

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



МАРКОВСКИЙ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФОЛАТНОГО
ЦИКЛА И АМИНОТИОЛОВ ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент

Н.Н. Страмбовская

Научный консультант:

Заслуженный работник высшей

школы РФ, доктор медицинских наук,

профессор Ю.А. Витковский

Чита – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Физиологическая роль фолатного обмена и метаболизм гомоцистеина	15
1.2. Молекулярно-генетические и негенетические факторы риска гипергомоцистеинемии	19
1.3. Заболевания, ассоциированные с нарушениями фолатного обмена	23
1.3.1. Гипергомоцистеинемия и соматическая патология	23
1.3.2. Нарушения метаболизма гомоцистеина и канцерогенез	25
1.3.3. Рак молочной железы: эпидемиология, этиология и патогенез	29
1.3.4. Доброкачественные заболевания молочных желез: эпидемиология, этиология и патогенез	33
1.4. Генетический полиморфизм генов белков фолатного метаболизма в патогенезе пролиферативных заболеваний	36
1.5. Заключение	39
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Общая характеристика клинического материала.....	41
2.2. Развернутая характеристика групп исследования.....	42
2.2.1. Характеристика группы контроля.....	42
2.2.2. Характеристика группы больных ПЗМЖ.....	44
2.3. Методы исследования	54
2.3.1. Клинические методы исследования	54
2.3.2. Инструментальные методы исследования	54

2.3.3. Иммуногистохимическое исследование	54
2.3.4. Лабораторные методы исследования	55
2.3.4.1. Определение концентрации аминотиолов в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани	55
2.3.4. Молекулярно-генетические исследования	56
2.4. Методы статистической обработки	57
III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	59
3.1. Частота полиморфных генетических маркеров в группах наблюдения.....	59
3.1.1. Сравнительная частота полиморфизма генов белков фолатного цикла (<i>MTHFR-677C>T</i> , <i>MTHFR-1298A>C</i> , <i>MTRR-66A>G</i> , <i>MTR-2756A>G</i>) у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы в Забайкальском крае	59
3.1.2. Полиморфизм генов белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в зависимости от гистологического типа опухоли	65
3.1.3. Полиморфизм генов белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в зависимости от молекулярного подтипа опухоли	69
3.1.4. Прогнозирование возникновения пролиферативных заболеваний молочной железы в зависимости от генетических полиморфизмов.....	73
3.2. Концентрация аминотиолов у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы	75
3.2.1. Концентрация аминотиолов в сыворотке крови у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы	75
3.2.2. Концентрация аминотиолов в опухолевой ткани	

молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы	84
3.2.3. Взаимосвязь концентрации аминотиолов в сыворотке крови и ткани молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы	92
3.3. Носительство генетического полиморфизма и концентрация аминотиолов у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы	94
3.3.1. Взаимосвязь носительства отдельного полиморфизма генов фолатного обмена и концентрации аминотиолов в сыворотке и ткани молочной железы	94
3.3.2. Взаимосвязь комплексного носительства рискованных аллелей генов фолатного обмена и концентрации тиолов в сыворотке и ткани молочной железы	102
3.3.3. Корреляционный анализ генетического индекса и концентрации тиолов в сыворотке и ткани молочной железы	106
IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	111
V. ВЫВОДЫ	136
VI. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	139
VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГГЦ	гипергомоцистеинемия
ДОМЖ	доброкачественные образования молочных желез
ИГХ	иммуногистохимическое исследование
ИДР	инфильтративно-дольковый рак
ИПР	инфильтративно-протоковый рак
КГ	контрольная группа
МЖ	молочная железа
ПЗМЖ	пролиферативные заболевания молочных желез
РМЖ	рак молочной железы
BRCA1	белок восприимчивости к раку груди 1 типа
ER	рецепторы эстрогена альфа
GSH	восстановленный глутатион
HER2	рецептор эпидермального фактора роста 2
IGI	индивидуальный генетический индекс
Ki-67	коэффициент пролиферативной активности
MTHFR	метилентетрагидрофолатредуктаза
MTR	метионинсинтаза
MTRR	редуктаза метионинсинтазы
PR	рецепторы прогестерона
SAH	S-аденозилгомоцистеин
SAM	S-аденозилметионин
SNP	однонуклеотидная замена

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Пролиферативные заболевания молочной железы являются одной из наиболее важных медико-социальных проблем современного общества. Это обусловлено устойчивой тенденцией роста, как доброкачественных заболеваний, которые диагностируются у 25% женщин в возрасте до 30 и у 60% – старше 40 лет [43,47,162], так и рака молочной железы, занимающего второе место по числу летальных исходов у женщин в онкологии [17,72,174]. В России рак молочной железы является ведущей патологией в структуре онкологической заболеваемости и смертности у женского населения, наибольший удельный вес которых составляет 20,9% и 16,2%, соответственно, по данным на 2018 год. Абсолютное число вновь выявленных больных выросло до 70,6 тыс. в 2018 г по сравнению с 52,4 тыс. в 2008 г., причем максимальное число заболеваний приходится на трудоспособную возрастную группу 30-59 лет (16,1%) [3,40].

Сокращение смертности от РМЖ может быть достигнуто с помощью раннего выявления, профилактики и лечения, основанных, по последним данным, на поиске молекулярных предикторов злокачественной трансформации клеток молочной железы [57,98,118]. На сегодняшний день патогенез РМЖ рассматривается как результат многоступенчатых генетических мутаций в системе поддержания стабильности генома эпителиальных клеток молочной железы, которая представлена множеством динамично взаимодействующих белковых комплексов и систем, способных не только распознавать и устранять повреждения ДНК, но и осуществлять эпигенетическую регуляцию экспрессии различных генов, в том числе ответственных за все метаболические события в жизнедеятельности маммоцитов.

Большинство молекулярно-генетических работ [13,26,80,158], посвященных изучению роли одиночных полиморфизмов генов-кандидатов, потенциально

связанных с риском развития РМЖ, не затрагивают участие более распространенных, но низкопенетрантных вариантов, – таких как молекулярно-генетические нарушения в генах, кодирующих ферменты метаболизма фолиевой кислоты, которые через изменение уровня гомоцистеина в клетке, могут вносить определенный вклад в дезорганизацию процессов метилирования, синтеза и репарации ДНК, что увеличивает риск развития опухолевой трансформации клеток [55,95,142].

На сегодняшний день в литературе описаны противоречивые выводы о роли активности метаболизма фолатного обмена в изменении восприимчивости к РМЖ. Согласно одним данным, риск развития пролиферативных заболеваний молочной железы может быть связан с полиморфизмом генов белков фолатного обмена *MTHFR*C677T [137], *MTHFR*A1298C [16], *MTRRA*66G и *MTRR*A2756G [135,165]. В пользу этого предположения также говорят результаты нескольких метаанализов [44,100,115], в которые вошли все англоязычные полнотекстовые публикации с 2002 по 2012 гг., посвященные ассоциации полиморфизма гена *MTHFR* с риском РМЖ. Суммарный объем контрольных и экспериментальных выборок в этих работах составил около 22000 и 16000 человек, соответственно [115]. По другим источникам не наблюдается каких-либо существенных связей между полиморфными вариантами С677Т и А1298С гена *MTHFR* и риском развития РМЖ у итальянских женщин [109] или в популяциях Индии [119]. Но при этом, надежность подобных выводов, возможно, ограничена малым количеством выборки (62 и 588 случаев, соответственно), другими различными характеристиками популяций или наличием дополнительных модифицирующих эффект SNP факторов риска.

Кроме концентрации гомоцистеина, как основного показателя нарушения фолатного обмена клеток, особого внимания заслуживает и содержание его метаболитов (цистеина и глутатиона), которым принадлежит ведущая роль в защите белков клетки от окислительного стресса, занимающего особое значение в развитии и прогрессировании онкопроцесса, в том числе в патогенезе пролиферативных заболеваний молочной железы [74,79,81,125,128,140,168].

Таким образом, молекулярно-генетические и метаболические нарушения фолатного обмена, в ходе которого меняется содержание образующихся аминотиолов, способны выступать в качестве факторов риска развития патоморфологических изменений молочной железы и провоцировать опухолевый рост. В связи с этим изучение механизмов нарушений фолатного обмена, определяющих возникновение повреждений ДНК, при воздействии образующихся эндогенных генотоксических агентов, представляет особое значение и до настоящего времени остается до конца не выясненным. Внедрение в клиническую практику генетического тестирования полиморфизма генов фолатного обмена как метода ранней молекулярной диагностики, позволит идентифицировать случаи предрасположенности к РМЖ с последующей индивидуализацией профилактики и лечения, а, следовательно, снижение смертности от РМЖ.

Цель исследования: установить роль аллельного полиморфизма генов белков фолатного обмена, а также закономерности изменения концентрации аминотиолов в развитии пролиферативных заболеваний молочной железы.

Задачи исследования:

1. Исследовать частоту аллелей и генотипов полиморфизма генов, участвующих в метаболизме фолатов *MTHFR(C677T)*, *MTHFR(A1298C)*, *MTR(A2756G)* и *MTRR(A66G)*, их генотипических и аллельных ассоциаций у женщин с пролиферативными заболеваниями молочной железы.

2. Установить клинико-прогностическое значение носительства изучаемых полиморфных вариантов генов, их ассоциаций для реализации различных морфологических и молекулярных форм пролиферативных заболеваний молочной железы и стадии их развития.

3. Определить концентрацию гомоцистеина, цистеина, глутатиона у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы в сыворотке крови

и опухолевой ткани молочной железы, в том числе с учетом возраста, вида пролиферации и ее морфологии, стадии патологического процесса.

4. Выяснить ассоциацию между носительством генетического полиморфизма *MTHFR*(C677T), *MTHFR*(A1298C), *MTR*(A2756G), *MTRR*(A66G), генотипических и аллельных ассоциаций и концентрацией гомоцистеина, цистеина, глутатиона в сыворотке крови и ткани молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы и в контрольной группе.

5. На основании выявленных генетических, молекулярных и биохимических особенностей оценить предикторы заболевания и разработать концепцию течения пролиферативных процессов в молочной железе.

Научная новизна

Впервые установлено, что аллель *MTR*2756A и генотип *MTHFR*1298AC, в большей степени их комбинация *MTHFR*1298AC x *MTR*2756A, повышают риск развития ДОМЖ (фиброаденомы и локализованной мастопатии), а развитие смешанной, редких форм и люминального В подтипа рака молочной железы имеет ассоциативную связь с носительством аллеля *MTHFR*677T, преимущественно в гомозиготном варианте.

Впервые выявлено, что комплексное носительство генотипов *MTHFR*1298AAx*MTR*2756AG, *MTHFR*677TTx*MTHFR*1298AAx*MTRR*66GG ассоциировано с развитием ДОМЖ, а *MTR*2756AGx*MTRR*66AG, *MTHFR*677CTx*MTHFR*1298AAx*MTR*2756AGx*MTRR*66AG – с развитием РМЖ. В то же время отмечено, что количество рискованных аллелей *MTHFR*(C677T), *MTHFR*(A1298C), *MTR*(A2756G) и *MTRR*(A66G) в геноме не влияет на развитие ПЗМЖ. Разработана многофакторная модель прогнозирования развития ДОМЖ в зависимости от изучаемого полиморфизма генов белков фолатного обмена.

Описаны особенности содержания аминотиолов в сыворотке крови и в опухолевой ткани молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы, в том числе с учетом носительства генетического полиморфизма генов фолатного метаболизма, а также

морфологической и иммуногистохимической верификации опухоли. Показано, что концентрация глутатиона и глутамилцистеина в опухолевой ткани молочной железы зависит от стадии РМЖ. Отмечено, что максимальное повышение концентрации сывороточных тиолов наблюдается в группе с редкими формами рака и HER2neu+ подтипом РМЖ, а в опухолевой ткани МЖ при смешанном гистотипе и базальном типе РМЖ.

Впервые обнаружено, что увеличение содержания глутатиона в крови и снижение гомоцистеина в опухолевой ткани при ДОМЖ зависит от присутствия в геноме *MTRR66G*-аллеля, а увеличение концентрации гомоцистеина как в ткани молочной железы, так и в сыворотке крови при РМЖ связано с носительством *MTR2756G*-аллеля. Носительство выявленных предиктивных генотипических комплексов при пролиферативных заболеваниях молочной железы значительно увеличивает концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови и в опухолевой ткани молочной железы.

Выявлено влияние аддитивного эффекта носительства генетического полиморфизма генов метаболизма фолатов на уровень гомоцистеина, причем повышающее – в сыворотке у больных РМЖ и понижающее – в опухолевой ткани пациенток с ДОМЖ, а также ассоциация между экспрессией иммуногистохимических маркеров (HER2-neu и Ki-67) и уровнем сывороточных аминотиолов, что, несомненно, имеет практическую направленность, которая может быть реализована в прогнозировании течения опухолевого процесса.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования позволяют уточнить некоторые аспекты метаболизма фолатов в патогенезе пролиферативных заболеваний молочной железы, в том числе при различных морфологических и иммуногистохимических вариантах заболевания, выявить влияние носительства генетического полиморфизма ферментов фолатного цикла на степень опухолевой пролиферации и, в связи с этим, прогнозировать развитие заболевания, а также характер

осложнений у категории больных отнесенных в группу высокого риска развития пролиферативных заболеваний молочной железы.

Найдены отличия молекулярно-генетических (предиктивных комбинаций генотипов) и сывороточных маркеров (гомоцистеина, цистеина и глутатиона) у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы относительно контроля, которые позволят предложить новые алгоритмы дифференциальной диагностики и прогноза для больных, в том числе специфичные для различных гистологических и молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы.

Сведения о носительстве SNP генов ферментов фолатного метаболизма могут послужить основой для разработки новых подходов к прогнозированию пролиферативных заболеваний молочной железы у носителей определенных генотипов, и включены в генетический паспорт совместно с другими полиморфизмами, что позволит более эффективно использовать различные методы ранней диагностики онкопатологии молочной железы. На основании полученных данных разработана новая модель индивидуального прогнозирования риска развития доброкачественных образований молочной железы.

Методология и методы исследования

В работе с исследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (WMAD of Helsinki 1964, в редакции, Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Этическая экспертиза диссертационной работы проведена на заседании локального этического комитета от 24 декабря 2014 года (протокол № 69).

Методом сплошной выборки в процесс исследования были включены 182 пациентки с морфологически верифицированными пролиферативными заболеваниями молочной железы. В контрольную группу вошли 142 относительно здоровые женщины. Все обследованные – представители

европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

В данной работе использовались клинические, инструментальные, лабораторные и статистические методы исследования.

Молекулярно-генетическое тестирование и исследование аминотиолов проводились в период с 2014 г. по 2016 г. в лабораториях молекулярной генетики и клинической, экспериментальной биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (ректор – Заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В. Говорин).

Степень достоверности и апробация диссертации

О достоверности результатов свидетельствует достаточно объемный материал исследования (60 больных с доброкачественными образованиями и 122 раком молочной железы, 142 практически здоровых индивидуума), а также использование адекватных методов статистического анализа.

Результаты исследования представлены на: XIII межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию СНО Читинской государственной медицинской академии, (Чита, 2014); V международной (XII итоговая) научно-практической конференции молодых учёных, посвященной 70-летию ЮУГМУ (Челябинск, 2014); Региональной межвузовской научно-практической конференции молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2016); XVIII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» (Владивосток, 2017); VIII международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2019».

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации; 6 тезисов в сборниках международных, российских, краевых научных конференций, конгрессов и съездов.

