

УДК 575.174.015.3:599.9

## АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НЕРАВНОВЕСИЯ ПО СЦЕПЛЕНИЮ И АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *MTHFR* С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

© 2012 г. Е. А. Трифонова<sup>1</sup>, М. Г. Спиридонова<sup>1</sup>, Т. В. Габидулина<sup>2</sup>,  
Ф. Д. Урнов<sup>3</sup>, В. П. Пузырев<sup>1</sup>, В. А. Степанов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения  
Российской академии медицинских наук, Томск 634050  
e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России,  
кафедра акушерства и гинекологии, Томск 634050

<sup>3</sup> Калифорнийский университет, кафедра молекулярной и клеточной биологии, СА Беркли 94720

<sup>4</sup> Томский государственный университет, кафедра цитологии и генетики, Томск 634050

Поступила в редакцию 13.01.2012 г.

Окончательный вариант получен 16.04.2012 г.

Изучение характера неравновесия по сцеплению (LD) в геноме в конкретных популяциях является высокопродуктивным подходом, позволяющим идентифицировать функциональные варианты, лежащие в основе предрасположенности к многофакторным заболеваниям (МФЗ). В представленной работе исследована структура паттернов LD гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) в группе больных коронарным атеросклерозом (КА) и контрольной выборке из русской популяции. Нами обнаружены сходные черты в структуре LD гена *MTHFR* в выборках из одной популяции, дифференцированных по наличию/отсутствию КА. Впервые выявлена ассоциация полиморфизмов rs7533315 и rs2066462 гена *MTHFR* с КА, а также реконструирована эволюция гаплотипов и их роль при формировании КА в русской популяции. Получены данные о взаимосвязи генетической варибельности локуса *MTHFR* у больных КА с патогенетически значимыми показателями липидного обмена. Продемонстрирована высокая информативность гаплотипического подхода в анализе ассоциаций с МФЗ методом случай–контроль.

Когда около 20 лет назад был начат поиск генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), предполагалось, что генетические полиморфизмы будут чрезвычайно полезны, наряду с уже известными факторами, предрасполагающими к развитию ССЗ, при оценке индивидуального риска и выбора профилактических или терапевтических мер. Тем не менее, несмотря на годы интенсивных исследований, на сегодняшний день ни один генетический показатель риска широко не используется в клинической практике. С течением времени интерес генетических исследований распространенных ССЗ постепенно перемещается от первичной стратификации ожидаемого риска к более фундаментальному пониманию этиологии и патофизиологии болезни и их косвенного диагностического и терапевтического смысла [1].

Выявление структуры наследственной компоненты распространенных болезней является одним из ключевых направлений в современной генетике человека. Классический подход к решению этой задачи, основанный на ассоциативных исследованиях отдельных маркеров генов-канди-

датов с болезнью методом случай–контроль, все еще сохраняет свою актуальность. Однако в последнее десятилетие арсенал методов генетики многофакторных заболеваний (МФЗ) пополнился высокопродуктивными подходами, такими как полногеномное картирование, мета-анализ, когортные и множественные репликативные исследования [2–5]. Одной из потенциально наиболее продуктивных стратегий выявления генетических вариантов, лежащих в основе подверженности к МФЗ, является анализ структуры неравновесия по сцеплению в области генов-кандидатов и обнаружение связанных с болезнью гаплотипов и их tagSNPs [6–9].

Эффекты отдельных маркеров, выявляемые при классическом анализе ассоциаций, как правило, невелики и могут быть связаны не с самим изучаемым маркером, а со сцепленным с ним функционально значимым вариантом (мутацией или полиморфизмом). В силу этого анализ ассоциаций на уровне гаплотипов может оказаться более мощным и информативным средством, чем изучение отдельных маркеров. В том случае, если ген-кандидат играет определенную роль в под-

Таблица 1. Характеристика исследованных SNPs гена *MTHFR*

№	SNP ID (общепринятое название)	Позиция на хромосоме (по данным базы NCBI)	dbSNP аллели	Предковый аллель	Тип мутации	Локализация в гене <i>MTHFR</i> (по данным базы NCBI)
1	rs3753588	11863904	A/G	G		Интрон 1
2	rs2066470	11863057	C/T	C	Синонимичная (39 Pro/Pro)	Экзон 2
3	rs17037397	11862163	A/C	C		Интрон 2
4	rs7533315	11860683	C/T	C		Интрон 3
5	rs4846052	11857951	C/T	T		Интрон 4
6	rs1801133 (C677T)	11856378	C/T	C	Несинонимичная (222 Val/Ala)	Экзон 5
7	rs6541003	11855867	A/G	G		Интрон 5
8	rs2066462	11854896	C/T	C	Синонимичная (352 Ser/Ser)	Экзон 7
9	rs1801131 (A1298C)	11854476	A/C	A	Несинонимичная (429 Ala/Glu)	Экзон 8
10	rs17375901	11852516	C/T	C		Интрон 9
11	rs2274976 (G1793A)	11850927	A/G	G	Несинонимичная (594 Gln/Arg)	Экзон 12
12	rs1537516	11847861	C/T	C		(3'UTR)

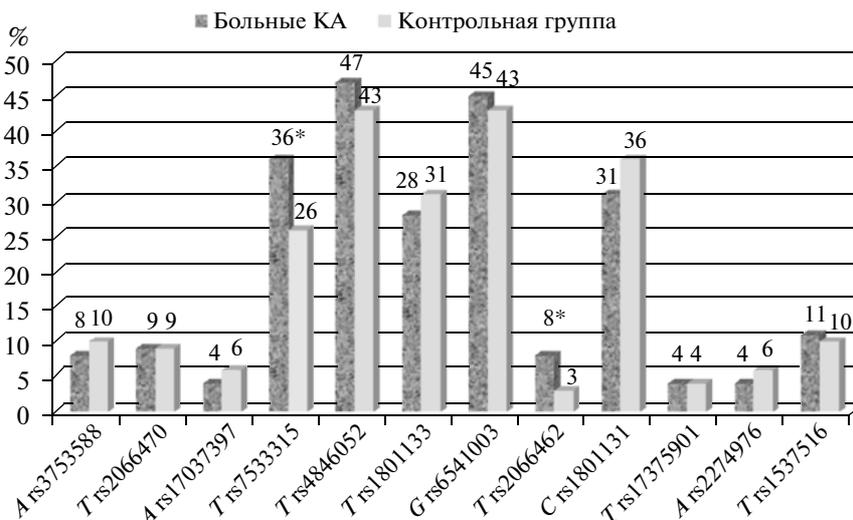
верженности к болезни, мы предполагали, что можно ожидать, во-первых, более значимых ассоциаций и более высокого относительного риска для определенных гаплотипов по сравнению с аллелями отдельных маркеров; во-вторых, более выраженной структуры неравновесия по сцеплению (**LD**) у больных по сравнению с контрольными или популяционными выборками; и, в-третьих, различия в структуре **LD** и связи гаплотипов с болезнью в популяциях различного этнического происхождения.

