açar, bu da plazma homosistein düzeyindeki artışa, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosistinemi ve homosistinüri oluşmasına neden olur (4-7).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, inme hastalarında metilentetrahidrofolat geni C677T polimorfizmi genotip ve allel sıklıklarını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışma 40 inme hastası ve 38 sağlıklı kişide yapılmıştır. Tüm araştırma grubu bireylerinin periferik kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak LC cihazında RT PCR yöntemi uygulanarak MTHFR enzimi kodlayan genin C677T polimorfizminin genotipleri tayin edildi. MTHFR C677T polimorfizmi için wild type genotip erime eğrisi analizinde (CC) 62.5°C'de tek pik, homozigot genotipi (TT) 55°C'de tek pik ve heterozigot genotip (CT) 55°C ve 62.5°C'lerde iki pik oluşması ile belirlendi. Kontrol grubunda MTHFR C677T polimorfizmi için 24

Tablo 1: Genotip dağılımı

Örnek	GENOTİP			Total
	Wild Tip	Heterozigot	Homozigot	
Hasta	14	21	5	40
Kontrol	24	13	1	38
Total	38	34	6	78



Grafik 1: MTHFR C677T Gen polimorfizminin genotipe göre dağılımı

Tablo 2: Cinsiyet ve yaş ortalamaları dağılımı

Cinsiyet	Kontrol Grubu (n=38)	Çalışma Grubu (n=50)
Kadın	18 (%47)	24 (%48)
Erkek	20 (%53)	16 (%32)
Yaş ortalaması	57.23±7.31	65.65±14.43
Kadın	57.23±7.31	62.50±16.18
Erkek	57.05±9.35	70.37±10.00

(%63.15) olgunun wild type (CC), 13 (%34.21) olgunun heterozigot (CT), 1 (%2.63) olgunun homozigot (TT) genotipte oldukları saptandı. İnme öyküsü olan hasta grubunda ise 14 (%35) olgunun wild type (CC), 21 (%52.5) olgunun heterozigot (CT), 5 (%12.5) olgunun homozigot (TT) genotipe sahip oldukları belirlendi (Tablo 1, Grafik 1). Çalışmaya alınma doğrultusunda; cinsiyet ($X^2: 1.251, p>0.05$) ve yaş yönünden gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 2). Kontrol ve hasta grubundaki olgular MTHFR C677T polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($X^2=4.462, p<0.05$).

TARTIŞMA

İnme, ölüm nedenleri arasında kalp hastalığı ve kanserden sonra üçüncü sırada yer alırken, erişkin nörolojik hastalıkları içerisinde görülme sıklığı ve önemi açısından ilk sırada yer almaktadır (8-10). Gelişmiş ülkelerde ortalama yaş süresinin artması inme görülme sıklığını artırmıştır. Bu sebeple risk faktörlerinin tespiti mortalite ve morbiditeyi azaltmada önem kazanmıştır (11,12). 5.10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR), bir flavoprotein olup MTHFR ailesinin üyesidir. MTHFR enzimi folat metabolizmasının düzenleyici bir enzimi olarak homosisteininin metionine, B12 bağımlı remetilasyonunda metil-grup donörü, 5-10 metilentetrahidrofolatın 5-metilentetrahidrofolata değişimini katalizleyerek homosistein metabolizmasında önemli rol oynar (13-15). Artan homosistein düzeyinin, koagülasyon olayında görev yapan faktör V, X ve XII'nin aktivasyonunu hızlandırarak, arterial tromboza katkıda bulunduğu, böylece büyük ve küçük damar aterosklerozuna yatkınlık ile ortaya çıkan serebrovasküler hastalıklara neden olduğunu açıklayan çalışmalar vardır (6-8). C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir. İnme'li 900 hastayı içeren ve 1994'ten beri 24 çalışmanın yer aldığı bir meta-analiz çalışmasında, kontrollere göre inmeli hastaların, artan homosistein düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir (8). Yine