Внедрение в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах патологической физиологии и онкологии, а также в лечебно-диагностическую работу хирургического отделения опухолей молочной железы ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» г. Чита.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы (19 отечественных и 157 зарубежных источников). Работа иллюстрирована 49 таблицами и 5 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Развитие доброкачественных заболеваний молочной железы (фиброаденомы и локализованной мастопатии) ассоциируется с носительством *MTR2756A*-аллеля, *MTHFR1298AC*-генотипа и *MTHFR1298ACxMTR2756AA*-комплекса, а развитие смешанных, редких форм и люминального В подтипа рака молочной железы ассоциируются с носительством *MTHFR677T*-аллеля, преимущественно в гомозиготном варианте. Риск развития пролиферативных заболеваний молочной железы зависит от присутствия в геноме 2-х компонентных генотипических комплексов полиморфизма фолатов, но не зависит от количества их рискованных аллелей в геноме.

2. В сыворотке крови и в опухолевой ткани у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы, в большей степени злокачественными формами, присутствует значительный тиоловый дисбаланс преимущественно за счет увеличения концентрации гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина, имеющий возрастные и клинико-морфологические особенности.
3. Содержание тиолов в биологических объектах зависит от молекулярно-генетического типа рака молочной железы: наибольшие изменения концентрации в сыворотке крови характерны для HER-2/neu+ подтипа; в опухолевой ткани максимальные изменения наблюдаются при базальном типе рака. С повышением пролиферативной активности опухоли усиливается накопление в сыворотке крови цистеина и снижается гомоцистеина и глутатиона, а при гиперэкспрессии HER-2/neu уровень гомоцистеина и глутатиона повышается.
4. Носительство аллелей полиморфизма генов фолатного обмена (*MTR2756G*, *MTRR66G*), генотипических комплексов (*MTHFR1298AAxMTR2756AG*, *MTR2756AGxMTRR66AG*, *MTHFR677CTxMTHFR1298AAx MTR2756AGxMTRR66AG*, *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTRR66GG*, *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG*), большого количества рискованных аллелей в геноме у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы влияет на концентрацию тиолов как в сыворотке крови, так и в морфологически измененной ткани молочной железы.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физиологическая роль фолатного обмена и метаболизм гомоцистеина

Фолатный цикл – это важное звено первичного метаболизма клетки и основной поставщик одноуглеродных фрагментов для таких жизненно важных клеточных процессов как регенерация метионина, превращение уридинмонофосфата в тимидилат, биосинтез пуриновых нуклеотидов, холина, фосфатидилхолина, адреналина, нейромедиаторов, необходимых для нормального деления клеток, а также метилирование ДНК и РНК, что имеет значительную актуальность не только в плане онтогенеза, но и может влиять на инициацию канцерогенеза [78]. Каскадный процесс контролируется ферментами, которые в качестве коэнзимов используют «фолаты» – производные фолиевой кислоты, которая является сложной молекулой, состоящей из птероидной и одного или нескольких остатков глютаминовой кислоты и не синтезируется в организме. Большинство поступающих с пищей биологически неактивных форм фолиевой кислоты, а также полиглутаматы находящиеся в клетках, преобразуются с помощью ключевого фермента фолатного цикла метилентетрагидрофолатредуктазы - МТНFR [MIM 236250]. Это достигается в ходе восстановления фолатов: 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата, который служит донором метильных групп и основным источником тетрагидрофолата [101], а также является единственным моноглутаматом, попадающим в систему кровообращения и в дальнейшем используется клетками в процессах клеточной репликации и обмене метионина [32,92]. Метионин – как единственная серосодержащая незаменимая аминокислота, является предшественником цистеина и компонентом аминоксил-тРНК-биосинтазы, метаболизма глицина, серина, трианина, гистидина и тирозина, а также селеноаминокислотного и метионинового обмена.

Одной из ключевых реакций фолатного обмена, требующих наличия 5,10-метилентетрагидрофолата и 5-метилтетрагидрофолата, является синтез метионина из гомоцистеина. Уровень последнего строго контролируется в крови, как выведением из организма, так и реметилированием, которое катализирует цитоплазматический фермент метионин-синтаза [МIM 156570] с участием метилкобаламина (производного витамина В₁₂) выступающего в роли промежуточного переносчика метильной группы. При этом происходит окисление кобаламина, и метионин-синтаза переходит в неактивное состояние [77]. Восстановление функции фермента возможно в ходе реакции метилирования при участии метионинсинтазы-редуктазы [МIM 602568], которая относится к группе флавопротеинов, состоит из 698 аминокислот и имеет молекулярную массу 77.7 кДа. После потери метильной группы, активированная форма метионина – S-аденозилметионин, преобразуется в гомоцистеин, а также принимает участие в процессе метилирования ДНК и других молекул (РНК, белков и фосфолипидов) [92].

Гомоцистеин метаболизируется (реметилируется) в печени при участии бетаина в качестве донора метильной группы и фермента бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы [159], а также в почках, где не подвергшийся реметилированию гомоцистеин (около 50% общего количества), конденсируется с аминокислотой серином с образованием цистатионина под воздействием В₆-зависимой цистатион-β-синтетазы. Цистатионин, в свою очередь, гидролизуется ферментом γ-цистатионазой с образованием α-кетомасляной кислоты и цистеина, который в финале превращается в глутатион и включен в антиоксидантную систему [48]. Кофактором в обеих реакциях является пиридоксаль-5-фосфат. Повторное метилирование гомоцистеина в метионин происходит за счет метильных групп поступившего в клетки моноглутамата 5-МТГФ. Таким образом, фолаты обеспечивают постоянное снабжение метильными группами цикла метилирования (рис.1) [92].

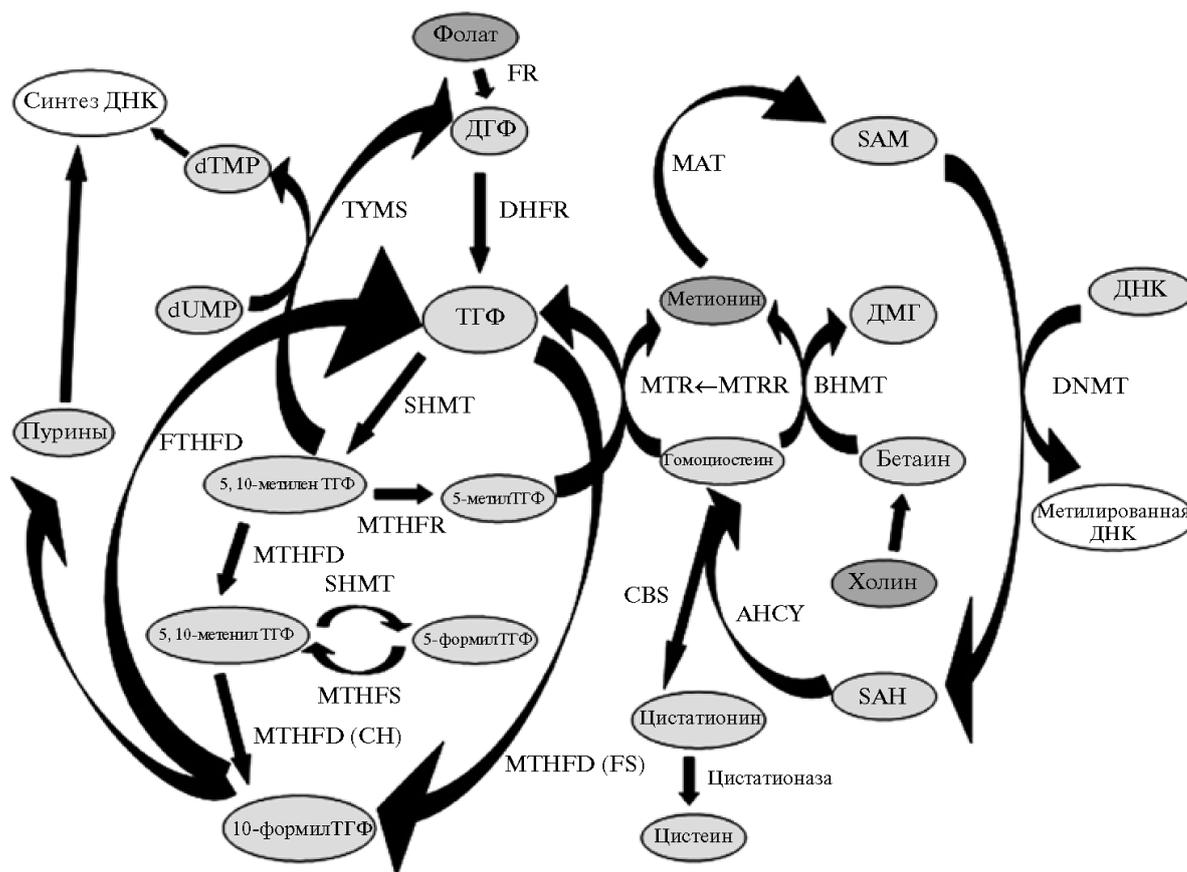


Рисунок 1. Фолатный цикл [из монографии Наумова А.В., 2013, с изменениями] [11,159]

После синтеза гомоцистеин находится в состоянии следования из мест образования к местам метаболизма, так как возможности фолат-зависимого реметилирования истощаются, и тогда он секретируется в кровь с помощью неизвестных транспортных систем, причем для восстановленной и окисленной формы они скорее всего разные. Это необходимо для обеспечения низкого внутриклеточного содержания гомоцистеина, где он находится в восстановленной форме, что составляет 1% от его общего количества, а также для предотвращения накопления аденозилметионина [159]. В понятие «общий гомоцистеин» входят как свободный, так и связанный с белками или окисленный гомоцистеин, обнаруживаемый в плазме крови. После выхода гомоцистеина из клетки в кровь, он окисляется под воздействием кислорода до дисульфидов с различными тиол-

содержащими соединениями, что приводит к накоплению гомоцистеиновой кислоты – продукта его спонтанного окисления [159].

Путь транссульфурации связывает метаболизм метионина с биосинтезом клеточных окислительно-восстановительных молекул, таких как цистеин и глутатион. Цистеин – это серосодержащая аминокислота, одна из основных доноров сульфгидрильных групп в тканях организма, совместно с глутатионом и гомоцистеином известные как аминотиолы. Для ее синтеза необходим атом серы, источником которого служит метионин и аминокислота серин, которая служит источником углеродного скелета [140]. Биологические функции цистеина разнообразны и очень важны для организма. Он поступает в клетки с помощью нескольких высокоактивных АТФ-зависимых переносчиков; особенно много их в клетках печени, кишечника, канальцев почек (поэтому при снижении содержания цистеина эти органы страдают в первую очередь). В цитоплазме клеток из цистеина, глутамата и глицина синтезируется глутатион, причем скорость этого процесса зависит именно от поступления цистеина. Также, он входит в состав структурных белков, ферментов, является предшественником в синтезе таурина и тиозаноламинового фрагмента кофермента А – тем самым участвует в увеличении антиоксидантного потенциала и нейтрализации активных форм кислорода, снижении конечных продуктов гликозилирования белков и резистентности к инсулину [125]. Обычное содержание цистеина в плазме крови, составляющее 166,6-249,9 мкмоль/л, превышает в 20-30 раз уровень химически более активного гомоцистеина, а снижение приводит к дефициту глутатиона [49].

Глутатион – это водорастворимый трипептид и один из самых мощных антиоксидантов, присутствующий во всех тканях, который благодаря наличию реактивной сульфгидрильной группы, участвует в многочисленных защитных реакциях клетки: поддерживает функциональную активность мембран, участвует в механизмах передачи нервных импульсов, синтезе белков и ДНК, модулировании конформационного состояния белковых молекул, регулировании активности ряда ферментов, транспорте аминокислот, а также детоксикации ксенобиотиков [51]. Кроме этого, его адекватные уровни защищают нейтрофилы

и макрофаги, предупреждают индуцированное инфекциями, воспалением неконтролируемое развитие оксидативного стресса, приводящего к нарушению функции органов [76]. В большинстве клеток на долю глутатиона приходится 90% всех тиоловых соединений, где он также, как и другие тиолы, существует в двух основных формах: восстановленной и окисленной, причем внутриклеточное содержание последней, составляет 0,2-1,0% от его восстановленной формы. Уровень общего глутатиона в плазме крови – это сумма восстановленной (1%), окисленной (10-20%) и связанной с белками фракций (70%) [34].

Таким образом, процессы, происходящие в каскадном превращении фолатов, играют важную роль в функционировании ДНК и детоксикации генотоксических веществ, в первую очередь за счет метилирования (ДНК и РНК, гистонов и других белков) - одного из нескольких эпигенетических изменений, которые способствуют регуляции экспрессии генов и поддержанию стабильности генома [99]. Поэтому метилирование признано главным модификатором генома, центральным путем всех метаболических событий в жизнедеятельности организма, чья целостность определяет, в том числе онкологический риск.

1.2. Молекулярно-генетические и негенетические факторы риска гипергомоцистеинемии

Первопричина гипергомоцистеинемии, которая обнаруживается у 2-10% здоровых взрослых людей, до конца неясна [159]. До 2/3 случаев ГГЦ составляет приобретённая, которая возникает на фоне дефицита веществ, задействованных в реакциях биотрансформации гомоцистеина - серина, глицина, холина, бетаина, цистеина, и в особенности фолатов и витаминов группы В (V_{12} , V_6 , V_2). Фолиевая кислота и витамин V_{12} участвуют в регулировании метаболических путей, которые катализируются ферментами МТНFR и МTR, в то время как пиридоксин является кофактором для цистатион-синтетазы. Витамин V_{12} контролирует всего 2 реакции, и обе непосредственно относятся к метаболизму гомоцистеина [36,66]. Концентрация плазменного гомоцистеина обратно пропорциональна содержанию фолиевой кислоты, витамина V_6 и V_{12} [66], но при этом, их оптимальный уровень

в плазме крови не является гарантией полноценного участия в реакциях биотрансформации гомоцистеина. Исследование L.K. Fezeu и соавт. продемонстрировало уверенное снижение ГГЦ у пациентов без исходного дефицита данных витаминов [120]. Более того, изолированная «нагрузка» организма фолиевой кислотой сопровождается истощением содержания витаминов В₆ и В₁₂ [64].

Так, на основе данных литературы, дефицит любого из витаминов группы «В» может привести к ГГЦ, поскольку они играют важную роль в метаболизме гомоцистеина [66]. Однако накопление гомоцистеина в крови может быть следствием и нарушения его выведения, например, при заболеваниях почек [84]. Особенно это важно для лиц пожилого и старческого возраста, где повышение уровня гомоцистеина встречается довольно часто (от 3 до 15 %), на фоне общего замедления метаболизма, атрофии слизистой оболочки желудка и других возрастных особенностей [159].

Одним из мощных факторов, способствующих повышению уровня гомоцистеина в крови, является потребление больших количеств кофе. Это связано с тем, что кофеин является мощным антагонистом витамина В₆ и угнетает работу MTRR [90]. Алкоголизм, курение, гипотиреоз, псориаз, лейкоз и сахарный диабет – столь же очевидный путь к дефициту фолатов и гипергомоцистеинемии [81,135].

Следует отметить, что уровень гомоцистеина может зависеть от приема целого ряда лекарств. Механизм их действия связан с влиянием на активность коферментов и продукцию гомоцистеина, функцию почек и уровень гормонов. Особенное значение имеют метотрексат (антагонист фолиевой кислоты), противосудорожные препараты (опустошают запасы фолиевой кислоты в печени), закись азота (инактивирует витамин В₁₂), метформин и антагонисты Н₂-рецепторов (нарушают всасывание витамина В₁₂), эуфиллин (подавляет активность витамина В₆) [159]. При этом важно учитывать, что избыточный прием синтетической фолиевой кислоты, в составе препаратов, блокирует

эффекты активных эндогенных фолатов и вызывает или ещё больше усугубляет функциональный фолатный дефицит [67].