Задачей настоящей работы было проверить эту гипотезу на примере анализа структуры гаплотипов в локусе гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) в популяциях различного этнического происхождения и у больных коронарным атеросклерозом (**КА**).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках данной работы были обследованы группа больных **КА** и контрольная выборка. В группу больных вошли неродственные индивиды европеоидной национальности (128 мужчин и 13 женщин) с атеросклерозом коронарных артерий, наблюдавшиеся в НИИ кардиологии СО РАМН

(г. Томск). Средний возраст пациентов на момент обследования составил  $49 \pm 8$  лет. Наличие стенозирующего процесса в коронарных артериях было подтверждено ангиографическим обследованием. У большинства больных минимальная степень сужения артерии соответствовала II степени поражения по общепринятой классификации стенозов (стеноз более 50%). У 87% обследуемых пациентов первые клинические проявления ИБС возникли в возрасте до 55 лет, что дает повод рассматривать данную патологию в конкретном случае как заболевание с ранней формой проявления. Контрольную группу составили 126 неродственных индивидов (123 мужчины и 3 женщины), европеоиды по этнической принадлежности (средний возраст на момент обследования составил  $41 \pm 8$  лет), которые не имели клинических проявлений сердечно-сосудистых нарушений. У обследованных индивидов были проанализированы следующие параклинические признаки: содержание общего холестерина и триглицеридов в плазме крови, систолическое (**САД**) и диастолическое (**ДАД**) артериальное давление, антропометрические показатели. Генеалогические данные устанавливали на основании семейного анамнеза, клинические и антропометрические показатели – по истории болезни.



**Рис. 1.** Распределение частот (в %) минорных аллелей у больных КА и в контрольной группе. Статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ), полученные при сравнении частот аллелей в группе больных КА и в контрольной выборке, обозначены \*.

В качестве маркеров были выбраны следующие 12 SNPs (однонуклеотидных полиморфизмов) гена *MTHFR*: rs3753588, rs2066470, rs17037397, rs7533315, rs4846052, rs1801133 (C677T), rs6541003, rs2066462, rs1801131 (A1298C), rs17375901, rs2274976 (G1793A) и rs1537516, относительно равномерно охватывающие все экзоны, интроны и 3'-нетранслируемую область гена *MTHFR*. Частота минорного аллеля для большинства исследованных локусов составляет не менее 5% (по данным базы NSBI). В табл. 1 представлена локализация изученных полиморфных вариантов в гене *MTHFR*. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) согласно протоколам, описанным ранее [10–12].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов статистических программ “Statistica 7.0”, “ARLEQUIN” и “Haploview 4.0”. Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Роль генотипов изучаемых полиморфных вариантов гена в варибельности количественных признаков определяли с помощью критерия Крускала–Уоллиса [13]. В исследуемых группах для полиморфных вариантов вычисляли отношение шансов (OR) и доверительные интервалы (CI) для отношения шансов (95% CI). Частоты гаплотипов определяли с помощью EM-алгоритма. LD между парами SNPs оценивалось с помощью коэффициента  $D'$ , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции  $r^2$  Пирсона. Блочная структура определялась

посредством алгоритма “Solid spine LD” [14], предусмотренного программным обеспечением “Haploview 4.1”, с заданным порогом  $D' \geq 0.75$ . Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации вычисляли методом анализа молекулярной варибельности (AMOVA). Селективная нейтральность полиморфизмов в данной работе исследовалась с помощью теста Эвенса–Ваттерсона [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 и на рис. 1 представлены частоты аллелей и генотипов по всем анализируемым полиморфным вариантам у больных КА и в контрольной группе. В обеих группах практически по всем изученным локусам выполняется равновесие Харди–Вайнберга (исключение составляют лишь rs4846052 и rs6541003 в группе больных КА). Возможными причинами отклонения от равновесия в данном случае могут быть небольшой объем выборки или сцепление анализируемых SNPs с селективно значимыми.

### Оценка селективной нейтральности полиморфизмов гена *MTHFR*

Селективная нейтральность полиморфизмов гена *MTHFR* исследовалась с помощью теста Эвенса–Ваттерсона [15]. Из всех изученных SNPs отклонение от нейтральности в контрольной выборке и группе больных КА обнаружено только для двух полиморфных вариантов – rs4846052 и rs6541003. Все три функционально значимых SNPs, обуславливающих повышение уровня го-

**Таблица 2.** Распределение генотипов изученных полиморфных вариантов гена *MTHFR* у больных КА и в контрольной группе

№	Исследованные SNPs	Генотип	Частота, %		Значение критерия $\chi^2$ с поправкой Йейтса (уровень значимости $p$ )*	Отношение шансов – OR, (95%-ный доверительный интервал)**
			Контрольная группа ( $N = 126$ )	Больные КА ( $N = 141$ )		
1	rs3753588	AA	1	–	0.34 ( $p = 0.561$ )	0.80 (0.43–1.50)
		AG	18	16		
		GG	81	84		
2	rs2066470	CC	83	84	0.26 ( $p = 0.607$ )	0.97 (0.51–1.82)
		CT	16	15		
		TT	1	1		
3	rs17037397	AA	–	–	0.51 ( $p = 0.474$ )	0.69 (0.31–1.55)
		AC	11	8		
		CC	89	92		
4	rs7533315	CC	53	38	<b>4.38 (<math>p = 0.036</math>)</b>	1.60 (1.08–2.36)
		CT	42	52		
		TT	5	10		
5	rs4846052	CC	30	21	2.68 ( $p = 0.101$ )	1.19 (0.83–1.70)
		CT	53	63		
		TT	17	16		
6	rs1801133 (C677T)	CC	55	52	0.54 ( $p = 0.763$ )	1.14 (0.78–1.67)
		CT	39	40		
		TT	6	8		
7	rs6541003	AA	29	26	0.08 ( $p = 0.774$ )	1.09 (0.76–1.56)
		AG	56	59		
		GG	15	15		
8	rs2066462	CC	94	84	<b>4.82 (<math>p = 0.028</math>)</b>	2.71 (1.13–6.72)
		CT	6	16		
		TT	–	–		
9	rs1801131 (A1298C)	AA	40	48	1.12 ( $p = 0.290$ )	0.80 (0.55–1.17)
		AC	48	42		
		CC	12	10		
10	rs17375901	CC	91	92	0.01 ( $p = 0.958$ )	0.98 (0.38–2.55)
		CT	9	8		
		TT	–	–		
11	rs2274976 (G1793A)	AA	–	–	1.78 ( $p = 0.182$ )	0.35 (0.13–0.90)
		AG	13	7		
		GG	87	93		
12	rs1537516	CC	82	80	0.06 ( $p = 0.810$ )	1.12 (0.62–2.03)
		CT	17	18		
		TT	1	2		

Примечание.  $N$  – количество индивидов в группе. \* – значение критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса и уровень значимости  $p$  получены при сравнении частот генотипов группы больных КА и контрольной группы. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ). \*\* – отношение шансов и доверительный интервал приведены для минорных аллелей, обозначенных на рис. 1.

моцистеина (ГЦ) в крови, оказались селективно нейтральными. Аналогичные данные получены также для македонской популяции в исследовании Spiroski (2008): полиморфизмы С677Т и А1298С оказались селективно нейтральны у больных венозными тромбозами и в контрольной группе [16]. Вероятно, это объясняется тем, что даже некоторое изменение фенотипа может быть селективно нейтральным, если не влияет на репродуктивную эффективность. Тем не менее существуют данные о селекции аллеля 677Т и накоплении гомозигот 677ТТ в испанской популяции, основанные на изучении изменения распределения частот аллелей и генотипов данного SNP в течение XX в. Авторы связывают полученные результаты с увеличением в последней четверти XX в. потребления фолиевой кислоты женщинами в период зачатия, что приводит к повышению жизнеспособности плодов с генотипом 677ТТ на ранних стадиях эмбриогенеза [17]. Кроме того, подтверждением селективной значимости аллеля 677Т являются результаты исследования, основанного на анализе распределения частот аллелей и генотипов пяти полиморфизмов гена *MTHFR* в популяциях Израиля, Японии и Африки, которое показало, что аллель 677Т обнаруживается в гаплотипах, имеющих селективное преимущество [18].