Morita ve arkadaşlarının 256 inmeli hasta ve 325 kontrol ile yaptığı bir çalışmada, TT genotipi ile inme arasında önemli derecede ilişki olduğunu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada plazma homosistin seviyelerinin, CC veya CT genotipli hastalara göre, TT genotipli hastalarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (13). MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar ; C677T alleli, MTHFR geninin 677. sıradaki sitozinin (C) timine (T) dönüşmesiyle meydana gelen bir nokta mutasyon ile karakterizedir. Bu mutasyon sonucunda enzimde, alanin aminoasiti valin aminoasidine dönüşmektedir (FROSST, 1995). Bu dönüşüm enzim aktivitesinde azalmayla plazma homosistein düzeyinde artış, serebrovasküler hastalıklar için önemli risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmaktadır (4,5). Morita ve arkadaşları yaptıkları çalışmada inme hastalarından elde ettikleri DNA örneklerinden MTHFR C677T gen polimorfizmini PCR ile kantitatif ölçmüşler ve polimorfizmi ile inme arasında önemli derecede ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (9). Harmon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kontrollere göre inme hastalarının artan homosistein düzeylerine sahip olduklarını ve bunda MTHFR C677T gen polimorfizmiyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir (16). Yine Kelly ve arkadaşları yaptıkları çalışmada inme ve MTHFR C677T polimorfizmini ilişkilendirir-

ken, Visy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada istatistiksel bir farklılık bulunmadığını belirtmiştir (17,18). İskemik hastalar ile yapılan bazı çalışmalarda hasta TT genotipinde, CT ve CC genotiplerine göre total homosistein düzeyinin daha yüksek olduğu rapor edilmiş olup, kontrol grubunda ise C677T genotipleri arasında homosistein değeri bakımından farklılık bulunmadığı belirtilmiştir (18-20).

Biz de çalışmamızda MTHFR C677T polimorfizminin genotiplendirmesini Light Cycler RT PCR cihazında kantitatif olarak ölçtük. İnme hastalarında 14 olgunun (%35) wild type (CC), 21 olgunun (%52.5) heterozigot (CT), 5 olgunun (%12.5) homozigot (TT) genotipleri açısından analiz edildiğinde aralarında istatistiksel bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$).

Sonuç olarak, MTHFR C677T gen polimorfizmi inme için bir risk faktörü olduğu saptanmış ancak; olgu sayısının az olması ve homosistein ölçümleri olmaması nedeniyle, olgu sayısının genişletilmesi ve homosistein seviyelerinin ölçümü ile bir ilişki kurularak değerlendirilmesinin daha doğru sonuçlara götüreceği düşünülmüştür. Gen mutasyonlarının tespiti ve gen seviyesi ölçümleri serebrovasküler cevap ve dirençleri konusunda bilgi sağlamakta olup hastalığın yönetimi konusunda yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. WHO, The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. WHO, Geneva, 2002. Also available at <http://www.who.int/whr/2002/en/>.
2. Goldstein LB, Adams R, Becker K, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association, Circulation 2001; 101: 163-182.
3. Warlow CP. Epidemiology of stroke. Lancet 1998; 352: SIII1-SIII4.
4. Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase. Clin Invest Med 2001; 24: 56-59.
5. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. Eur J Hum Genet 2000; 8: 725-729.
6. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, et al. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. Br J Obstet Gynaecol 1999; 106: 1214-1218.
7. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. J Nutr 2000; 130: 2238-2242.
8. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. J Nephrol 2000; 13: 20-33.
9. Mazzoni P, Rowland LP (Çeviri: M. Özmenoğlu). Merritt's Nöroloji El Kitabı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003: s. 121-155.
10. Giloy J (Çeviri: R. Karabudak). Temel Nöroloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 2002: s. 225-253.
11. Kumral E. İnme epidemiyolojisi. Balkan S (Ed). Serebrovasküler Hastalıklar. 2.baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005: s.39-56.
12. Bakar M, Oğul E. Tıkayıcı tip beyin damar hastalıkları (Nörovasküler sendromlar). Balkan S (Ed). Serebrovasküler Hastalıklar. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005: s.83-101.
13. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1465-1469.
14. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mamm Genome 1998; 9: 652-656.
15. Narayanan S, McConnell J, Little J, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; 13: 1436-1443.

16. Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, et al. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 208-211.
17. Kelly PJ, Barron M, Furie KL. Hyperhomocysteinemia, MTHFR C677T polymorphism and stroke. *Stroke* 2001; 33: 1452-1453.
18. Visy JM, Le Coz P, Chadeaux B, et al. Homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by stroke in adult siblings. *Neurology* 1991; 41: 1313-1315.
19. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr* 2000; 130: 2493-2497.
20. Akar N, Akar E, Özel D, Deda G, Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res* 2001; 102: 115-120.