Модулирующим гомоцистеинемии фактором, помимо эссенциальных, являются генетически детерминируемые причины, обуславливающие дефект ферментов метаболизма гомоцистеина. Так среди наиболее изученных наследственных причин ГГЦ – прежде всего, это полиморфизм гена фермента *MTHFR*, носительницей мутаций которого является каждая вторая женщина в России [10,15]. Ген *MTHFR* локализуется на коротком плече хромосомы 1 (1p36.3) и состоит из 11 экзонов, а длина всего кодирующего региона составляет около 1980 пар нуклеотидов [175]. Вследствие генетического полиморфизма, функция фермента *MTHFR*, катализирующего превращение N⁵,10-метилен-ТНФ в донора метильной группировки – N⁵-метил-ТНФ, снижается, что ведет к резкому снижению поступления в кровь активных фолатов и образования их в клетках. Это приводит к повышению уровня гомоцистеина в крови, поскольку метильной группы 5-МТГФ не хватает для достаточного реметилирования гомоцистеина в метионин [150], а это в свою очередь к активации онкогенов и повышенной чувствительности к факторам, повреждающим структуру ДНК (как следствие недостатка метионина) [131].

Существует вариант гена *MTHFR* в экзоне 4, в котором цитозин в положении 677 заменен на тимин (полиморфизм С677Т), в результате чего аминокислота аланин замещается валином. При этом в условиях *in vitro* активность фермента *MTHFR* в случае генотипа *MTHFR*677СТ снижена на 35%, а 677ТТ на 75% по сравнению с аллелем “дикого типа” *MTHFR*677СС, что ассоциировано с повышением сывороточного уровня гомоцистеина [101] и это становится особенно заметным при низком содержании В₉ в крови [120]. Частота мутантного аллеля 677Т значительно изменяется: от 0,02 у индонезийцев до 0,55 у испанцев [101], а в России в среднем составляет 0,29-0,32 среди москвичей и лиц, проживающих в Сибири, по данным отечественной литературы, где изучалась лишь отдельными некрупными исследованиями (выборки от 50 до 600 человек) [31]. Среди европейцев с полиморфизмом гена *MTHFR*(С677Т) – 12 % составляют

гомозиготы (ТТ), 43% – гетерозиготы (СТ), а 45% – аллели “дикого типа” (СС) [101].

Другой нуклеотидной заменой в гене *MTHFR*, глутамина на аланин в регуляторном домене фермента, является А1298С в 7 экзоне [109], снижающая его активность в меньшей степени (на 40-50% [145]), чем замена С677Т, что сравнимо с совместным носительством по двум аллелям 677Т и 1298С гена *MTHFR*, сопровождаемое снижением активности фермента также на 40-50%, а также повышением концентрации гомоцистеина в плазме и снижением уровня фолата, как при гомозиготном носительстве аллеля 677Т [121]. Исходя из этого, гомозиготность для полиморфизмов С677Т и А1298С гена *MTHFR*, является наиболее распространённой причиной ГГЦ, которая присутствует от 10-16% и 4-6%, соответственно, у всех европейцев и до 25% у некоторых групп населения [127].

Ген *MTR*, локализуется в теломерном районе первой хромосомы (1q34), состоит из 12 экзонов и кодирует белок, состоящий из 1265 аминокислот. На данный момент известно 392 SNP этого гена по данным базы NCBI и наиболее распространённый из них это – *MTRA2756G*, который ведёт к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты на глицин в положении 919, что приводит к нарушению пространственной структуры белка и его функции [52]. А это в свою очередь к повышению внутриклеточного уровня гомоцистеина, понижению уровня SAM и гипометилированию ДНК [99]. Частота генотипа GG полиморфного локуса А2756G в японской, китайской и корейской популяциях, как и в большинстве европейских групп, составляет 2-3%, для северо- и афроамериканской групп – 5-6%, а для групп белого населения Канады и Гавайев – 10-11% [44,109].

Полиморфизм А66G гена *MTRR* локализованного на хромосоме 5 в локусе 5p15.3-p.15.2. – это точковая замена аденина на гуанин в позиции 66, приводящая к замене аминокислотного остатка изолейцин на метионин (Ile22Met), которая в 4 раза снижает активность фермента *MTRR* и является наиболее распространённой в популяции. Так, частота гетерозиготных носителей аллеля *MTRR66G*,

ассоциированного с гипергомоцистеинемией, составляет около 45-50%, а гомозиготных ~ 25% [29].

Таким образом, дефицит фолатов и нарушение функции метаболизирующих гомоцистеин-ферментов, являются значимыми факторами риска увеличения гомоцистеина в клетках и его общего уровня в плазме, что играет важное значение в реализации его генотоксического действия. При этом данные литературы указывают на наличие популяционных особенностей частот полиморфных вариантов генов фолатного цикла. Однако кроме генетических нарушений рассматриваемые гены могут подвергаться и эпигенетическим, а именно аномальному метилированию, которое также может являться одной из причин развития пролиферативных процессов молочной железы.

1.3. Заболевания, ассоциированные с нарушениями фолатного обмена

1.3.1. Гипергомоцистеинемия и соматическая патология

На сегодняшний день ассоциация гипергомоцистеинемии показана с развитием многих патологических состояний, таких как, арахнодактилия, смещение хрусталика [68], анемия, тромбофилия и тромбоз [21], депрессия и умственная отсталость [84], когнитивные расстройства у лиц пожилого возраста [124], аутизм, эпилепсия, шизофрения [59], врожденные пороки развития [66], сахарный диабет [86], судороги [12], повреждение клеток мозжечка [138], дефект нервной трубки, синдром Дауна [78,90], а также нейродегенеративные [73], аутоиммунные и аллергические заболевания [112,169].

Отдельно стоит отметить связь ГГЦ с таким наиболее распространенным заболеванием, как атеросклероз, который как никакие другие, важно диагностировать на начальной стадии. Как было показано в ряде крупномасштабных исследований [56,131], вероятность развития ишемической болезни сердца [164] прямо пропорциональна концентрации сывороточного гомоцистеина (свыше 10 мкмоль/л). Так, например, повышение уровня гомоцистеина в крови всего на 5 мкмоль/л увеличивает риск атеросклеротического поражения сосудов на 80%, острого инфаркта и инсульта –

на 50%. Наряду с этим изменяется и показатель смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [56].

Более того, тот или иной уровень гомоцистеина связан с определенной патологией: так, легкая ГГЦ (от 10 до 30 мкмоль/л) характерна для умеренной почечной недостаточности, выявляется после трансплантации печени, недостатке тиреоидных гормонов, алкоголизме, сахарном диабете, а также устойчиво ассоциируется, с развитием ишемического инсульта [144] и приводит к двукратному увеличению риска возникновения болезни Альцгеймера у людей старше 60 лет [172]. Средняя степень ГГЦ (от 30 до 100 мкмоль/л) связана с наличием более тяжёлого нарушения функции почек и уменьшением клиренса гомоцистеина, а также с серьёзным алиментарным дефицитом фолатов. Тяжёлая ГГЦ (свыше 100 мкмоль/л) является проявлением наследственной гомоцистеинурии, а также наследственных нарушений утилизации витамина В₁₂ и его серьёзного алиментарного дефицита [159].

В основе цитотоксического действия повышенного уровня гомоцистеина лежат многочисленные механизмы, такие как, дисфункция эндотелия, повышение уровня апоптоза и дозозависимое ускорение старения эндотелиоцитов [105], активация металлопротеиназ с повышением предрасположенности к разрыву атеросклеротической бляшки и тромбозу [56], сверхстимуляция NMDA-рецепторов глутамата (N-метил-D-аспартат) [73], повреждение ДНК [90], нейротоксическое действие [159], изменение деятельности иммунной системы, которая через реакции метилирования распознаёт и подавляет экспрессию чужеродных генов, а также образование модифицированных гомоцистеинилированных белков с аутоантигенными свойствами [90]. Помимо этого, полностью подтверждено положение о прокоагулянтном и проагрегантном потенциале избыточных количеств гомоцистеина [15,159] (рис. 2).

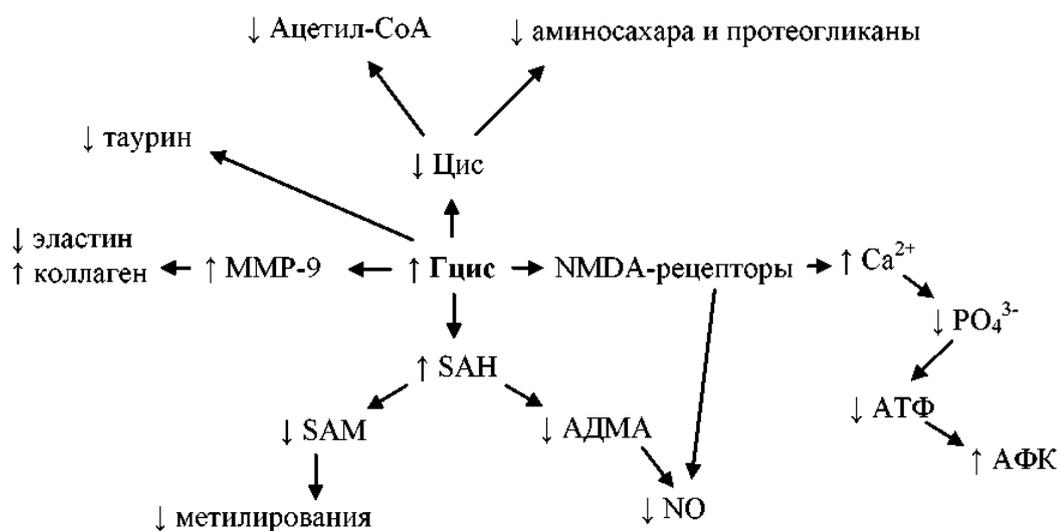


Рисунок 2. Общие цитотоксические эффекты гомоцистеина
(Perla-Kaján J., 2019 [131])

Таким образом, по данным современной литературы, ГГЦ может рассматриваться как достоверный фактор риска инсульта и болезни сосудов головного мозга, как прогностический маркёр развития атероматоза, как независимый фактор риска тромбоваскулярной болезни [81], инфарктов и других заболеваний [90]. Однако, ее роль в отношении доброкачественных или злокачественных пролиферативных заболеваний, в том числе молочной железы, остается недостаточно изученной. В частности, нет ответа на главный вопрос: ГГЦ – это причина или следствие данной патологии? А также не ясны основные механизмы взаимодействия и точки приложения у гомоцистеина и процессов трансформации, так как, непосредственного генотоксического действия он не оказывает, но это ничуть не умаляет его значимости.

1.3.2. Нарушения метаболизма гомоцистеина и канцерогенез

Дефицит фолатов и полиморфизм генов фолатного цикла приводят к снижению каталитической активности метаболизирующих гомоцистеин ферментов (MTHFR, MTR, MTRR), что оказывает существенное влияние на

интенсивность метаболизма фолиевой кислоты с развитием гипергомоцистеинемии. Это обуславливает нарушение статуса метилирования ДНК – модификацию молекулы ДНК без изменения первичной нуклеотидной последовательности, которая происходит в «СрG-островках», расположенных в регуляторных областях генов, что в свою очередь влияет на функционирование клеточного генома, регуляцию онтогенеза, структурную стабильность ДНК [99]. И, как первопричина данных нарушений, может лежать в основе канцерогенеза [159] (рис. 3), в том числе рака молочной железы, как показано в работе А. Kuchiba и соавт. [96], а также в ряде других исследований [135,137], где наблюдался более высокий уровень плазменного гомоцистеина, как у женщин в пременопаузальном периоде, так и после менопаузы [162].



Рисунок 3. Метилирование ДНК (Škovierová H., 2016, [159])

Данные нарушения метаболизма фолатов влияют на стабильность ДНК двумя способами. Первый относится к синтезу нуклеотидов *de novo*, когда низкий уровень 5,10-метилентетрагидрофолата – кофактора тимидилат-синтазы, приводит к подавлению синтеза тимидилата. Как следствие, повышается вероятность ошибочной встройки дезоксиуридинмонофосфата при синтезе ДНК, устранение которой, с помощью ДНК-гликозилазы, может приводить к одно- и двуцепочечным разрывам. К тому же несбалансированный нуклеотидный пул нарушает процессы репарации, приводя к повреждению ДНК [171].

Второй способ относится к недостаточной продукции S-аденозилметионина, уровень которого в клетке приводит к снижению метилирования ДНК, что вызывает нарушение хромосомной сегрегации и аномальную генную экспрессию [107,131]. Это может привести к потере защиты от вредных рецессивных мутаций и, возможно, к глобальному снижению активности генома, так как метилирование ДНК определяет взаимодействие между ДНК и белками, распознающими модифицированные основания, регулирует генную экспрессию через механизм компактизации-декомпактизации хроматина, являясь основным модификатором генома [33]. Гипометилирование промоторных регионов генов-супрессоров опухолей (также как гиперметилирование промоторных регионов проонкогенов) может вызывать селективный рост и трансформацию клеток [151], т. е. через клональную альтерацию гена – к канцерогенезу. Полное деметилирование ДНК является одним из наиболее характерных признаков опухолевой клетки и может привести к хромосомной нестабильности. Кроме того, снижение степени метилирования объясняет возрастание частоты рака с возрастом, а также снижает Т-клеточную противораковую резистентность [99].

Превращение гомоцистеина в организме приводит к образованию комплекса биологически активных молекул (цистеин, глутатион, таурин, α -кетобутират, эндогенный сероводород и др.), которые могут принимать участие в развитии окислительного стресса и тонко реагируют на изменение метаболического статуса организма, определяют окислительно-восстановительную систему крови и уровень свободных радикалов [90,170].

Гомоцистеин может влиять на регуляцию активности многих генов, среди которых есть выполняющие провоспалительные и проапоптозные функции [117]. Это обусловлено его трансформацией в гомоцистеин-содержащие дисульфиды, гомоцистеиновую кислоту, S-нитрозо-гомоцистеин и гомоцистеин-тиолактон, которые интегрируются в структуру белков посредством реакции с ϵ -аминогруппой лизина, снижая их функции, что запускает аутоиммунные реакции,

стресс эндоплазматического ретикула и активацию провоспалительных цитокинов (NF- κ B, IL-8, IL-6, IL-1b), а также оксидативный стресс [159] (рис. 4).