#### *Ассоциация аллелей и генотипов локуса MTHFR с коронарным атеросклерозом*

Сравнение распределения частот генотипов и аллелей в контрольной группе и у пациентов с КА выявило значимые различия по двум полиморфным вариантам гена *MTHFR* (rs7533315 и rs2066462): частота аллеля Т, генотипов СТ и ТТ были статистически значимо выше в группе больных КА (табл. 3). Для всех исследованных маркеров отношение шансов для минорного аллеля варьировало от 0.35 до 2.71 (табл. 2). Анализ отношения шансов также подтвердил возможную связь генетической изменчивости rs7533315 и rs2066462 с наследственной предрасположенностью к КА (OR = 1.60; 95% CI: 1.08–2.36 и OR = 2.71; 95% CI: 1.13–6.72, соответственно).

В данном исследовании не получено статистически значимой взаимосвязи КА ни с одной из трех наиболее изученных несинонимичных замен гена *MTHFR* (С677Т, А1298С и G1793А). Однако КА ассоциирован с полиморфизмом rs7533315, расположенным в третьем интроне гена *MTHFR*, и синонимичной заменой 7-го экзона rs2066462. Можно предположить, что эффект синонимичной замены rs2066462 гена *MTHFR* на синтез кодируемого им белка может заключаться в нарушении сплайсинга или необходимости для клетки вовлекать более редкую тРНК, что замедляет синтез белка. Что касается маркера rs7533315, вероятно, полученная ассоциация обусловлена тем, что

данный SNP находится в тесном сцеплении ( $D' = 1$ ) с rs2066462 и с несинонимичной заменой rs2274976 (G1793A), но в силу малой частоты минорного аллеля А полиморфизма rs2274976 связь этой миссенс-мутации с КА не удалось зафиксировать на столь небольшой выборке. Данные о маркере rs2274976 в литературе крайне немногочисленны. Известно, что частота полиморфизма G1793A варьирует от 1.3% у евреев Ашкенази до 26.6% у индонезийцев о-ва Ява. Показано, что гетерозиготность по сайту G1793A приводит к повышению в крови уровня ГЦ на 40% [19]. Приводятся сведения об ассоциации этого SNP с раком эндометрия, плоскоклеточной карциномой, колоректальным раком и женским бесплодием. Некоторые исследователи выделяют rs2274976 как клинически важный полиморфизм, особенно при анализе генетической подверженности к МФЗ, в патогенез которых вовлечены нарушения фолатного метаболизма [20].

Возможно также, что маркер rs7533315 сцеплен с каким-то другим функционально значимым не исследованным в данной работе полиморфизмом гена *MTHFR*. Посредством проведенного в 2006 г. ресеквенирования гена *MTHFR* в четырех популяциях (европеоиды, африканцы, китайцы и мексиканцы) было выявлено 11 несинонимичных замен в данном локусе [21], наиболее распространенными из которых были только три SNPs (С677Т, А1298С и G1793А), остальные полиморфизмы встречались в отдельных популяциях с частотой от 0.8 до 2.5%.

Данные по поводу ассоциации аллельных вариантов гена *MTHFR* с ССЗ достаточно противоречивы. Многие авторы рассматривают полиморфизм С677Т гена *MTHFR* как независимый фактор риска сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, в том числе и коронарного атеросклероза. Однако другие исследователи не обнаруживают связи маркеров С677Т и А1298С с сосудистой патологией [22–28]. Например, Klerk и соавт. (2002) сообщили в своем мета-анализе об ассоциации между полиморфизмом С677Т и ИБС у европейского населения и отсутствии данной взаимосвязи в северо-американской популяции [29]. Другой мета-анализ 15 ассоциативных исследований также идентифицировал значимую взаимосвязь генотипа 677ТТ с КА (OR 1.67; 95% CI 1.21–2.31) [30]. Крупномасштабный анализ оценки вероятности значимых эффектов 23 исследований случай–контроль, охватывающий 5869 пациентов и 6644 индивидуумов контрольной группы, обнаружил, что маркер С677Т не является фактором риска ССЗ, но генотип 677ТТ связан с повышенной концентрацией ГЦ на 25% по сравнению с СС генотипом [31]. Тем не менее мета-анализ исследований, включающих в общей сложности 5644 пациента, проведенный Wu и Tsongalis в 2001 г. [32], показал, что 677ТТ гомози-

Таблица 3. Сравнение исследованных групп по количественным признакам

№	Исследуемые SNPs	Генотипы	Средние значения количественных признаков в исследованных группах						
			Общий холестерин, моль/л		Триглицериды, моль/л		ЛПВП, моль/л		
			Большие КА	Контрольная группа	Большие КА	Контрольная группа	Большие КА	Контрольная группа	Большие КА
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	rs3753588	AA	6.75 ± 0.00	–	1.53 ± 0.11	–	1.42 ± 0.07	–	–
		AG	6.11 ± 0.14	5.84 ± 0.28	1.76 ± 0.37	1.72 ± 0.22	1.35 ± 0.04	0.89 ± 0.08	
		GG	5.78 ± 0.35	5.43 ± 0.12	1.22 ± 0.08	1.50 ± 0.80	1.32 ± 0.05	0.97 ± 0.04	
		H	2.06	1.46	3.21	0.65	0.34	1.84	
		p	0.361	0.235	0.201	0.423	0.843	0.175	
		CC	5.74 ± 0.15	5.44 ± 0.21	1.23 ± 0.06	1.64 ± 0.08	1.33 ± 0.03	0.98 ± 0.04	
		CT	6.34 ± 0.33	5.89 ± 0.14	1.51 ± 0.15	1.97 ± 0.15	1.34 ± 0.07	0.94 ± 0.06	
		TT	6.74 ± 0.48	6.39 ± 0.82	0.62 ± 0.11	2.36 ± 0.08	1.42 ± 0.32	0.68 ± 0.02	
2	rs2066470	H	3.86	5.17	2.81	4.47	0.16	2.90	
		p	0.145	0.076	0.245	0.107	0.922	0.241	
		AC	5.80 ± 0.18	5.71 ± 0.45	1.47 ± 0.35	1.92 ± 0.37	1.32 ± 0.08	0.83 ± 0.11	
		CC	5.86 ± 0.15	5.47 ± 0.11	1.29 ± 0.10	1.50 ± 0.07	1.33 ± 0.03	0.97 ± 0.03	
		H	0.06	0.14	0.09	1.32	0.04	1.96	
		p	0.80	0.71	0.77	0.25	0.834	0.162	
		CC	5.83 ± 0.18	<b>5.24 ± 0.17</b>	1.29 ± 0.08	1.53 ± 0.11	1.37 ± 0.04	<b>1.12 ± 0.06</b>	
		CT	5.85 ± 0.21	<b>5.72 ± 0.14</b>	1.21 ± 0.09	1.81 ± 0.09	1.32 ± 0.04	<b>1.04 ± 0.04</b>	
4	rs7533315	TT	5.85 ± 0.61	<b>5.87 ± 0.33</b>	1.55 ± 0.27	1.85 ± 0.21	1.22 ± 0.13	<b>0.84 ± 0.08</b>	
		H	0.05	<b>5.97</b>	2.88	4.21	0.50	<b>10.67</b>	
		p	0.974	<b>0.048</b>	0.237	0.121	0.780	<b>0.005</b>	
		CC	5.74 ± 0.24	5.26 ± 0.21	1.26 ± 0.16	1.41 ± 0.13	1.34 ± 0.05	0.89 ± 0.07	
		CT	5.94 ± 0.21	5.52 ± 0.14	1.27 ± 0.11	1.55 ± 0.10	1.36 ± 0.09	1.02 ± 0.04	
		TT	5.77 ± 0.18	5.67 ± 0.29	1.53 ± 0.35	1.66 ± 0.21	1.24 ± 0.07	0.88 ± 0.07	
		H	0.40	1.82	0.14	0.99	2.40	3.16	
		p	0.82	0.40	0.93	0.61	0.300	0.206	
5	rs4846052	CC	6.03 ± 0.20	5.66 ± 0.16	1.42 ± 0.17	1.61 ± 0.10	<b>1.33 ± 0.04</b>	0.97 ± 0.04	
		CT	5.63 ± 0.23	5.30 ± 0.17	1.19 ± 0.12	1.49 ± 0.12	<b>1.30 ± 0.05</b>	0.92 ± 0.05	
		TT	5.88 ± 0.24	5.37 ± 0.27	1.24 ± 0.12	1.33 ± 0.27	<b>1.19 ± 0.08</b>	1.11 ± 0.16	
		H	3.36	1.15	1.77	1.94	<b>5.07</b>	1.95	
		p	0.19	0.56	0.41	0.38	<b>0.079</b>	0.377	
		CC	5.83 ± 0.18	5.24 ± 0.17	1.29 ± 0.08	1.53 ± 0.11	1.37 ± 0.04	1.12 ± 0.06	
		CT	5.85 ± 0.21	5.72 ± 0.14	1.21 ± 0.09	1.81 ± 0.09	1.32 ± 0.04	1.04 ± 0.04	
		TT	5.85 ± 0.61	5.87 ± 0.33	1.55 ± 0.27	1.85 ± 0.21	1.22 ± 0.13	0.84 ± 0.08	
6	rs1801133	H	0.05	5.97	2.88	4.21	0.50	10.67	
		p	0.974	0.048	0.237	0.121	0.780	0.005	
		CC	5.74 ± 0.24	5.26 ± 0.21	1.26 ± 0.16	1.41 ± 0.13	1.34 ± 0.05	0.89 ± 0.07	
		CT	5.94 ± 0.21	5.52 ± 0.14	1.27 ± 0.11	1.55 ± 0.10	1.36 ± 0.09	1.02 ± 0.04	
		TT	5.77 ± 0.18	5.67 ± 0.29	1.53 ± 0.35	1.66 ± 0.21	1.24 ± 0.07	0.88 ± 0.07	
		H	0.40	1.82	0.14	0.99	2.40	3.16	
		p	0.82	0.40	0.93	0.61	0.300	0.206	
		CC	6.03 ± 0.20	5.66 ± 0.16	1.42 ± 0.17	1.61 ± 0.10	1.33 ± 0.04	0.97 ± 0.04	

Таблица 3. Окончание

№	Исследуемые SNPs	Генотипы	Средние значения количественных признаков в исследованных группах							
			Общий холестерин, моль/л		Триглицериды, моль/л		ЛПВП, моль/л			
			Контрольная группа	Больные КА	Контрольная группа	Больные КА	Контрольная группа	Больные КА		
1	2	3	4	5	6	7	8	9		
		AA	5.77 ± 0.25	<b>5.08 ± 0.20</b>	1.26 ± 0.11	<b>1.41 ± 0.13</b>	1.30 ± 0.05	0.91 ± 0.09		
		AG	5.91 ± 0.18	<b>5.67 ± 0.13</b>	1.24 ± 0.08	<b>1.79 ± 0.09</b>	1.37 ± 0.04	0.98 ± 0.04		
7	rs6541003	GG	5.73 ± 0.23	<b>5.87 ± 0.26</b>	1.38 ± 0.15	<b>1.88 ± 0.17</b>	1.24 ± 0.07	0.94 ± 0.07		
		H	0.13	<b>7.24</b>	1.42	<b>9.57</b>	2.57	0.12		
		p	0.936	<b>0.027</b>	0.491	<b>0.008</b>	0.276	0.943		
		CC	5.83 ± 0.14	5.48 ± 0.11	1.27 ± 0.06	<b>1.64 ± 0.07</b>	1.34 ± 0.03	<b>1.07 ± 0.04</b>		
		CT	6.01 ± 0.05	5.94 ± 0.26	1.24 ± 0.24	<b>2.04 ± 0.17</b>	1.21 ± 0.11	<b>0.83 ± 0.07</b>		
8	rs2066462	H	0.65	2.02	0.13	<b>5.77</b>	1.22	<b>6.26</b>		
		p	0.421	0.155	0.723	<b>0.029</b>	0.269	<b>0.012</b>		
		AA	5.76 ± 0.20	<b>5.17 ± 0.16</b>	1.22 ± 0.13	<b>1.42 ± 0.12</b>	1.23 ± 0.09	0.93 ± 0.05		
		AC	6.04 ± 0.22	<b>5.70 ± 0.15</b>	1.43 ± 0.16	<b>1.57 ± 0.11</b>	1.33 ± 0.08	1.00 ± 0.05		
9	rs1801131	CC	5.50 ± 0.20	<b>6.12 ± 0.41</b>	1.15 ± 0.20	<b>1.96 ± 0.30</b>	1.11 ± 0.17	0.91 ± 0.08		
		H	1.57	<b>8.17</b>	1.01	<b>6.30</b>	0.800	1.54		
		p	0.46	<b>0.017</b>	0.60	<b>0.043</b>	0.670	0.462		
		CC	<b>5.74 ± 0.13</b>	<b>5.40 ± 0.15</b>	1.29 ± 0.09	<b>1.46 ± 0.08</b>	1.27 ± 0.09	0.98 ± 0.04		
		CT	<b>7.09 ± 0.57</b>	<b>6.67 ± 0.32</b>	1.55 ± 0.63	<b>2.40 ± 0.23</b>	1.23 ± 0.20	0.89 ± 0.07		
10	rs17375901	H	<b>8.31</b>	<b>10.20</b>	0.56	<b>12.53</b>	0.67	2.60		
		p	<b>0.0039</b>	<b>0.0014</b>	0.45	<b>0.0004</b>	0.979	0.107		
		AG	5.53 ± 0.27	5.61 ± 0.15	1.66 ± 0.37	1.52 ± 0.08	1.52 ± 0.16	0.88 ± 0.17		
		GG	5.90 ± 0.15	5.48 ± 0.50	1.26 ± 0.10	1.80 ± 0.37	1.23 ± 0.06	0.97 ± 0.09		
11	rs2274976	H	0.17	0.001	0.27	0.66	0.10	0.705		
		p	0.68	0.97	0.60	0.42	0.933	0.401		
		CC	5.75 ± 0.15	<b>5.37 ± 0.16</b>	1.22 ± 0.08	<b>1.45 ± 0.09</b>	1.22 ± 0.06	0.97 ± 0.04		
		CT	6.37 ± 0.35	<b>5.85 ± 0.24</b>	1.83 ± 0.41	<b>1.79 ± 0.19</b>	1.52 ± 0.14	0.97 ± 0.06		
12	rs1537516	TT	5.84 ± 0.91	<b>6.69 ± 0.86</b>	0.74 ± 0.20	<b>2.67 ± 0.46</b>	0.85 ± 0.46	0.81 ± 0.13		
		H	3.03	<b>5.93</b>	<b>2.48</b>	<b>8.64</b>	0.11	1.94		
		p	0.22	<b>0.049</b>	<b>0.29</b>	<b>0.013</b>	0.995	0.378		

Примечание. H – значение критерия Крускала–Уоллиса, жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ( $p < 0.05$ ).