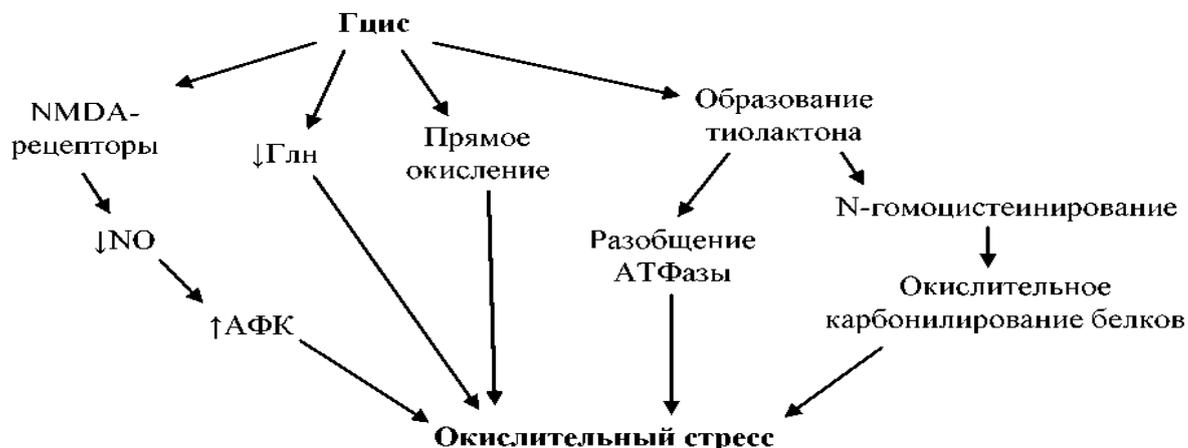


Рисунок 4. Гомоцистеин и окислительный стресс (Rahal A. et al, 2014, [129])

Гипергомоцистеинемия сопровождается не только развитием окислительного стресса, но и истощением антиоксидантных систем, в том числе глутатиона, что ведет к избыточному накоплению свободных радикалов, приводящее к повреждению нуклеиновых кислот, индукции хромосомных aberrаций, нарушениям регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, играющих важную роль в злокачественной трансформации клеток и опухолевой прогрессии [53]. Важно отметить, что при этом происходит быстрое снижение уровня восстановленного и увеличение содержания окисленного глутатиона, а их соотношение является ключевым фактором для сигнальной системы транслокации фактора транскрипции NF- κ B, который регулирует синтез провоспалительных цитокинов и молекул адгезии, что может выступать как провоспалительный фактор [87].

Таким образом, дефицит глутатиона свидетельствует о напряжении антиоксидантной защиты, выступая в качестве наиболее раннего показателя усиления окислительных процессов в клетках и способствуя прогрессированию заболевания [74,141]. Однако роль глутатиона в отношении канцерогенеза недостаточно изучена и может носить двойственный характер: как защитный, при участии в устранении и детоксикации канцерогенов, в биосинтезе тимидиловых

нуклеотидов входящих в ДНК [48,74], так и патогенный, когда повышенный уровень глутатиона, возможно, способен защищать опухолевые клетки и придать им устойчивость к ряду препаратов химиотерапии.

Изменение редокс-статуса организма приводит к окислительной модификации макромолекул, среди которых наиболее чувствительными к действию большинства активных форм кислорода являются тиоловые группы белков, в том числе участвующие в клеточном делении, в передаче генетической информации, рецепторные и другие сигнальные белки. Основываясь на этом, можно предположить, что работа тиолдисульфидной системы (особенно глутатион-зависимой) служит для защиты генетического материала в клетке, и находится в теснейших взаимосвязях с общим редокс-состоянием организма.

Несомненная роль процессов перекисного окисления липидов при злокачественных новообразованиях подтверждена многочисленными исследованиями [48,128,166]. При этом, имеющиеся в литературе сведения о состоянии системы ПОЛ у больных раком молочной железы показывают противоречивый характер: как усиление процессов ПОЛ [125], так и отсутствие их статистически значимых изменений [167] или даже снижение [128]. Кроме того, показано, что при РМЖ увеличение процессов свободнорадикального окисления находится в прямой зависимости от стадии заболевания [48].

Таким образом, нарушения в метаболических процессах, возникающие при изменении уровня аминотиолов и окислительном стрессе, являются не только одной из основных причин эндогенной интоксикации у онкологических больных, но и могут лежать в основе канцерогенеза [90]. Поэтому нарушения фолатного обмена с гипергомоцистеинемией могут быть рассмотрены в качестве одного из главных и независимых триггерных факторов активации опухолевого роста [159].

1.3.3. Рак молочной железы: эпидемиология, этиология и патогенез

По данным международного агентства по исследованию рака (IARC) от 2018 РМЖ является наиболее часто диагностируемым раком, составляя 24,2% (примерно 1 из 4) всех новых случаев, а также основной причиной смерти от рака

(15% всех случаев) у женщин во всем мире. Заболеваемость этой патологией постоянно возрастает и молодеет (доля женщин с РМЖ в возрасте до 45 лет составляет 25%, а в возрасте 20-34 лет - 12%) [3]. Актуальна эта проблема и для Забайкальского края, где рак молочной железы также является ведущей локализацией среди злокачественных опухолей у женщин с уровнем заболеваемости 51,93 на 100 тыс. населения 2017 г. (сравним с 51,95 по РФ) [3].

Рак молочной железы является мультифакториальным заболеванием, развитие которого связано как с влиянием окружающей среды, так и с индивидуальными особенностями генома – генетической предрасположенностью, при этом на долю спорадических случаев приходится 75%, а наследственные формы составляют 5-10% с известными и 15-20% с неопределенными генетическими факторами [80]. Точные биологические процессы, которые возникают в молочной железе и затем индуцируют канцерогенез, пока неизвестны [106], но риск развития РМЖ непосредственно зависит от выраженности пролиферации эпителиоцитов протоков и/или долек молочной железы [47].

Нормальный рост и развитие молочной железы регулируются сложным взаимодействием многих гормонов и факторов роста, при этом ее клетки сами секретируют некоторые из них и, таким образом, выполняют аутокринные функции. Кроме того, малигнизированные клетки молочной железы экспрессируют рецепторы многих полипептидных факторов и гормонов [147]. Поэтому, из негенетических факторов РМЖ особое внимание уделяется пролиферативному эффекту эстрогенов на эпителий молочной железы и их метаболитам, которые могут напрямую вызывать повреждения ДНК [39], увеличивая число спонтанных ошибок в результате репликации ДНК, а также роли экзогенных эндокринных дизрупторов [154]. Особенно это важно, с учетом гипотезы о гипергомоцистеинемии как факторе риска эстроген-индуцированного онкогенеза [154]. А именно: высокое содержание гомоцистеина оказывает патогенное действие, главным образом, через метаболическое накопление внутриклеточного S-аденозилгомоцистеина, сильного неконкурентного ингибитора СОМТ-опосредованного метаболизма метилирования эндогенных и

экзогенных катехинов [149]. Также, существуют данные о том, что пролактин может замедлять процессы пролиферации и апоптоза, а также влиять на дифференцировку клеток в процессе маммогенеза и стимулировать синтез рецепторов к эстрадиолу в ткани МЖ [147].

Значительная часть случаев РМЖ считается эстрогенозависимой [147]. Однако с наступлением менопаузы уровень эстрогенов снижается, а частота опухолей продолжает расти. Данное противоречие, отчасти, может быть объяснено не менее важной ролью, в механизмах онкогенной трансформации клеток различной морфофункциональной организации, а также стадий промоции и опухолевой прогрессии, ведущих факторов канцерогенеза – воспаления [46] и свободных радикалов, образующихся, в том числе с участием метаболитов классических эстрогенов [154].

Отдельные исследования указывают на связь между травмами молочной железы, нарушениями ночного сна, особенно в постменопаузе и риском развития РМЖ [67,146]. Роль канцерогенов окружающей среды и систем ферментов их метаболизирующих, также как диетических добавок, психологического стресса и вирусной этиологии не удалось убедительно связать с провокацией рака молочной железы в отличие от других опухолей [54].

Промежуточное положение занимает независимый фактор риска развития РМЖ – маммографическая плотность (соотношение эпителиально-стромального компонента и жира), находящийся, с одной стороны, в зависимости от таких факторов, как – возраст, число родов, уровень в крови пролактина, эстрогенов, тестостерона, а с другой стороны, под влиянием генетического компонента. Причем, доля последнего в определении величины маммографической плотности достигает, по некоторым данным, более 60% [126]. В многочисленных исследованиях продемонстрировано, что повышение маммографической плотности связано с увеличением риска развития РМЖ в 3-6 раз [103,126], что заметно выше, чем весомость других факторов риска (возраст женщины при наступлении менархе и менопаузы, масса тела, наличие сахарного диабета) [63].

Следующая группа факторов, предрасполагающих к РМЖ – это факторы, опосредующие дефицит средств поддержания геномной стабильности. Так, к настоящему моменту с помощью полногеномного секвенирования удалось выявить чуть более 120 специфических для РМЖ раковых генов-кандидатов [58]. Среди них особенно выделяют редкие высокопенетрантные герминальные мутации *BRCA1/2* отвечающие за 20% всех семейных случаев заболевания РМЖ. Причем выделяют опухоли «*BRCAness*» фенотипа, т.е. с нарушением гомологичной рекомбинации без мутаций в генах репарации ДНК *BRCA1/2*.

Однако, основная масса РМЖ имеет причиной более распространенные низко- и среднепенетрантные аллели предрасположенности и их комбинации – SNPs, и не связана с наследованием зародышевых мутаций [58]. Все эти гены, так или иначе, контролируют важнейшие клеточные функции, вовлеченные в неопластический процесс: регуляцию клеточного цикла, транскрипцию и ремоделирование хроматина, пролиферацию, репарацию повреждений ДНК, апоптоз, трансформацию цитоскелета, метаболизм эстрогенов, клеточную адгезию и другие механизмы поддержания генетического гомеостаза [106].

Относительно спорадических опухолей молочной железы эпидемиологические данные также указывают на несомненное существование генетического компонента в их патогенезе и в среднем, в каждой опухоли удается насчитать около дюжины соматических драйвер-мутаций. Существуют доказательства, которые демонстрируют связь между риском развития рака молочной железы и конститутивной хромосомальной нестабильностью [132], которая выражается в аномальном количестве крупных хромосомных перестроек и является маркером генома опухолевой клетки РМЖ. Микросателлитная нестабильность (состояние особой склонности ДНК клетки к развитию мутаций), практически не встречается в РМЖ в отличие, например, от рака прямой кишки или легкого, однако его обнаруживают в небольшой группе билатеральных опухолей.

Таким образом, взаимодействие между разными предрасполагающими факторами приводит к аккумуляции в эпителиальных клетках молочной железы

соматических мутаций. Различные комбинации активирующих и инактивирующих мутаций, в том числе в системе метаболизма фолатов и связанные с этим эпигенетические события являются причиной геномной нестабильности и совокупности свойств раковых клеток, которые были определены как “Характерные признаки рака” [104]. К ним относят: повышение ростовых и невосприимчивость к антиростовым факторам, блокирование апоптоза, безлимитный потенциал деления, способность к инвазии и метастазированию, непрерывный ангиогенез.

1.3.4. Доброкачественные образования молочных желез: эпидемиология, этиология и патогенез

Среди доброкачественных образований молочных желез выделяют фиброаденому, кисты, липому, цистаденому, локализованный фиброаденоматоз и другие формы, среди которых многие существенно повышают риск РМЖ [42]. Точный статистический учет ДОМЖ не ведется, что связано с отсутствием однозначной классификации, поскольку механизмы, лежащие в их развитии, остаются неясными, но, по оценкам ряда авторов частота данных заболеваний в женской популяции составляет 60-80% [14].

Этиология и патогенез ДОМЖ до настоящего времени остается предметом дискуссии, но общепризнанной является точка зрения о решающей роли прогестерондефицитных состояний и гиперэстрогемии [156]. В это вносит весомый вклад различная гинекологическая патология (эндометриоз, миома матки, гиперпластические процессы эндометрия), зачастую сочетающаяся с дисгормональной дисплазией молочных желез [23]. Также неблагоприятно отразились на состоянии молочных желез современные особенности репродуктивного поведения и психогенные факторы [106,146].

Среди пролиферативных доброкачественных заболеваний молочной железы наибольшую вероятность развития злокачественных новообразований, связывают с мастопатией с атипической пролиферацией эпителия и фиброаденомой, которая диагностируется у 10% женского населения (более чем у 6 млн. россиянок) и

дебютирует чаще в период репродуктивной активности. Среди фиброаденом лишь 3% всех случаев подвергаются злокачественной трансформации, и особенно листовидная форма (до 5%), являющаяся «промежуточным звеном» между фиброаденомой и саркомой, по мнению некоторых авторов [6].

Наряду с доказательствами генетической предрасположенности к РМЖ, которая на первом этапе, возможно, выражается доброкачественными изменениями молочной железы [70,161], установлено, что риск развития пролиферативных процессов молочной железы, как доброкачественных, так и злокачественных, в большинстве случаев связан с диссоциацией процессов пролиферации и апоптоза [157], находящихся под строгим генетическим контролем. В свою очередь, активность генов ответственных за клеточное деление, зависит от многих факторов, одним из которых является статус метилирования - основной механизм эпигенетической регуляции экспрессии генов. Изучаемые нами полиморфизмы генов фолатного обмена способны опосредованно влиять на уровень метилирования, а значит и на регуляцию клеточного деления, что делает их перспективными кандидатами на роль факторов, влияющих на процесс опухолеобразования.

Также, о вероятной роли полиморфизма генов фолатного метаболизма, в процессе неопластической трансформации, может свидетельствовать наличие в ткани молочной железы органоспецифичного эпигеномного профиля, который напрямую зависит от состояния метаболизма фолатов и полиморфизма соответствующих генов. Кроме этого, для молочной железы известны характерные генетические повреждения на хромосомном и молекулярном уровнях, причем, как для доброкачественных, так и злокачественных типов опухоли данной локализации, по данным исследований X. Liu [61] и D.N. Danforth [50]. Это также говорит в пользу гипотезы единых патоморфологических и молекулярно-генетических механизмов для пролиферативных заболеваний молочной железы, в целом.

На сегодняшний день у больных РМЖ известно в среднем 11 первичных мутаций (драйвер-мутаций), способных обеспечить возможность развития

опухолевого процесса и 100 сопутствующих (passengers), которые появляются на более поздних стадиях развития новообразования [37]. Однако, нет ни одного исследования в доступной литературе, указывающего на принадлежность к той или иной группе мутаций генов фолатного обмена.

Частота встречаемости полиморфизма генов фолатного обмена в популяции достаточно высока (40-60%) и сравнима с распространенностью доброкачественных заболеваний молочной железы, в том числе предраковых. Согласно последним данным [41,42], что мутации в ранних предраковых клетках молочной железы могут длительно существовать в клетках и предшествовать возникновению РМЖ, что подтверждается появлением некоторых мутаций в клетках задолго до выявления симптомов самого заболевания [37]. Таким образом, практически вся «злокачественность» может возникнуть уже при формировании предракового состояния. Однако не все пролиферативные заболевания являются предраковыми, что наталкивает на мысль о наличии также у данных мутаций модифицирующего действия для последующих нарушений генома.

Таким образом, существование наследственной предрасположенности и схожесть генетических вариаций, наблюдаемые при доброкачественных заболеваниях и раке молочной железы, подтверждают, что гиперплазия ткани представляет собой первую ступень в патогенезе рака данной локализации, но на сегодняшний день анализ и объяснение этой связи затруднены. При этом важно учитывать, что генетические изменения могут иметь место и без четких клинических признаков, предшествующих злокачественным. Понимание молекулярных механизмов контроля пролиферации, апоптоза и клеточного метаболизма в клетках при пролиферативных заболеваниях молочной железы, находящихся под влиянием метилирования вследствие нарушений генов фолатного метаболизма, может способствовать более дифференцированному рассмотрению механизмов малигнизации, так как в ее формировании участвуют как гиперпластические, так и неопластические процессы [94]. Основываясь на количестве мутаций, участвующих в развитии РМЖ, можно предположить о его

многостадийности. С учетом того, что одни и те же морфологические изменения молочной железы характеризуются разной степенью опасности перехода в злокачественные заболевания, то определение сывороточных аминотиолов у больных с различными гистологическими вариантами РМЖ, можно использовать не только для дополнительной оценки степени злокачественности опухолевого процесса, но и для выявления лиц высокого онкологического риска.

1.4. Генетический полиморфизм генов белков фолатного метаболизма в патогенезе пролиферативных заболеваний

Согласно данным литературы, генетические варианты полиморфных маркеров фолатного метаболизма ассоциированы с развитием различных форм злокачественных опухолей, таких как, онкогематологических [163], колоректального [35], простаты [24], шейки матки [155], гепатоцеллюлярной карциномы [151]. Так, например, носительство аллеля *MTHFR677T* ассоциировано с повышенным риском множественной миеломы [102] и рака пищевода [143]. Полиморфизм *MTRRA66G* связан со значительным увеличением общего риска заболевания раком, по данным метаанализа Ping Wang с соавт. [29].

Данные мутации также ассоциированы с повышенным риском развития рака молочной железы [30], особенно у женщин в период после менопаузы и с низким диетическим потреблением фолиевой кислоты [45], а также у больных с двусторонним или первично-множественным РМЖ (с раком яичников) [32]. Кроме того, отмечено, что изучаемые мутации, например, аллели *MTR2756G* и *MTHFR677T*, могут существенно ухудшать прогноз заболевания (РМЖ) у носителей мутаций генов *BRCA* («генов рака молочной железы») [80], что подтверждает гипотезу о том, что дефект в метаболизме метионина может быть связан с риском *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы.

Однако много исследований с противоречивыми данными. Так, несколько независимых исследований показали, что носительство мутантного аллеля *MTHFR677T* может снизить риск рака толстой кишки [111] и острого лимфобластного лейкоза [113], в противоположность по отношению к развитию

цервикальной интраэпителиальной неоплазии [97] и рака эндометрия [114]. При этом у данных гомозигот (*MTHFR677T*) была более высокая степень гипометилирования геномной ДНК, чем у гомозигот дикого типа [110]. Схожие данные получены в отношении других полиморфизмов белков фолатного цикла, где риск развития рака толстой кишки повышался у гомозиготных носителей полиморфного аллеля *MTHFR1298C* [111], *MTR2756G* или *MTRR66G* [52], что противоречит другим данным [27,130]. Кроме того, была показана ассоциация аллеля *MTR2756G* со сниженным количеством гиперметилированных промоторов генов-супрессоров опухолей, что может объяснять его протективный эффект [136].

Кроме независимых, выделяют и комбинированные эффекты генетической изменчивости и метаболизма фолиевой кислоты, где адекватное потребление фолиевой кислоты, метионина, рибофлавина и витамина В₆ может предотвратить aberrантное метилирование ДНК и тем самым защитить от рака [165]. Так, в развитии колоректального рака важно отметить участие такого дополнительного провоцирующего фактора, как дефицит фолатов в пище [148]. Это доказывает связь алиментарного и генных факторов на развитие высокого риска предраковых состояний и рака колоректальной области, у лиц, являющихся носителями аллеля *MTHFR677T* в гомо- или гетерозиготной форме в сочетании с низким уровнем фолата [22]. Сходные данные получены у больных раком желудка и толстого кишечника, но последние злоупотребляли алкоголем [35]. Однако некоторые исследователи считают, что аллель *MTHFR677T* носит протективный характер в случае колоректального рака и более того, повышает эффективность химиотерапии [111]. Подобное исследование среди больных раком молочной железы показало высокий риск развития побочных эффектов на фоне химиотерапии у лиц с генотипом *MTHFR677TT* [88]. Исследования другого аллеля 1298С гена *MTHFR*, также показали, увеличение риска развития онкологических заболеваний на фоне фолатного дефицита [36].

Адекватное содержание фолиевой кислоты и других кофакторов в диете (независимый фактор), обладающих протективным эффектом по отношению к

инициации злокачественной трансформации (через влияние на регуляцию метилирования ДНК и снижение уровня гомоцистеина), может предотвратить некоторые формы рака [36]. Однако стоит отметить двунаправленность такой связи между их содержанием в крови и риском развития онкологических заболеваний, который, например, в случае с фолиевой кислотой повышается не только при дефиците, но и при передозировке ее синтетическим аналогом [139]. В частности, есть данные о повышении риска развития РМЖ при применении высоких доз витамина В₉ [67]. Возможно, такие результаты указывают на преимущественное влияние в развитии неоплазий эпигенетических изменений генов вследствие мутаций в системе метаболизма фолатов, или наличие иных малоизученных факторов, отражающихся на работе фолатного цикла.

Таким образом, полиморфизмы генов фолатного цикла могут выступать как потенциальные факторы риска развития неопластических процессов, связанных со снижением метилирования ДНК, что является одним из наиболее характерных признаков опухолевой клетки. Однако в результатах исследований необходимо учитывать, как влияние внешних факторов, например, уровень фолатов, который мог бы компенсировать негативное действие мутантного аллеля или способствовать преобладанию протективного эффекта, для определенных этнических групп, так и двоякую роль некоторых SNP в канцерогенезе, в частности, полиморфных локусов C677T и A1298C гена *MTHFR*. Поскольку, в одном случае, обе замены через изменение активности MTHFR, могут вызывать снижение пула SAM, гипометилирование ДНК [31,121] и активацию протоонкогенов, а значит, способствовать злокачественной трансформации. С другой стороны, снижение активности фермента, кодируемого этим геном, может увеличивать пул 5,10-метилентетрагидрофолата, необходимого для синтеза дезокситимидинмонофосфата и пуриновых нуклеотидов, тем самым стабилизировать геном [159]. Поэтому, очень перспективным представляется стратификация гетерогенной выборки пациентов РМЖ и поиск ассоциаций не во всей совокупности, а в пределах отдельных подтипов.

1.5. Заключение

Таким образом, проведенный анализ данных отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что рак молочной железы относится к мультифакториальным заболеваниям, в генезе, которого важная роль принадлежит генетической составляющей, и в частности, полиморфизмам генов фолатного обмена, влияющих на функционирование патогенетически важных звеньев, связанных с поддержанием целостности генома и работой иммунной системы [18]. Установлены сложные взаимодействия между изменениями в структуре гена и вариантами проявления этих изменений. Изучение этих механизмов позволяет с другой стороны взглянуть на проблему ПЗМЖ. Большая медико-социальная значимость данной патологии диктует необходимость проведения дальнейших комплексных исследований полиморфизмов генов-кандидатов, влияющих на развитие данной патологии в различных популяциях на территории России.

Нельзя не отметить тот факт, что результаты, полученные разными исследователями, зачастую противоречивы, а подавляющее большинство научных работ, посвященных проблеме изучения генетической предрасположенности к РМЖ, проведено зарубежными исследователями. В Российской Федерации таких исследований недостаточно.

Причины низкой воспроизводимости результатов ассоциативных исследований могут заключаться как в особенностях проведения этих исследований, так и в межпопуляционных различиях и неодинаковой представленности отдельных видов рака в выборках, сформированных разными авторами. Генетические различия – это, во-первых, отличия в частотах встречаемости аллелей между популяциями (например, аллель 677Т гена *MTHFR* встречается в российской популяции с частотой 29%, а в китайской – 45% [101]). Во-вторых, это межпопуляционные различия групп сцепления генетических маркеров. Полиморфный локус, показавший ассоциацию с риском рака в одной популяции, может быть на самом деле сцеплен с каким-либо другим функциональным локусом именно в этой популяции, который и является истинно

ассоциированным с заболеванием, внося вклад в его предрасположенность. К межпопуляционным относятся и различия в действии факторов окружающей среды, которые могут модулировать эффект аллельных вариантов, например, уровня потребления фолата и других компонентов цикла фолиевой кислоты, таких как кобаламин и другие кофакторы.

И все же, несмотря на неоднозначность данных по различным случаям онкопатологии, несмотря на неясно обозначенные различия в этиопатогенезе, имеются основания говорить о базисной тождественности их развития – о нестабильности генома клеток, индуцированной метилированием ДНК, которое играет значительную роль в манифестации клинических проявлений наследственных заболеваний и мультифакториальных нарушений, что необходимо учитывать. Следовательно, вопросы поиска новых предикторов РМЖ, продолжают оставаться актуальными и требуют дальнейшего изучения, а отличие уровней метаболической активности тиолов в очагах фиброаденомы и РМЖ может свидетельствовать о существовании различных механизмов его контроля.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика клинического материала

В работе с исследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциацией (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции 2013 г., изменения внесены на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМАЮ Форталеза, Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Этическая экспертиза диссертационного исследования проведена на заседании локального этического комитета от 24 декабря 2014 года (протокол № 69).

Исследования проводились в период с 2014 по 2016 г. в лаборатории молекулярной генетики, а также экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (ректор - Заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В. Говорин).

Все участники исследования были разделены на 2 группы: больных ПЗМЖ и контрольную. Группа больных пролиферативными заболеваниями молочной железы включала 182 женщины в возрасте – $49,5 \pm 10,1$ лет, проходившие обследование и лечение в хирургическом отделении опухолей молочной железы ГУЗ «Забайкальского краевого онкологического диспансера» в период с ноября 2014 г. по октябрь 2015 г. Диагноз был выставлен на основании сбора жалоб, анамнеза заболевания, по результатам клинического хирургического обследования и инструментальных методов исследования (УЗИ, маммография), а также данных гистологического и иммуногистохимического исследований.

Контрольную группу составили 142 относительно здоровые неродственные женщины Забайкальского края соответствующего возраста ($48,6 \pm 8,5$ лет, $p > 0,05$), не имеющие признаков онкопатологии по данным анкетирования, осмотра и

объективных методов обследования (УЗИ, маммография). Также были использованы 16 образцов морфологически неизменной ткани молочной железы от постмортальных лиц без онкопатологии (по данным анамнеза, протоколов вскрытий, историй болезни), полученных в Краевом патологоанатомическом бюро г. Чита.

Сбор анамнестических и клинических данных проводился по специально разработанной анкете, которая включала сведения о месте рождения и жительства, возрасте, наличии вредных привычек, профессиональных вредностей, наличие онкопатологии у родственников, экстрагенитальных и гинекологических заболеваний. Параллельно была составлена компьютерная база клинко-генеалогических и генетических данных о каждой пациентке с новообразованием молочной железы и здоровых респондентов контрольной группы, а также создан банк биологического материала (цельная кровь и выделенные из нее ДНК, опухолевый материал, полученные от пациенток, страдающих ПЗМЖ). Расчет индекса массы тела осуществлялся по формуле А. Кетле: масса (кг) / рост² (м). Все наблюдаемые или родственники (законные представители) умерших, подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

2.2. Развернутая характеристика групп исследования

2.2.1. Характеристика группы контроля

В контрольную группу методом сплошной выборки были включены 142 женщины, проживающие в Забайкальском крае, средний возраст которых составил $48,6 \pm 8,5$ года, считающие себя относительно здоровыми (не имели на момент обследования острых или обострения хронических заболеваний) и без семейной истории РМЖ. В контрольной группе была проведена недавняя маммография, подтверждающая отсутствие патологии молочных желез. При распределении по индексу массы тела преобладали обследуемые с избыточной массой тела (ИМТ= $26,7 \pm 1,4$). Нарушения менструальной и репродуктивной функции диагностированы у 35 (24,6%) женщин.

В качестве лабораторного контроля также служил секционный материал 16 образцов морфологически неизменной ткани молочных желез здоровых женщин, погибших в результате несчастного случая или не от онкологических заболеваний (Краевое бюро судебно-медицинской экспертизы, Краевое патологоанатомическое бюро, г. Чита). Средний возраст ($43,0 \pm 12,3$ лет) и ИМТ ($25,7 \pm 7,4$) в данной подгруппе соответствовали основной контрольной группе ($p > 0,05$).

Критерии включения в контрольную группу:

- отсутствие пролиферативных заболеваний;
- люди, считающие себя относительно здоровыми и проживающие в Забайкальском крае.

Критерии исключения из контрольной группы:

- острые и хронические заболевания в стадии обострения;
- доброкачественные или злокачественные новообразования;
- гематологические и обменные заболевания, почечная недостаточность;
- беременность.

При распределении по возрастным группам среди здоровых женщин максимальное количество (40,1%) наблюдалось в возрасте от 40 до 49 лет (табл. 2.2.1.1.).

Таблица 2.2.1.1.

Распределение относительно здоровых женщин, по возрасту, (n=142)

Возраст	Абс. число	Отн. (%)
30-39	19	13,4
40-49	57	40,1
50-59	53	37,3
60 и более	13	9,2

При распределении по индексу массы тела здоровые женщины были разделены согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (1997 г.) [38] на три группы: ниже нормы, где индекс массы тела был меньше $18,49 \text{ кг/м}^2$, норма, где индекс массы тела был от $18,50$ до $24,99 \text{ кг/м}^2$ и выше

нормы, индекс массы тела в данной группе составлял более 25,0 кг/м². Большинство наблюдаемых (44,4%) имели избыточную массу тела (ИМТ=26,7±1,4) (табл. 2.2.1.2.).

Таблица 2.2.1.2.

Распределение относительно здоровых женщин по ИМТ, (n=142)

ИМТ	Абс. число	Отн. (%)	M±SD
Норма	47	33,1	21,1±1,5
Избыточный вес	63	44,4	26,7±1,4
Ожирение I, II и III степени	32	22,5	33,9±3,6
Всего	142	100	26,1±5,4

Из соматических заболеваний у женщин КГ наиболее часто встречались остеохондроз позвоночника (29,5%), гипертоническая болезнь (11,2%), хронический поверхностный гастрит (7,7%), хронический панкреатит (3,5%), хронический тонзиллит (2,8%), хронические воспалительные болезни женских половых органов (шейки матки, влагалища, вульвы) (8,4%) в стадии ремиссии, а также невоспалительные болезни женских половых органов (17,6%) в том числе бесплодие (4,2%) (табл. 2.2.1.3.).

Таблица 2.2.1.3.

Частота соматической патологии в КГ, (n=142)

Соматическая патология	Абс.	Отн. (%)
Заболевания сердечно-сосудистой системы	32	22,5
Заболевания бронхолегочной системы	16	11,2
Заболевания органов ЖКТ	31	21,8
Заболевания мочевыделительной системы	13	9,1
Заболевания костно-мышечной системы	49	34,5

2.2.2. Характеристика группы больных ПЗМЖ

Методом сплошной выборки в процесс исследования были включены 182 уроженки Забайкальского края (средний возраст 49,5±10,1 лет) с морфологически подтверждённым диагнозом пролиферативного заболевания молочной железы.

Критерии включения:

- больные доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы с подтвержденным гистологическим диагнозом (рак молочной железы 0-IV стадии, фиброаденома молочной железы, локализованная мастопатия).

Критерии исключения:

- острые воспалительные заболевания и хронические в стадии обострения;
- наличие тяжелых сопутствующих соматических заболеваний (почечная недостаточность, сахарный диабет, псориаз и гемобластозы);
- беременность.

Согласно различным патогенетическим сценариям развития заболевания и тяжести процесса все больные подразделены на 2 подгруппы:

Больные с раком молочной железы (РМЖ) – 122 женщины с РМЖ распределялись по стадиям от 0 до IV. Средний возраст пациенток составил $53,3 \pm 7,6$ лет, 43 (35,2%) из них были в предклимактерическом периоде, а 72 (59%) - в постклимактерическом.

Стадию заболевания определяли по системе “TNM Классификация злокачественных опухолей”, 7 издание, 2010 год, Американского Объединенного Комитета по Раку (American Joint Committee on Cancer). На основании результатов клинического обследования интраоперационной диагностики, гистологического изучения операционного материала I стадию РМЖ диагностировали у 23 (18,9%) больных, II стадию – у 65 (53,3%) больных, III стадию – у 29 (23,7%) больных, IV стадию – у 2 (1,6%) больных (табл. 2.2.2.1.).