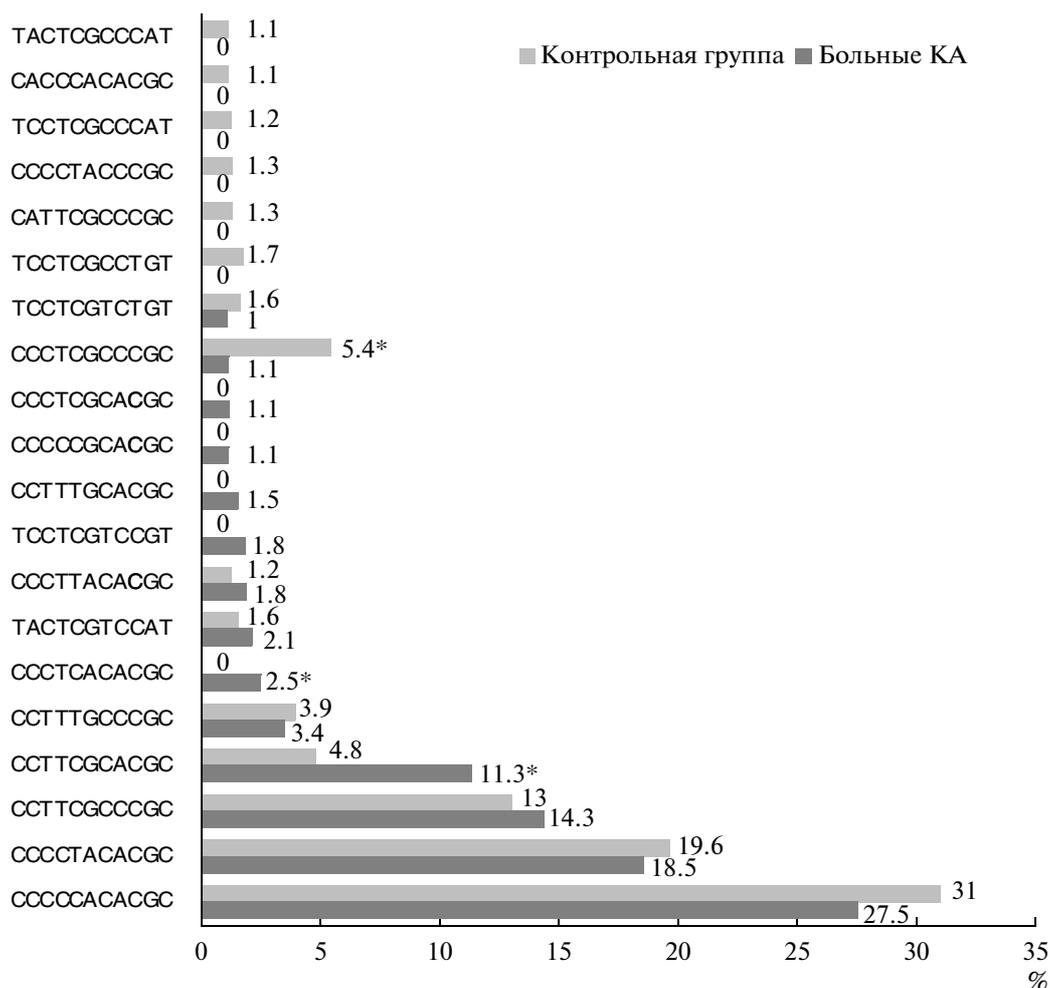


Рис. 2. Распределение частот (в %) гаплотипов у больных КА и в контрольной группе.

готный вариант ассоциирован с повышенным риском КА (OR 1.30; 95% CI 1.11–1.52), противоположные результаты были получены в работе Nakai и соавт. (2001) [33]. Вышеописанные противоречия могут объясняться различными подходами к планированию исследования, вовлечением генетических маркеров в процессы патогенеза КА в одних популяциях и отсутствием такого механизма в других. Необходимо остановиться на существенных моментах, касающихся популяционно-генетических процессов, которые также могут приводить к разноречивым результатам. В различных популяциях и этно-географических группах ассоциации формируются на различном генетическом и средовом фоне. Возникновение мутации, выражающейся, допустим, в повышении предрасположенности к КА, могло происходить неоднократно и в различном аллельном окружении. Известно, что любой новый аллель изначально ассоциирован с другими аллелями, на фоне которых этот аллель возник. И хотя каждый SNP может анализироваться независимо, вероят-

но, более информативно изучать их в гаплотипах, специфических для популяций вследствие уникальной демографической истории.

#### Структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в исследованных группах

В настоящей работе анализ гаплотипов проводился по 11 SNPs гена *MTHFR* (маркер rs3753588 был исключен вследствие отсутствия в панели проекта HarMap). У пациентов с КА было обнаружено 14 гаплотипов из 4096 теоретически возможных, в контрольной выборке – 15 (рис. 2), девять гаплотипов были идентичными для обеих групп. У больных КА наблюдалось четыре основных гаплотипа (с частотой более 10%), в контрольной группе – три. Сравнительный анализ частот гаплотипов выявил статистически значимую ассоциацию с КА гаплотипов ССТТГСАСС ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 6.91,  $p = 0.009$ ; OR 2.57, 95% CI 1.24–5.39) и СССТСАСАСС

(при сравнении критерием Фишера  $p = 0.017$ ; RR 1.92, 95% CI 1.77–2.08). Кроме того, обнаружен один протективный гаплотип CCCTCGC-CCGC (при сравнении критерием Фишера  $p = 0.003$ ; OR 0.18, 95% CI 0.04–0.69), по остальным гаплотипам значимых различий не найдено. Рисковый гаплотип – CCTTCGCACGC содержит один мутантный аллель *T* (выделен жирным шрифтом) маркера rs7533315, для которого в данном исследовании была зафиксирована ассоциация с КА. Однако все остальные аллели данного гаплотипа являются предковыми, что указывает на возможное тесное сцепление rs7533315 с каким-то не исследованным в текущей работе функционально значимым SNP гена *MTHFR*. Гаплотип CCTTCACACGC, также ассоциированный с КА, включает мутантный аллель по локусу rs6541003, для которого в настоящем исследовании получены данные, свидетельствующие о вероятном действии на этот локус стабилизирующего отбора как в контрольной группе, так и у больных КА.

Гаплотип CCCTCGCCCCGC включает в себя только один мутантный аллель *C*, принадлежащий функционально значимому маркеру гена *MTHFR* – rs1801133 (A1298C). Тем не менее в нашем исследовании этот гаплотип показал выраженный протективный эффект в отношении КА. Однако необходимо отметить, что данный гаплотип не наблюдается в некоторых монголоидных популяциях (буряты, китайцы, японцы) и статистически значимо чаще встречается у русских по сравнению с другими анализируемыми популяциями [34]. На сегодняшний день вопрос о влиянии полиморфизма A1298C гена *MTHFR* на уровень гомоцистеина в плазме остается открытым. Ряд исследований на эту тему показал достаточно противоречивые результаты [35, 36]. Было выдвинуто предположение, что генотип 677TT имеет значительно больший эффект на активность *MTHFR*, чем вариант 1298CC, в силу своего расположения в каталитическом домене фермента, в то время как полиморфизм A1298C, локализованный в участке, кодирующем С-терминальный регуляторный домен, способствует незначительному изменению активности *MTHFR* посредством нарушения связывания данного фермента с его ингибитором S-аденозилметионином [37].