Размер опухолей варьировался от минимума $0,02 \text{ см}^3$ до максимума 1377 см^3 со средним значением $29,9 \pm 134,2 \text{ см}^3$. Размеры первичной опухоли в диаметре при I стадии РМЖ составляли в среднем $1,0 \pm 0,7 \text{ см}^3$ и не превышали 1,5 см в наибольшем измерении. При II стадии размеры опухоли достигали $4,5 \pm 3,6$ и $51,6 \pm 30,2 \text{ см}^3$ в 52 и 13 случаях, соответственно, и не превышали 6 см. При III стадии процесса в 23 и 6 случаев опухоли размерами $17,5 \pm 19,1$ и $537,0 \pm 46,4 \text{ см}^3$

достигали 6 и 10,5 см в наибольшем измерении, соответственно. При IV стадии рака размеры опухоли не превышали 2,2 см ($2,7 \pm 3,7$ см³) у 2 больных. В 43,4% (n=53) случаях РМЖ были выявлены метастазы регионарных лимфатических узлов, причем 19,7% из них приходятся на размеры первичного очага от 2 до 5 см (табл. 2.2.2.2.).

Таблица 2.2.2.1.

Распределение больных РМЖ по стадиям заболевания (n=122)

Стадия	TNM	Частота	
		Абс.	Отн. (%)
0		3	2,5
I	T1N0M0	23	18,9
IIA	T1N1M0	17	49
	T2N0M0	32	
IIB	T2N1M0	14	16
	T3N0M0	2	
IIIA	T1N2M0	2	12
	T2N2M0	8	
	T3N1M0	1	
	T3N2M0	1	
IIIB	T4N0M0	3	11
	T4N1M0	2	
	T4N2M0	6	
IIIC	T2N3M0	6	4,9
IV	T4N2M1	2	1,6
Всего		122	100

Таблица 2.2.2.2.

Размеры первичной опухоли и частота метастатического поражения у больных РМЖ (n=122)

Стадия	Количество больных		Метастазы	
	Абс.	Отн. (%)	Абс.	Отн. (%)
Tis	3	2,5	0	0
T1 (до 2 см)	44	36,0	18	14,8
T2 (2-5 см)	56	45,9	24	19,7
T3 (более 5 см)	5	4,1	1	0,8
T4 (любой размер)	14	11,5	10	8,2
Всего	122	100	53	43,4

При исследовании зависимости размеров первичного очага от возраста больного было отмечено, что размеры первичной опухоли до 3,0 см наиболее часто встречались в возрастных группах 40-49 (12,3%), 50-59 (29,5%) и 60-69 (15,5%) лет. Случаи опухолевого поражения с размерами первичной опухоли до 5,0 см почти равномерно распределились среди возрастных групп 40-49 (4,9%) и 50-59 (7,3%) лет. Однако следует заметить, что в группе больных молодого возраста (до 40 лет) во всех случаях (6,5%) размеры первичной опухоли не превышали 3,0 см. Обращает на себя внимание тот факт, что первичные опухоли размером до 10,5 см были отмечены только в 3 случаях (2,4%) у больных 54, 60 и 63 лет. Случай роста первичной опухоли более 25 см отмечен в возрасте 62 лет (0,8%) (табл. 2.2.2.3.).

Таблица 2.2.2.3.

Распределение больных РМЖ по стадиям в зависимости от возраста (n=122)

Возраст	0		I		II		III		IV		Итого	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
30-39	-	-	-	-	4	3,3	3	2,45	-	-	7	5,7
40-49	2	1,6	3	2,5	8	6,6	7	5,73	-	-	20	16,4
50-59	1	0,8	11	9,0	22	18,0	10	8,19	1	0,8	45	36,9
60-69	-	-	9	7,3	30	24,6	5	4,08	-	-	44	36
Всего	3	2,4	23	18,8	65	52,5	29	20,5	2	0,8	122	100

Гистотип опухоли определялся на основании «Гистологической классификации опухолей молочной железы Всемирной организации здравоохранения, 4 издание (2012 г.). В группе преобладали два гистологических подтипа РМЖ инфильтративно-протоковый и инфильтративно-дольковый – 53 и 29 случаев (43,5 и 23,8%). Смешанная (инфильтративные протоковый и дольковый) форма рака молочной железы наблюдалась в 24 случаях (19,7%), а прочие редкие (медуллярный, слизистый, метапластический рак и др.) - в 16 (13%). Также среди больных РМЖ у 2 женщин (1,6%) был диагностирован первично-множественный синхронный рак молочной железы, а у 4 человек (3,2%) – первично-множественный метакронный рак молочной железы (табл. 2.2.2.4).

Таблица 2.2.2.4.

Частота выявления гистологического типа опухоли у больных РМЖ (n=122)

Гистологический тип опухоли	Абс.	Отн. (%)
Инфильтративный протоковый рак	53	43,5
Инфильтративный дольковый рак	29	23,8
Смешанный рак	24	19,7
Редкие формы рака	16	13,0
Всего	122	100

При иммуногистохимическом анализе рецепторной экспрессии 120 образцов (2 неклассифицированных) опухолевой ткани молочной железы в исследуемой группе было выявлено преобладание рецепторпозитивных форм рака (79,5%, $p < 0,05$): положительные рецепторы эстрогенов имели 96 (80,0%) пациенток, а положительные рецепторы прогестерона были определены у 87 (72,5%) больных. Отрицательные рецепторы эстрогенов были у 24 (20,0%) больных, а отрицательные рецепторы прогестерона были у 33 (27,5%) пациенток. Статус Her2/neu был определен у 120 больных РМЖ, из них гиперэкспрессия Her2/neu 3+ по ИГХ была лишь у 11 (9,2%) пациенток, у большинства больных – 109 (90,8%) не отмечалось гиперэкспрессии Her2/neu (0, 1+ по ИГХ). Среднее значение Ki-67 для 120 пациенток, у которых он был исследован, составило $26,9 \pm 2,14\%$ (от 1 до 98, медиана 20). Высокую пролиферативную активность (15% и выше) имели 77 (64,2%) больных, у 43 (35,8%) пациенток пролиферативная активность была низкой. Среди подтипов РМЖ преобладал люминальный В рак (Lum В – 47,5%, Lum А – 32,0%, базальноподобный – 13,9%; $p < 0,05$), а на последнем месте оказался HER2-neu позитивный (4,9%). Люминальный В подтип рассматривался без учета HER2neu статуса (табл. 2.2.2.5).

Основные иммуногистохимические характеристики образцов
ткани больных РМЖ (n=122)

Характеристика	Абс.	Отн. (%)
Молекулярный тип РМЖ		
Люминальный А	39	32,5
Люминальный В (HER2+ / HER2-)	58 (13/45)	48,3 (10,8/37,5)
HER2-neu позитивный	6	5,0
Базальноподобный	17	14,2
Гормональный фенотип		
РЭ(+), РП(+)	83	69,2
РЭ(+), РП(-)	13	10,8
РЭ(-), РП(+)	4	3,3
РЭ(-), РП(-)	20	16,7
Уровень экспрессии HER2-neu		
отрицательный фенотип (0)	79	65,8
слабая экспрессия (1+)	20	16,7
умеренная экспрессия (2+)	10	8,3
выраженная экспрессия (3+)	11	9,2
Уровень экспрессии Ki 67		
низкий (<15%)	43	35,8
средний (16-30%)	30	25,0
высокий (>30,0%)	47	39,2

Примечание: РЭ и РП - экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона.

Из 122 наблюдений наиболее часто опухоль локализовалась в верхнем наружном квадранте в 27% (n=33), далее по частоте расположения следовал центральный сектор 13,1% (n=16), граница наружных квадрантов и верхне-внутренний квадрант по 12,3% (n=15), граница верхних квадрантов 10,7% (n=13). У 24,6% (n=30) пациенток первичная локализация опухоли была установлена в других реже встречаемых локализациях, не превышающих 7% каждая. Таким образом, шестьдесят одна пациентка имела рак в правой груди, 55 в левой груди и 6 в обеих молочных железах (табл. 2.2.2.6.).

Таблица 2.2.2.6.

Частота поражения квадрантов молочной железы при РМЖ (n=122)

Локализация первичного узла в молочной железе, квадрант (-ов)	Количество больных	
	Абс.	Отн. (%)
Верхне-внутренний	15	12,3
Нижне-внутренний	7	5,7
Верхне-наружный	33	27,0
Нижне-наружный	8	6,6
Граница верхних	13	10,7
Граница внутренних	4	3,3
Граница нижних	6	4,9
Граница наружных	15	12,3
Центральный	16	13,1
Несколько вышеуказанных локализаций	5	4,1
Всего	122	100

Стандартный объем предоперационного обследования у больных раком молочной железы включал маммографию обеих молочных желез в двух проекциях, рентгенографию легких, ультразвуковое исследование органов малого таза и печени, подмышечных, надключичных и подключичных лимфатических (регионарных) узлов, сканирование костей скелета.

Больные с доброкачественными образованиями молочной железы (ДОМЖ) – 60 пациенток с фиброаденомой и локализованной мастопатией, средним возрастом в группе $45,5 \pm 10,4$ лет, причем 75% из них была в репродуктивном периоде. Большинство пациенток имели образование в правой груди - 57%, в левой груди 27 %, а 16 % в обеих молочных железах (табл. 2.2.2.7.).

Таблица 2.2.2.7.

Частота выявления гистологического типа у больных ДОМЖ, (n=60)

Гистологический тип	Абс.	Отн. (%)
Фиброаденомы:		
- периканаликулярная	13	36,7
- интраканаликулярная	5	
- смешанная	4	
Локализованная мастопатия	38	63,3
Всего	60	100

Все обследованные с ПЗМЖ были разделены на возрастные группы: 30-39, 40-49, 50-59 и 60-69 лет. Наиболее часто встречаемый возраст больных с РМЖ составил – 50-59 года (50,8%), а с ДОМЖ – 30-39 лет (41,7%) (табл. 2.2.2.8.).

Таблица 2.2.2.8.

Распределение больных ПЗМЖ по возрасту

Возраст	РМЖ, n=122		ДОМЖ, n=60		Всего, n=182	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
30-39	11	9,0	25	41,7	36	19,8
40-49	21	17,2	20	33,3	41	22,5
50-59	62	50,8	14	23,3	76	41,8
60 и более	28	23,0	1	1,7	29	15,9

При распределении по индексу массы тела в подгруппе с РМЖ наибольший процент имели женщины с избыточной массой тела – 37,7% (ИМТ=27,9±1,5), а среди больных ДОМЖ – с нормальным весом – 41,7% (ИМТ=22,1±1,6). Больные с ПЗМЖ отличались по ИМТ относительно КГ: 1) ИМТ ≥ 30 кг/м² достоверно чаще встречался у больных РМЖ (35,2%, против 22,5% у здоровых, $p=0,02$, $\chi^2=5,21$); 2) ИМТ 25-29,9 кг/м² достоверно реже встречался у больных ДОМЖ (18,3%, против 44,4% у здоровых, $p=0,0004$, $\chi^2=12,3$). Среднее значение ИМТ в группе с РМЖ (28,3±4,9) было несколько выше чем в контроле (26,1±5,4) ($p=0,04$) (табл. 2.2.2.9.).

Таблица 2.2.2.9.

Индекс массы тела у больных ПЗМЖ и здоровых

ИМТ	КГ, n=142		ДОМЖ, n=60		РМЖ, n=122	
	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
Дефицит (<18,5)	0	0	4	6,7	0	0
Норма (18,5-24,9)	47	33,1	25	41,7	33	27,1
Избыточный вес (25-29,9)	63	44,4	11	18,3	46	37,7
Ожирение I, II и III степени (≥ 30)	32	22,5	20	33,3	43	35,2
Среднее значение (M±SD)	26,1±5,4		25,8±5,7		28,3±4,9	

Нарушения менструальной и репродуктивной функции диагностированы у 13% пациенток с ПЗМЖ (аменорея, первичное бесплодие), причем чаще у больных с РМЖ. При сравнении обследуемых женщин и в контроле, количество

родов и абортотв отличалось: в группе пациенток с ДОМЖ число абортотв (32,2%, против 52,1% у здоровых, $p=0,009$, $\chi^2=6,64$ и против 51,6% у РМЖ, $p=0,01$, $\chi^2=6,06$) и родов (57,7% против 84,5% у здоровых, $\chi^2=16,81$, $p=0,00004$) встречалось достоверно реже чем в контроле. Отмечались различия и у больных РМЖ имеющих меньшее количество родов относительно здоровых (68,9% против 84,5% у здоровых, $\chi^2=9,15$, $p=0,002$) (табл. 2.2.3.0.).

Таблица 2.2.3.0.

Количество родов и абортотв у больных ПЗМЖ и здоровых

Кол-во	КГ, n=142				ДОМЖ, n=60				РМЖ, n=122			
	абортотв		родов		абортотв		родов		абортотв		родов	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)
0	68	47,9	22	15,5	41	67,8	26	42,4	59	48,4	38	31,1
1	27	18,3	55	38,7	6	10,2	12	20,3	11	9,0	19	15,6
2	26	19	52	36,6	9	15,2	19	32,2	27	22,1	42	34,4
3 и >	21	14,8	13	9,2	4	6,8	3	5,1	25	20,5	23	18,9

В структуре соматической патологии у больных ПЗМЖ, в обеих подгруппах с РМЖ и ДОМЖ, также, как и в КГ доминируют сердечно-сосудистые заболевания (у 56,6% и 38,3% больных, соответственно). На втором месте среди сопутствующей патологии стояли заболевания костно-мышечной системы (преимущественно остеохондроз позвоночника) (у 23,3% и 44,3% больных). На третьем месте наблюдался высокий процент заболеваний органов желудочно-кишечного тракта (у 18,3% и 29,5% больных). Также были отмечены заболевания органов дыхания (хронический бронхит, ХОБЛ), мочевыделительной системы (табл. 2.2.3.1.).

Таблица 2.2.3.1.

Частота соматической патологии у больных ПЗМЖ

Соматическая патология	ДОМЖ, n=60	РМЖ, n=122
	Абс. (%)	
Заболевания сердечно-сосудистой системы	23 (38,3)	69 (56,6)
Заболевания бронхолегочной системы	3 (5,0)	25 (20,5)
Заболевания органов ЖКТ	11 (18,3)	36 (29,5)
Заболевания мочевыделительной системы	5 (8,3)	16 (13,1)
Заболевания костно-мышечной системы	14 (23,3)	54 (44,3)

Таким образом, между исследуемыми лицами в основной и контрольной группе были выявлены межгрупповые различия по ИМТ, числу аборт и родов, перенесенным гинекологическим и соматическим заболеваниям ($p < 0,05$). В зависимости от ИМТ, в сравнении с контролем, среди больных РМЖ несколько чаще регистрировалось ожирение ($p = 0,02$), а у пациенток с ДОМЖ – реже избыточная масса тела ($p = 0,0004$). Средний ИМТ отличался от контроля только у больных РМЖ ($p = 0,04$). Также, рассматриваемые группы статистически достоверно отличались по акушерскому анамнезу (в сравнении с контролем в группе больных РМЖ и ДОМЖ реже встречались роды, а у последних и количество аборт ($p < 0,05$)). Соматический статус у данных больных в 60% был отягощен фоновой патологией, где преобладала сопутствующая сердечно-сосудистая патология (атеросклероз, гипертензивная болезнь). Количество больных с заболеваниями ССС превалировало как в группе с ДОМЖ (38,3% против 22,5% у здоровых; $\chi^2 = 59,08$, $p < 0,01 \cdot 10^7$), так и РМЖ (56,6% против 22,5% у здоровых; $\chi^2 = 59,08$, $p < 0,01 \cdot 10^7$) относительно контроля. Также данные группы отличались и между собой (38,3% при ДОМЖ против 56,6% в группе с РМЖ; $\chi^2 = 15,5$, $p < 0,0001$). Средний возраст, основной группы с ПЗМЖ ($49,5 \pm 10,1$ лет) не отличался в сравнении с контрольной ($48,6 \pm 8,5$ лет) ($p > 0,05$).

Максимальное количество исследуемых с РМЖ имели II стадию заболевания с локализацией опухоли в верхне-наружном квадранте молочной железы, гистологически – инфильтративно-протоковый рак, находились в возрастной группе от 50 до 59 лет, а больные с генерализованной стадией злокачественного процесса составили 21,3%. Иммуногистохимический статус характеризовался высокой долей рецептор-положительных опухолей и пролиферативной активности (64,2% больных РМЖ) по антигену Ki-67 со средним индексом $26,9 \pm 2,14\%$. Наиболее частым молекулярным подтипом был люминальный В тип.

Большинство пациенток с ДОМЖ были в возрасте 30-39 лет и имели образование в правой груди, где гистологически преобладала локализованная мастопатия. Все исследуемые с ПЗМЖ ($n = 182$), по частоте стороны поражения

МЖ разделились следующим образом: у 50,3% выявлено поражение правой молочной железы, 43,1% с поражением левой молочной железы, а у 6,6% - обеих молочных желёз.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Клинические методы исследования

Клиническое обследование больных включало в себя оценку жалоб на момент установления заболевания, соматического статуса, детальный сбор анамнеза. Были проанализированы следующие клиничко-анамнестические данные: возраст, индекс массы тела, менструальная и репродуктивная функция, сопутствующая гинекологическая и соматическая патология.

2.3.2. Инструментальные методы исследования

По общепринятым методикам проводилось патоморфологическое исследование операционного и секционного материала (метод окраски гематоксилином и эозином), цитологическое исследование мазка-пунктата опухоли, ультразвуковое исследование молочных желез, маммография, рентгенография органов грудной полости, а также электрокардиография.

2.3.3. Иммуногистохимическое исследование

Во всех случаях РМЖ сделано иммуногистохимическое исследование экспрессии эстрогеновых рецепторов (ER) и прогестерона (PgR), эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu) и пролиферативной активности опухоли (индекс Ki-67 согласно классификации St. Gallen Consensus 2009 [93]) по стандартным ИГХ методикам [62]. Из фиксированных в нейтральном формалине и залитых в парафин образцов опухолевой ткани делали срезы толщиной 5 мкм, окрашивали их гематоксилин-эозином. Для выявления тканевых антигенов использовались готовые к употреблению мышиные антитела ("Dako") к рецепторам эстрогена (ER; клон 1D5) и прогестерона (PR; клон PgR 636), маркеру пролиферативной активности Ki-67 (клон Mib-1) и поликлональное кроличье антитело c-erbB-2 onkoprotein (разведение 1:500). Визуализация реакции

произведена с использованием системы ENVIZION DualLink "Dako". Молекулярные профили РМЖ определяли на основе уровня экспрессии протеинов следующим образом: люминальный А (Ki-67<14%, ER+ и/или PR+, HER2-), люминальный В (Ki-67>14%, ER+ и/или PR+, HER2), базальный (ER-, PR-, HER2-) и HER2+ подтип (HER2+, ER-, PR-).

2.3.4. Лабораторные методы исследования

Для уточнения диагноза и исследования общего соматического состояния использовались: общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови с определением глюкозы, аспарагиновой и аланиновой трансаминаз, общего белка и билирубина, мочевины и креатинина, альфа-амилазы, гамма-глутамилтранспептидаза, щелочной фосфатазы, индекса атерогенности, коагулограммы. Забор периферической крови проводился при пунктировании кубитальной вены в вакууттейнеры («Vacuette», Austria) по стандартной методике.

2.3.4.1. Определение концентрации аминотиолов в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани

Исследование аминотиолов: гомоцистеина, цистеина, глутатиона, цистеинилглицина и глутамилцистеина – проводили в сыворотке крови, а также в опухолевой и морфологически неизменной ткани молочной железы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием компьютерной программы для управления хроматографом и анализа хроматограмм «LabSolutions» версия 5.20 (Shimadzu, Япония).

Для проведения использовалось следующее оборудование: хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония); Колонка Synergy Hydro-RP 80A 150 × 4.6 мм, 4 мкм, около 8700 ТТ (Phenomenex, США) с предколоночным тефлоновым фильтром 0.5 мкм (Supelco, США). Ультрацентрифуга SIGMA 3K30 (Sigma, США), вортекс (ИКА, Германия).

Забор крови для исследования проводили до начала лечения в стационаре на базе вышеуказанных лечебных учреждений после осмотра исследуемых групп. Для подготовки гомогената опухолевых тканей, биоптаты молочной железы изолированно промывались физиологическим раствором хлорида натрия трижды по 5 мл, чтобы удалить лишнюю кровь перед гомогенизацией. Ткань просушивали и взвешивали на электронных весах Sartorius A120S (Sartorius GmbH, Германия), после чего измельчали образцы ткани и замораживали. Далее из фрагментов ткани готовили гомогенат с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (TissueLyser II, Qiagen, Германия) в пробирках с плоским дном на 2,0 мл с добавлением фосфатно-солевого буфера autoMACS™ Rising Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) pH 7.2 в соотношении к ткани 1 мл на 100 мг. Затем гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант гомогената использовали для определения аминотиолов. Супернатант хранили при температуре менее – 70° С.

Определение аминотиолов осуществляли однократно, в сыворотке по методу А.А. Zhloba, Е.Л. Vlashko [176], а в супернатанте гомогената ткани по методу Raijmakers et al. [141] с небольшими модификациями. Изучаемые параметры детектировали при длине волны 330 нм и 377 нм, соответственно. Полученный результат в сыворотки выражали в мкмоль/л, а в тканях - нмоль/мг ткани.

2.3.5. Молекулярно-генетические исследования

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови реагентами ДНК-Экспресс-кровь (НПФ «Литех», Москва). Генотипирование проводилось с использованием наборов «Генетика Метаболизма Фолатов» для выявления полиморфизма: *MTHFR*(C677T) (rs1801133), *MTHFR*(A1298C) (rs1801131), *MTR*(A2756G) (rs1805087), *MTRR*(A66G) (rs1801394) (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) методом полимеразной цепной реакции с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени. Для постановки ПЦР

использовался ПЦР-амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Полученные результаты трактовали согласно инструкции производителя. Забор крови для данного исследования осуществлялся однократно для всех групп наблюдения.

2.3.6. Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., США).

Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность, при помощи методов асимметрии и эксцессов. Проверка характера распределения значений в выборке проводилась с помощью теста Shapiro - Wilk's. Для описания количественных результатов исследования использовали медиану (Me) и процентиля (25-й и 75-й). Сравнение двух несвязанных групп проводили по критерию Манна-Уитни (U-тест), значения уровня $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые. Для оценки связи между количественными признаками использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена, значимым признавался результат $r_s > 0,3$ при $p < 0,05$.

Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовался критерий χ^2 (Пирсона). Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к изучаемой патологии судили по величине относительного риска заболевания (RR) и отношению шансов (OR). Границы 95%-го доверительного интервала (CI) вычисляли методом В. Woolf. Значения уровня $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые.

Кроме этого, вычисляли индивидуальный генетический индекс (IGI) являющийся ранжированной величиной, характеризующей аддитивный эффект носительства изучаемого генетического полиморфизма (кумулятивная

полимерия) у индивидуума с учетом, что нормальная гомозигота – это «1», гетерозигота – «2», минорная гомозигота – «3» [2].

Формула расчета: индивидуальный генетический индекс (IGI) у одного исследуемого:

$$IGI = \frac{A_{HP\ MTHFR(C677T)} + A_{HP\ MTHFR(A1298C)} + A_{HP\ MTR(A2756G)} + A_{HP\ MTRR(A66G)}}{N}$$

где, А – числовое значение генотипа; HP – выявленный генотип полиморфизма определенного фермента фолатного цикла; N – количество генотипов. После унификации (когда качественные показатели переводятся в количественные, соизмеримые по значимости) и суммации баллов находили М (медиану) и сравнивали с подобными значениями здоровых пациенток с помощью критерия Мана-Уитни.

Для установления причинной связи, а также количественного измерения эффекта качественного признака применялся логистический регрессивный анализ (бинарная логит регрессия). Для анализа межгенных взаимодействий при ПЗМЖ использовался биоинформатический метод Multifactor Dimensionality Reduction (MDR). Данный метод позволяет проводить одновременный анализ множества полиморфизмов генов, выбирая из них такие комбинации, которые имеют наибольшую патогенетическую значимость для развития болезни. Мультилокусные генотипы группируются по степени риска развития заболевания, что влечет снижение числа рассчитываемых параметров. Многократный перекрестный пересчет первичных данных по различным группам риска позволяет построить модель межгенного взаимодействия и предсказать на её основе с высокой точностью наличие предрасположенности к конкретному заболеванию.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Частота полиморфных генетических маркеров в группах наблюдения

3.1.1. Сравнительная частота полиморфизма генов белков фолатного цикла (*MTHFR-677C>T*, *MTHFR-1298A>C*, *MTRR-66A>G*, *MTR-2756A>G*) у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы в Забайкальском крае

В результате молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга. При сравнении частот аллелей и генотипов изучаемых полиморфных маркеров генов фолатного цикла у больных ПЗМЖ и в контрольной группе отчетливые различия наблюдались только по генотипу *MTHFR1298AC* с большей частотой встречаемости последнего у больных ПЗМЖ ($OR=1,65$, $p=0,03$). При этом относительный риск развития ПЗМЖ у обладателей *MTHFR1298AC*-генотипа составил 1,24 [CI 95%: 1.02-1.50] (табл. 3.1.1.1.).

При количественной оценке генетических маркеров между группой больных ПЗМЖ и контроля, выявлено, что у пациенток с ДОМЖ частота носительства генотипа *MTHFR1298AC* ($p=0,02$) и аллеля *MTR2756A* ($p=0,04$) была больше относительно КГ, степень риска развития заболевания (RR) для них составила 1,83 [CI 95%: 1,19-2,80] и 1,67 [CI 95%: 1,00-2,80] соответственно. Относительная вероятность (OR) выявления генотипа *MTHFR1298AC* и аллеля *MTR2756A* у больных ДОМЖ в сравнении с контрольной группой возрастала в 2,4 раза [CI 95%: 1,29-4,45] и 2,0 раза [CI 95%: 1,04-3,79], соответственно. При этом протективным эффектом обладал аллель *MTR2756G* ($OR=0,50$ [CI95%: 0,26-0,96]).

При сравнении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров у пациенток с РМЖ значимых отличий выявлено не было, как в сравнении с контролем, так и больными с ДОМЖ (табл. 3.1.1.2).

Таблица 3.1.1.1.

Сравнительная частота аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в группах сравнения

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота аллеля, генотипа		P	χ^2	OR [95% CI:]	RR [95% CI:]
		КГ (n=142)	ПЗМЖ (n=182)				
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C	66 (46,5%)	88 (48,9%)	0,74	0,59	1,10 [0,71-1,71]	1,04 [0,86-1,27]
	C/T	64 (45,1%)	74 (41,1%)			0,85 [0,55-1,33]	0,93 [0,76-1,13]
	T/T	12 (8,5%)	18 (10,0%)			1,20 [0,56-2,59]	1,08 [0,79-1,47]
	C	196 (0,690)	250 (0,694)	0,91	0,01	1,02 [0,73-1,43]	1,01 [0,83-1,22]
T	88 (0,310)	110 (0,306)	0,98 [0,70-1,37]			0,99 [0,85-1,15]	
<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A	75 (52,8%)	83 (46,1%)	0,03	4,69	0,76 [0,49-1,19]	0,89 [0,73-1,08]
	A/C	47 (33,1%)	81 (45,0%)			1,65 [1,05-2,61]	1,24 [1,02-1,50]
	C/C	20 (14,1%)	16 (8,9%)			0,60 [0,30-1,20]	0,77 [0,53-1,13]
	A	197 (0,694)	247 (0,686)	0,84	0,04	0,97 [0,69-1,35]	0,98 [0,81-1,18]
C	87 (0,306)	113 (0,314)	1,04 [0,74-1,45]			1,01 [0,87-1,17]	
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A	92 (64,8%)	125 (69,4%)	0,18	3,42	1,24 [0,77-1,97]	1,10 [0,87-1,36]
	A/G	44 (31,0%)	53 (29,4%)			0,93 [0,58-1,50]	0,96 [0,78-1,20]
	G/G	6 (4,2%)	2 (1,1%)			0,25 [0,05-1,28]	0,44 [0,13-1,47]
	A	228 (0,803)	303 (0,842)	0,2	1,66	1,31 [0,87-1,96]	1,15 [0,93-1,42]
G	56 (0,197)	57 (0,158)	0,77 [0,51-1,15]			0,88 [0,72-1,07]	
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A	35 (24,6%)	39 (21,7%)	0,79	0,48	0,85 [0,50-1,42]	0,93 [0,73-1,18]
	A/G	71 (50,0%)	96 (53,3%)			1,14 [0,74-1,78]	1,06 [0,87-1,28]
	G/G	36 (25,4%)	45 (25,0%)			0,98 [0,59-1,63]	0,99 [0,79-1,24]
	A	141 (0,496)	174 (0,483)	0,74	0,11	0,95 [0,70-1,30]	0,97 [0,81-1,15]
G	143 (0,504)	186 (0,517)	1,05 [0,77-1,44]			1,02 [0,89-1,17]	

Примечание: выделены значимые различия частот. *df = 1, **df = 2.

Таблица 3.1.1.2.