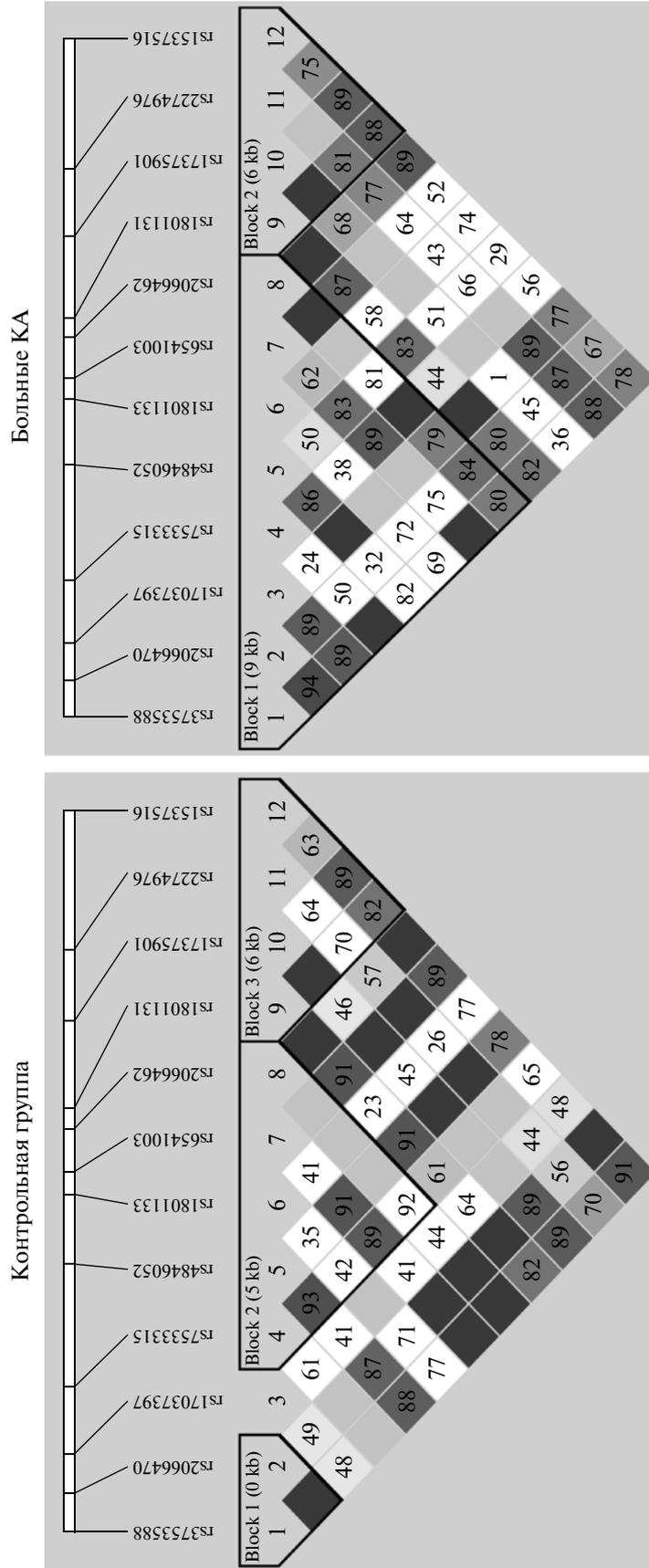
Ранее нами был проведен филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов гена *MTHFR* [34], который демонстрирует, что именно эти три гаплотипа, находящиеся в одном мутационном шаге от предполагаемого гаплотипа-основателя, условно “разбивают” филогенетическое древо на три основных кластера. Этот наблюдаемый факт представляется крайне интересным в контексте

эволюционных аспектов генетической архитектуры атеросклероза и, на наш взгляд, требует дальнейшего изучения.

Показано, что использование гаплотипов, а не SNPs в ассоциативных исследованиях может существенно повысить статистическую мощность теста, особенно если предрасполагающие к заболеванию полиморфизмы не анализируются непосредственно или в случае существования высокой степени мультилокусного LD [38, 39]. Имитационное моделирование, проведенное Акеу и соавт. (2001), продемонстрировало, что мощность гаплотипических тестов находится под влиянием генетической дистанции между наблюдаемыми маркерами и причинной мутацией, а также частот аллелей и возраста этой мутации [40]. Одним из интересных свойств гаплотипа является нерандомизированная ассоциация среди SNPs, составляющих его так называемое неравновесие по сцеплению.

Ранее нами была показана популяционная специфичность структуры неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в различных популяциях Евразии [34, 41]. Настоящая работа подтверждает также наличие и межгрупповых различий в структуре LD локуса *MTHFR* (рис. 3). В контрольной выборке, которая по своим параметрам близка к популяции русского населения г. Томска [42], выявлены три блока: первый – из двух близко расположенных SNPs (rs3753588 и rs2066470), второй включает пять полиморфизмов – rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003 и rs2066462, третий состоит из четырех SNPs – rs1801131, rs17375901, rs2274976 и rs1537516. Примечательно, что считающийся наиболее функционально значимым полиморфизмом гена *MTHFR* вариант C677T (rs1801133) не показывает тесного сцепления ни с одним из исследованных маркеров. Необходимо отметить, что характер структуры LD в группе пациентов с КА и контрольной выборке, полученный в данной работе, носит во многом схожие черты. И в том и в другом случае несомненно наличие “горячей точки” рекомбинации между rs2066462 и rs1801131. Также в обеих группах наблюдается гаплотипический блок в 3'-области гена, включающий в себя идентичные SNPs. Однако в 5'-области гена сцепление более выражено у больных КА.

Дополнительным подтверждением ассоциации наблюдаемой гаплотипической структуры гена *MTHFR* с коронарным атеросклерозом в данной работе является выявленная взаимосвязь исследованных маркеров гена *MTHFR* с патогенетически значимыми показателями липидного обмена.



**Рис. 3.** Структура неравновесия по сцеплению в гене *MTHFR* в исследованных популяциях. В ячейках указано значение коэффициента сцепления  $D' \times 0.01$  (пустая ячейка обозначает  $D' = 1$ ), цветовая гамма отображает силу сцепления между SNPs: темно-серый – сильное сцепление ( $D' = 1$ ,  $LOD > 2$ ), светло-серый – значительное сцепление ( $D' < 1$ ,  $LOD > 2$ ), белый – слабое сцепление ( $D' < 1$ ,  $LOD < 2$ ).

*Анализ ассоциаций с патогенетически значимыми количественными признаками*

Посредством множественного сравнения в данной работе была найдена ассоциация генотипов шести SNPs: rs7533315, rs6541003, rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs1537516 с вариабельностью содержания в плазме общего холестерина (ОХС) и/или триглицеридов (ТГ) в группе больных коронарным атеросклерозом (табл. 3). Примечательно, что ассоциации с показателями липидного обмена зафиксированы для генотипов трех из четырех SNPs, входящих во второй блок сцепления у больных КА. В контрольной группе выявлено статистически значимое повышение содержания ОХС у гетерозигот по rs17375901. Необходимо отметить, что в группе больных КА максимальный уровень ОХС и ТГ соответствовал гомозиготе по “мутантному” аллелю (rs7533315, rs1801131, rs1537516) или гетерозиготе, включающей данный аллель (rs2066462, rs17375901). Обратная тенденция наблюдалась для rs6541003: носители предкового генотипа по данному локусу имели достоверно повышенные уровни ОХС и ТГ по сравнению с “мутантными” гомозиготами. Показатели САД и ДАД крови, содержание ЛПНП в плазме и индекс массы тела (ИМТ) у носителей различных генотипов локуса *MTHFR* достоверно не отличались ни в одной из групп.

С уровнем ЛПВП у больных КА показали корреляцию только два полиморфных варианта (rs7533315 и rs2066462), для которых в настоящем исследовании была выявлена ассоциация с КА. В контрольной группе была отмечена лишь тенденция ассоциации генотипов маркера С677Т с содержанием ЛПВП. Согласно полученным данным, гомозиготы 677ТТ имеют более низкий уровень ЛПВП по сравнению с гетерозиготами и гомозиготами по предковому аллелю. Аналогичные результаты получены в работе Real и соавт. (2009), исследовавших взаимосвязь генотипов полиморфизма С677Т, содержания в плазме гомоцистеина и липопротеинов при семейной гиперхолестеринемии. В данном исследовании генотип 677ТТ и повышенный уровень ГЦ в плазме были ассоциированы со сниженным содержанием ЛПВП [43]. В исследовании японских ученых показана достоверная ассоциация генотипа 677ТТ и уровня ЛПВП при развитии атеротромботического инфаркта [44].

Результаты крупномасштабного сероэпидемиологического исследования, проведенного в испанской популяции, показали, что сочетание таких факторов риска ССЗ, как дефицит фолата (<5.3 nmol/l), ЛПВП (<35 mg/dl) и носительство генотипа 677ТТ, повышает риск развития гипер-

гомоцистеинемии (ГЦ) в 87 раз [45]. Механизмы, обуславливающие ассоциации ГЦ, полиморфизмов гена *MTHFR* и уровня липопротеинов плазмы, на сегодняшний день не известны. Многочисленные эксперименты, проведенные на культурах эндотелиальных клеток, показали, что ГЦ сопровождается генерацией оксидантов, которые помимо цитотоксического эффекта обладают способностью инициировать окисление липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Кроме того, при ГЦ в мембранах и межклеточном пространстве эндотелиоцитов повышается концентрация ЛПНП и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), вследствие недостатка метила при синтезе белковой компоненты липопротеинов. Недавно *in vitro* продемонстрировано ГЦ-индуцированное повышение экспрессии генов, отвечающих за биосинтез и поглощение ХС, ТГ и межклеточную аккумуляцию ХС [46]. Показано также, что одним из путей метаболизма ГЦ в организме человека является его преобразование в тиоэфир ГЦ-тиолактон. Jakubowski и соавт. в 1997 г. сформулирована гипотеза участия ГЦ-тиолактона в развитии атеротромбоза и модификации липопротеинов. Позднее было выявлено повышение тканевого уровня ГЦ и его метаболита ГЦ-тиолактона у больных ИБС [47].

Таким образом, на сегодняшний день многочисленные биохимические и генетические данные подтверждают, что увеличение уровня ГЦ, часто обусловленное мутациями генов фолатного обмена, способствует формированию проатеротромботического фенотипа. Представленные результаты свидетельствуют о несомненном участии полиморфных вариантов гена *MTHFR* в детерминации КА. Однако с клинической точки зрения ассоциации генетических маркеров с КА, хотя и свидетельствуют о повышенном риске развития заболевания, не являются достаточно информативными для того, чтобы предоставить дополнительную диагностическую информацию. Также в результате настоящего исследования нами обнаружены существенные различия в структуре LD гена *MTHFR* в популяциях различного этнического происхождения и сходные черты в архитектуре гаплотипических паттернов в выборках из одной популяции, дифференцированных по наличию/отсутствию коронарного атеросклероза; выявлена высокодостоверная ассоциация определенных гаплотипов и SNPs гена *MTHFR* с атеросклерозом коронарных артерий; обнаружена взаимосвязь генетической вариабельности *MTHFR* с патогенетически значимыми показателями липидного обмена; продемонстрирована высокая информативность гаплотипического подхода в анализе ассоциаций с МФЗ методом

случай—контроль. Полученные в настоящей работе данные представляют, по нашему мнению, значительный интерес в понимании нескольких генетических феноменов: межпопуляционных различий в характере LD; структуры генетической компоненты МФЗ с точки зрения сравнительной информативности ассоциативных связей с болезнью на уровне отдельных маркеров и гаплотипов; функциональной значимости и плейотропного “поля действия” гена *MTHFR*.

Крайне любопытным представляется факт отсутствия ассоциации с атеросклерозом и его эндотипами полиморфизма С677Т, как при анализе отдельных SNPs, так и при оценке гаплотипической варибельности гена *MTHFR*; также интересно отсутствие у больных достоверного сцепления данного маркера со всеми остальными исследованными полиморфизмами. Большая часть накопленных данных по ассоциации гена *MTHFR* с мультифакториальными состояниями, включая сердечно-сосудистые заболевания, касается именно этой миссенс-мутации, приводящей к синтезу термолabile варианта фермента. Можно предположить, что эффект этого SNPs в отношении сердечно-сосудистой патологии, если он является атрибутом самой замены, не столь велик, чтобы быть зафиксированным в таких относительно небольших выборках, как в настоящей работе. Вполне вероятно также, что в силу популяционных особенностей структуры неравновесия по сцеплению С677Т может входить в состав связанных с болезнью гаплотипов в одних популяциях, но не входить в других, как продемонстрировано в данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГК № П321) и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (ГК № 11.519.11.2036).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cambien F., Tiret L.* Genetics of cardiovascular diseases from single mutations to the whole genome // *Circulation*. 2007. V. 116. P. 1714–1724.
2. *Carlson C.S., Eberle M.A., Rieder M.J. et al.* Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 518–521.
3. *Collins A., Lau W., De La Vega F.M.* Mapping genes for common diseases: the case for genetic (LD) maps // *Human Heredity*. 2004. V. 58. P. 2–9.
4. *Altshuler D., Daly M.J., Lander E.S.* Genetic mapping in human disease // *Science*. 2008. V. 322. P. 881–888.
5. *Petterson F.H., Anderson C.A., Clarke G.M. et al.* Marker selection for genetic case-control association studies // *Nature Protocols*. 2009. V. 4. № 5. P. 743–752.
6. *Crawford D.C., Nickerson D.A.* Definition and clinical importance of haplotypes // *Annu. Rev. Med.* 2005. V. 56. P. 303–320.
7. *Zhang K., Qin Z., Chen T. et al.* HapBlock: haplotype block partitioning and tag SNP selection software using a set of dynamic programming algorithms // *Bioinformatics*. 2005. V. 21. P. 131–134.
8. *Slatkin M.* Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future // *Genetics*. 2008. V. 9. P. 477–485.
9. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome // *Nature*. 2005. V. 437. P. 1299–1320.
10. *Frost P., Blom H.J., Milos R. et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation methylenetetrahydrofolate reductase // *Nat. Genet.* 1995. № 10. P. 111–113.
11. *Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y.* A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations // *J. Nutr.* 1999. № 129. P. 1656–1661.
12. *Трифорова Е.А., Спиридонова М.Г., Пузырёв В.П. и др.* Структура гаплотипов локуса метилентетрагидрофолатредуктазы: популяционная специфичность и ассоциация с коронарным атеросклерозом // *Мед. генетика*. 2009. № 1(79). С. 39–47.
13. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
14. *Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // *Bioinformatics*. 2005. № 21. P. 263–265.
15. *Watterson G.A.* On the number of segregating sites in genetical models without recombination // *Theor. Popul. Biol.* 1975. V. 7. P. 256–276.
16. *Spiroski I., Kedev S., Antov S. et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*-677 and *MTHFR*-1298) genetic polymorphisms with occlusive artery disease and deep venous thrombosis in Macedonians // *Croat Med. J.* 2008. V. 49. P. 39–49.
17. *Mayor-Olea A., Callejon G., Palomares A.R. et al.* Human genetic selection on the *MTHFR* 677C>T polymorphism // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. P. 104.
18. *Rosenberg N., Murata M., Ikeda Y. 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. V. 70. P. 758–762.
19. *Mao R., Fan Y., Chen F. et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in 13 Chinese ethnic populations // *Cell Biochem. Funct.* 2008. V. 26. P. 352–358.
20. *Melo S.S., Persuhn D.C., Meirelles N. et al.* G1793A polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate gene: Effect of folic acid on homocysteine levels // *Mol. Nutr. Food Res.* 2006. V. 50. P. 769–774.

21. *Martin Y.N., Salavaggione O.E., Eckloff B.W.* Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006. V. 16. P. 265–277.
22. *Freitas A.I., Mendonça I., Guerra G.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: the A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal) // *Thromb. Res.* 2008. V. 122(5). P. 648–656.
23. *Sarecka-Hujar B., Żak I., Krauze J.* Carrier-state of two or three polymorphic variants of *MTHFR*, IL-6 and ICAM1 genes increases the risk of coronary artery disease // *Kardiologia Polska*. 2008. V. 66. № 12. P. 1369–1377.
24. *Szczeklik A., Sanak M., Jankowski M. et al.* Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: Risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia // *Am. J. Med. Genetics*. 2001. V. 101. P. 36–39.
25. *Zak I., Niemiec P., Sarecka B. et al.* Carrier-state of D allele in ACE gene insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C677T transition in the *MTHFR* gene // *Acta Biochimica Polonica*. 2003. V. 50 №. 2. P. 527–534.
26. *Girelli D., Martinelli N., Pizzolo F. et al.* The interaction between *MTHFR* 677 C→T genotype and folate status is a determinant of coronary atherosclerosis risk // *J. Nutr.* 2003. V. 133. P. 1281–1285.
27. *Morita H., Kurihara H., Tsubaki S. et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998. V. 18. P. 1465–1469.
28. *Hsu L.A., Ko Y.L., Wang S.M. et al.* The C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with the risk of coronary artery disease or venous thrombosis among Chinese in Taiwan // *Hum. Hered.* 2001. V. 51(1–2). P. 41–45.
29. *Klerk M., Verhoef P., Clarke R. et al.* *MTHFR* studies collaboration group. *MTHFR* 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis // *JAMA*. 2002. V. 288. P. 2023–2031.
30. *Debette S., Markus H.S.* The genetics of cervical artery dissection: a systematic review // *Stroke*. 2009. V. 40(6). P. 459–466.
31. *Brattström L., Wilcken D.E., Ohrvik J., Brudin L.* Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis // *Circulation*. 1998. V. 98. P. 2520–2526.
32. *Wu A.H., Tsongalis G.J.* Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases // *Am. J. Cardiol.* 2001. V. 15. № 87(12). P. 1361–1366.
33. *Nakai K., Itoh C., Nakai K. et al.* Correlation between C677T *MTHFR* gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD // *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2001. V. 1(5). P. 353–361.
34. *Трифоновна Е.А., Еремина Е.Р., Урнов Ф.Д. и др.* Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в популяциях Северной Евразии // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 1(12). С. 79–96.
35. *Poduri A., Mukherjee D., Sud K. et al.* *MTHFR* A1298C polymorphism is associated with cardiovascular risk in end stage renal disease in North Indians // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 308(1–2). P. 43–50.
36. *Fung M.M., Salem R.M., Lipkowitz M.S.* Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism A1298C (Glu429Ala) predicts decline in renal function over time in the African-American study of kidney disease and hypertension (AASK) trial and Veterans Affairs Hypertension Cohort (VAHC) // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011. V. 10. P. 1–9.
37. *Kolling K., Ndrepepa G., Koch W. et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease // *Am. J. Cardiol.* 2004. V. 93. P. 1201–1206.
38. *Schaid D.J.* Linkage disequilibrium testing when linkage phase is unknown // *Genetics*. 2004. V. 166. P. 505–512.
39. *Zeng D., Lin D.Y.* Estimating haplotype-disease associations with pooled genotype data // *Genet. Epidemiol.* 2005. V. 28(1). P. 70–82.
40. *Akey J., Jin L., Xiong M.* Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? // *Eur. J. Hum. Genet.* 2001. V. 9(4). P. 291–300.
41. *Трифоновна Е. А., Спиридонова М. Г., Степанов В.А.* Генетическое разнообразие и неравновесие по сцеплению в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 10. С. 1410–1419.
42. *Кучер А.Н., Иванова О.Ф., Пузырев В.П. и др.* Генетико-демографическая характеристика современного сибирского города (на примере г. Томска) // *Генетика*. 1994. Т. 30. № 2. С. 276–281.
43. *Real J.T., Martinez-Hervas S., Garcia-Garcia A.B. et al.* Association of C677T polymorphism in *MTHFR* gene, high homocysteine and low HDL cholesterol plasma values in heterozygous familial hypercholesterolemia // *J. Atheroscler. Thromb.* 2009. V. 16(6). P. 815–820.
44. *Kawamoto R., Kohara K., Oka Y. et al.* An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene polymorphism and ischemic stroke // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2005. V. 14(2). P. 67–74.
45. *Gil-Prieto R., Hernández V., Cano B. et al.* Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study // *Nutr. Metab. (Lond)*. 2009. V. 5. P. 6–39.
46. *Liao D., Yang X., Wang H.* Hyperhomocysteinemia and high-density lipoprotein metabolism in cardiovascular disease // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. V. 45(12). P. 1652–1659.
47. *Jakubowski H.* The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease // *J. Phys. Pharm.* 2008. V. 59 (19). P. 155–167.

## Analysis of the *MTHFR* Gene Linkage Disequilibrium Structure and Association of Polymorphic Gene Variants with Coronary Atherosclerosis

E. A. Trifonova<sup>a</sup>, M. G. Spiridonova<sup>a</sup>, T. V. Gabidulina<sup>b</sup>, F. D. Urnov<sup>c</sup>,  
V. P. Puzyrev<sup>a</sup>, and V. A. Stepanov<sup>a, d</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634050 Russia  
e-mail: ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

<sup>b</sup>Siberian State Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology, Tomsk, 634050 Russia

<sup>c</sup>University of California, Department of Molecular and Cell Biology, Berkeley, CA, 94720 USA

<sup>d</sup>Tomsk State University, Department of Cytology and Genetics, Tomsk, 634050 Russia

Analysis of the genome-specific linkage disequilibrium patterns in certain populations is a highly promising approach to the identification of functional variants that underlie susceptibility to complex diseases. In the present study, the linkage disequilibrium patterns of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) were examined in a group of patients with coronary atherosclerosis (coronary artery disease, CAD) and in a control sample from the Russian population. It was demonstrated that in the samples from one population, which were differentiated by the presence or absence of CAD, the *MTHFR* linkage disequilibrium patterns had similar features. Association of the *MTHFR* rs7533315 and rs2066462 polymorphisms with CAD was demonstrated. In addition, the evolution of the haplotypes and their role in the formation of CAD in the Russian population was reconstructed. The data on the association between genetic variability in the *MTHFR* locus and pathogenetically important indices of lipid metabolism were obtained. The high informativeness of the haplotype approach in case–control tests for associations with CAD was demonstrated.