Сравнительная частота аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла в группах сравнения

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)			P, χ^2	OR [95% CI:]	RR [95% CI:]
		КГ (n=142)	ДОМЖ (n=60)	РМЖ (n=122)			
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C C/T T/T	66 (46,5) 64 (45,1) 12 (8,5)	27 (45,8) 29 (49,2) 3 (5,1)	61 (50,4) 45 (37,2) 15 (12,4)	0,67 ¹	0,97 [0,53-1,79]	0,97 [0,64-1,51]
					0,79	1,18 [0,64-2,16]	1,12 [0,73-1,72]
						0,58 [0,16-2,14]	0,66 [0,23-1,87]
	C T	196 (0,690) 88 (0,310)	83 (0,703) 35 (0,297)	167 (0,690) 75 (0,310)	0,34 ²	1,17 [0,72-1,90]	1,09 [0,84-1,41]
					2,18	0,72 [0,44-1,18]	0,83 [0,63-1,10]
						1,53 [0,69-3,42]	1,23 [0,85-1,78]
					0,16 ³	0,83 [0,44-1,55]	0,88 [0,58-1,34]
					3,68	1,63 [0,87-3,06]	1,38 [0,91-2,10]
						0,38 [0,11-1,36]	0,48 [0,17-1,38]
<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A A/C C/C	75 (52,8) 47 (33,1) 20 (14,1)	23 (39,0) 32 (54,2) 4 (6,8)	60 (49,6) 49 (40,5) 12 (9,9)	0,79 ¹	1,06 [0,67-1,70]	1,05 [0,75-1,46]
					0,02	0,94 [0,59-1,50]	0,95 [0,68-1,33]
						1,00 ²	1,00 [0,69-1,45]
	A C	197 (0,694) 87 (0,306)	78 (0,661) 40 (0,339)	169 (0,698) 73 (0,302)	0,00	1,00 [0,69-1,45]	1,00 [0,81-1,22]
					0,8 ³	1,07 [0,66-1,72]	1,04 [0,75-1,44]
					0,07	0,94 [0,58-1,52]	0,96 [0,69-1,32]
					0,02¹	0,57 [0,31-1,06]	0,67 [0,43-1,05]
					8,24	2,40 [1,29-4,45]	1,83 [1,19-2,80]
						0,44 [0,14-1,36]	0,53 [0,21-1,34]
A C	197 (0,694) 87 (0,306)	78 (0,661) 40 (0,339)	169 (0,698) 73 (0,302)	0,36 ²	0,88 [0,54-1,43]	0,93 [0,72-1,21]	
				2,04	1,38 [0,83-2,28]	1,18 [0,91-1,53]	
					0,67 [0,31-1,44]	0,79 [0,49-1,26]	
				0,22 ³	0,65 [0,34-1,22]	0,75 [0,48-1,15]	
				3,07	1,74 [0,93-3,26]	1,45 [0,95-2,20]	
					0,66 [0,20-2,14]	0,75 [0,31-1,79]	
A C	197 (0,694) 87 (0,306)	78 (0,661) 40 (0,339)	169 (0,698) 73 (0,302)	0,52 ¹	0,86 [0,55-1,36]	0,90 [0,66-1,24]	
				0,41	1,16 [0,74-1,83]	1,11 [0,80-1,52]	
					0,91 ²	1,02 [0,70-1,48]	1,01 [0,83-1,24]
A C	197 (0,694) 87 (0,306)	78 (0,661) 40 (0,339)	169 (0,698) 73 (0,302)	0,01	0,98 [0,67-1,42]	0,99 [0,80-1,21]	
					0,47 ³	0,84 [0,53-1,35]	0,89 [0,65-1,22]

					0,51	1,19 [0,74-1,90]	1,12 [0,82-1,53]
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A A/G G/G	92 (64,8)	46 (76,7)	80 (65,5)	0,09 ¹	1,92 [0,95-3,89]	1,62 [0,94-2,77]
		44 (31,0)	13 (21,7)	39 (32,0)	4,73	0,63 [0,31-1,28]	0,71 [0,42-1,22]
		6 (4,2)	1 (1,6)	3 (2,5)		0,18 [0,01-3,18]	1,22 [0,89-1,68]
	A G	228 (0,803) 56 (0,197)	105 (0,875) 13 (0,125)	199 (0,816) 43 (0,184)	0,48 ²	1,06 [0,64-1,77]	1,03 [0,78-1,36]
					1,47	1,06 [0,63-1,78]	1,03 [0,78-1,36]
						0,38 [0,08-1,92]	0,53 [0,16-1,79]
			0,2 ³	1,81 [0,88-3,73]	1,52 [0,90-2,57]		
			3,20	0,59 [0,29-1,23]	0,70 [0,41-1,18]		
				0,40 [0,02-8,50]	0,75 [0,13-4,17]		
					0,04¹	1,98 [1,04-3,79]	1,67 [1,00-2,80]
			4,44	0,50 [0,26-0,96]	0,60 [0,36-0,99]		
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A A/G G/G	35 (24,6)	10 (16,9)	29 (24,0)	0,57 ²	1,14 [0,73-1,77]	1,07 [0,84-1,37]
		71 (50,0)	34 (57,6)	62 (51,2)	0,33	0,88 [0,57-1,37]	0,93 [0,72-1,19]
		36 (25,4)	15 (25,4)	30 (24,8)	0,1 ³	1,75 [0,90-3,39]	1,49 [0,90-2,46]
	A G	141 (0,496) 143 (0,504)	54 (0,458) 64 (0,542)	120 (0,496) 122 (0,504)	2,75	0,57 [0,29-1,11]	0,67 [0,41-1,11]
					0,46 ¹	0,62 [0,29-1,37]	0,71 [0,39-1,29]
					1,57	1,36 [0,74-2,51]	1,24 [0,80-1,92]
						1,00 [0,50-2,02]	1,00 [0,61-1,64]
					0,98 ²	0,97 [0,55-1,71]	0,99 [0,72-1,34]
			0,04	1,05 [0,65-1,71]	1,02 [0,79-1,33]		
				0,97 [0,55-1,70]	0,98 [0,72-1,33]		
			0,55 ³	0,65 [0,29-1,44]	0,74 [0,41-1,32]		
			1,21	1,29 [0,69-2,42]	1,19 [0,77-1,82]		
				1,03 [0,51-2,12]	1,02 [0,63-1,65]		
			0,48 ¹	0,86 [0,56-1,32]	0,90 [0,66-1,21]		
			0,50	1,17 [0,76-1,80]	1,11 [0,82-1,51]		
			0,99 ²	1,00 [0,71-1,41]	1,00 [0,83-1,20]		
			0,00	1,00 [0,71-1,41]	1,00 [0,83-1,20]		
			0,5 ³	0,86 [0,55-1,33]	0,90 [0,67-1,21]		
			0,46	1,17 [0,75-1,81]	1,11 [0,82-1,49]		

Примечание: ¹ – сравнение пациенток с ДОМЖ с представителями контрольной группы; ² – сравнение больных РМЖ с представителями контрольной группы; ³ – отличия между группами больных с ДОМЖ и РМЖ. Выделены значимые различия частот.

Далее мы определили лиц с комплексным носительством полиморфизма из рискованных генотипов с помощью программы MDR. По результатам проведенного анализа межгенных взаимодействий были установлены наиболее патогенетически значимые ассоциации, детерминирующие риск развития ПЗМЖ. Так, были выявлены наиболее часто встречаемые рискованные комбинации *MTHFR1298AC* x *MTR2756AA* в группе с ДОМЖ ($\chi^2=15,52$, $p=0,00008$, OR=3,6 [95% CI:1,88-7,08]) и в группе с ПЗМЖ ($\chi^2=7,4$, $p=0,006$, OR=2,1 [95% CI:1,21-3,50]) в сравнении с контрольной группой. Также встречались комбинации генотипов с протективным эффектом – *MTHFR1298AA* x *MTR2756AA* при ДОМЖ ($\chi^2=4,05$, $p=0,04$, OR=0,48 [95% CI:0,24-0,98]) и *MTHFR677CC* x *MTHFR1298CC* x *MTRR66AA* в группе больных с РМЖ, причем последнее сочетание носило лишь вероятностный характер ($\chi^2=3,72$, $p=0,05$, OR=0,16 [95% CI:0,01-1,32]). Рисковые комбинации представлены в таблице (табл. 3.1.1.3).

Таблица 3.1.1.3.

Рисковые комбинации полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* у больных ПЗМЖ

Комплексное носительство генотипов	КГ (n=142)	ДОМЖ ₁ (n=60)	РМЖ ₂ (n=122)	ПЗМЖ ₃ (n=182)	χ^2 , (p) _{1,2,3}
<i>MTHFR1298AC</i> x <i>MTR2756AA</i>	26 (18,3%)	27 * (45,7%)	30 (24,8%)	57 * (31,7%)	15,5(0,00008) ₁ 7,4 (0,006) ₃
<i>MTHFR1298AA</i> x <i>MTR2756AA</i>	52 (36,6%)	13 * (21,6%)	40 (33,1%)	54 (30%)	4,1 (0,04) ₁
<i>MTHFR677CC</i> x <i>MTHFR1298CC</i> x <i>MTRR66AA</i>	7 (4,9%)	1 (1,7%)	1 * (0,8%)	2 * (1,1%)	3,6 (0,05) ₂ 4,2 (0,03) ₃
<i>MTHFR1298AC</i> x <i>MTR2756AA</i> x <i>MTRR66AG</i>	15 (10,6%)	15 * (25,4%)	14 (11,6%)	29 (16,1%)	7,2 (0,007) ₁
<i>MTHFR1298AC</i> x <i>MTR2756AA</i> x <i>MTRR66GG</i>	6 (4,2%)	8 * (13,6%)	7 (5,8%)	15 (8,3%)	5,6 (0,01) ₁
<i>MTHFR677CC</i> x <i>MTHFR1298AC</i> x <i>MTR2756AA</i> x <i>MTRR66AG</i>	9 (6,3%)	9 * (15,3%)	11 (9,1%)	20 (11,1%)	4,2 (0,04) ₁
<i>MTHFR677CC</i> x <i>MTHFR1298AC</i> x <i>MTR2756AA</i> x <i>MTRR66GG</i>	1 (0,7%)	3 * (5,1%)	1 (0,8%)	5 (2,8%)	4,1 (0,04) ₁

Примечание: * (χ^2), ^{1,2,3} - сравнение пациенток с представителями контрольной группы.

Примечательно отметить 9 комбинаций генотипов, встречающихся в генетическом профиле только среди лиц контрольной группы (8,4%), что

возможно носит протективный характер в отношении развития ПЗМЖ и требует рассмотрения на большей выборке. Также установлено сочетанное носительство генотипов *MTHFR677CC x MTHFR1298AA x MTR2756GG x MTRR66GG* только в группе больных РМЖ (табл. 3.1.1.4).

Таблица 3.1.1.4.

Комбинации полиморфных вариантов генов белков фолатного обмена в КГ

Комплексное носительство генотипов	Абс.	%
<i>MTHFR677TT x MTHFR1298AA x MTR2756GG x MTRR66AG</i>	1	0,7
<i>MTHFR677TT x MTHFR1298AA x MTR2756AG x MTRR66AA</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AA x MTR2756GG x MTRR66AA</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AA x MTR2756GG x MTRR66GG</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AC x MTR2756GG x MTRR66GG</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AC x MTR2756AG x MTRR66AA</i>	3	2,1
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298CC x MTR2756GG x MTRR66AA</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298CC x MTR2756AG x MTRR66AA</i>	1	0,7
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298CC x MTR2756AG x MTRR66AG</i>	2	1,4
Всего	12	8,4

Следующим этапом исследования, было вычисление индивидуального генетического индекса с целью оценки аддитивного влияния рисков аллелей. Статистически значимой разницы между сравниваемыми группами при этом выявлено не было (табл. 3.1.1.5).

Таблица 3.1.1.5.

Генетический индекс у больных ПЗМЖ в Забайкальском крае

Группы наблюдения	Индивидуальный генетический индекс			
	1–1,25	1,5–1,75	2–2,25	≥ 2,5
КГ (n=142)	16,9 %	61,3 %	21,1 %	0,7 %
ДОМЖ (n=60)	18,7 %	59,3 %	22,0 %	0 %
РМЖ (n=122)	20,7 %	57,0 %	22,3 %	0 %

Примечание: (U-тест) - статистически значимой разницы между группами сравнения не выявлено.

Расчет генетического индекса среди больных РМЖ в зависимости от стадии процесса, также не показал значимых различий, однако имелась тенденция к уменьшению в 1,3 раза лиц с индексом 1,5–1,75 больных РМЖ II стадии в

сравнении со здоровыми респондентами ($\chi^2=3,17$; $p=0,07$) (табл. 3.1.1.6.).

Таблица 3.1.1.6.

Генетический индекс у больных РМЖ в зависимости от стадии

Стадии	Индивидуальный генетический индекс		
	1–1,25	1,5–1,75	2–2,25
КГ (n=142)	16,9%	61,3%	21,1%
I (n=26)	7,7%	69,2%	23,1%
II (n=64)	26,6%	48,4%	25,0%
III (n=29)	17,2%	65,6%	17,2%

Примечание: (U-тест) - статистически значимой разницы между группами сравнения не выявлено.

Таким образом, у больных ПЗМЖ выявлена ассоциация заболевания с носительством генотипа *MTHFR1298AC* (OR=1,65). У пациенток с доброкачественными образованиями молочной железы выявлена связь, как с аллелем *MTR2756A* (OR=1,67), так и с сочетанием генотипов *MTHFR1298AC* и *MTR2756AA*, что, возможно, маркирует повышенный риск развития данного заболевания. Однако у исследуемых с РМЖ генетических ассоциаций изучаемых нами полиморфизмов с заболеванием не выявлено. Индивидуальный генетический индекс (количество рискованных аллелей полиморфизма генов фолатного метаболизма) не показал влияния на развитие пролиферативного заболевания молочной железы, что может быть объяснено малым количеством наблюдений или популяционными особенностями.

3.1.2. Полиморфизм генов белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в зависимости от гистологического типа опухоли

При изучении полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных с инфильтративно-протоковой и инфильтративно-дольковой гистологическими формами РМЖ в сравнении с контролем статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов не выявлено (табл. 3.1.2.1.).

Таблица 3.1.2.1.

Частота аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных различными формами РМЖ

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)			P, χ^2	OR [95% CI:]
		КГ (n=142)	ипРМЖ (n=53)	идРМЖ (n=29)		
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C C/T T/T	66 (46,5) 64 (45,1) 12 (8,5)	30 (56,6) 17 (32,1) 6 (11,3)	18 (62,1) 9 (31,0) 2 (6,9)	0,26 ¹	1.50 [0.80 – 2.84]
					2,72	0.58 [0.30 – 1.12]
						1.38 [0.49 – 3.89]
	C T	196(0,690) 88 (0,310)	77 (0,726) 29 (0,274)	45 (0,776) 13 (0,224)	0,31 ²	1.88 [0.83 – 4.28]
					2,37	0.55 [0.23 – 1.29]
						0.80 [0.17 – 3.79]
					0,79 ³	1.25 [0.50 – 3.17]
					0,48	0.95 [0.36 – 2.53]
						0.58 [0.11 – 3.08]
<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A A/C C/C	75 (52,8) 47 (33,1) 20 (14,1)	25 (47,2) 22 (41,5) 6 (11,3)	13 (44,8) 11 (37,9) 5 (17,2)	0,49 ¹	1.19 [0.73 – 1.96]
					0,48	0.84 [0.51 – 1.38]
	A C	197(0,694) 87 (0,306)	72 (0,679) 34 (0,321)	37 (0,638) 21 (0,362)	0,19 ²	1.55 [0.80 – 3.03]
					1,70	0.64 [0.33 – 1.25]
					0,49 ³	1.30 [0.62 – 2.76]
					0,48	0.77 [0.36 – 1.62]

					0,29	1.20 [0.61 – 2.36]
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A A/G G/G	92 (64,8)	35 (66,0)	21 (72,4)	0,98 ¹	1.06 [0.54 – 2.05]
		44 (31,0)	16 (30,2)	8 (27,6)	0,04	0.96 [0.49 – 1.91]
		6 (4,2)	2 (3,8)	0 (0)		0.89 [0.17 – 4.55]
	A G	228(0,803) 56 (0,197)	86 (0,811) 20 (0,189)	50 (0,862) 8 (0,138)	0,47 ²	1.43 [0.59 – 3.45]
					1,53	0.85 [0.35 – 2.06]
						0.36 [0.02 – 6.49]
			0,54 ³	1.35 [0.50 – 3.64]		
			1,25	0.88 [0.32 – 2.40]		
				0.35 [0.02 – 7.52]		
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A A/G G/G	35 (24,6)	11 (24,6)	8 (27,6)	0,85 ¹	1.06 [0.60 – 1.86]
		71 (50,0)	25 (50,0)	15 (51,7)	0,04	0.95 [0.54 – 1.67]
		36 (25,4)	17 (25,4)	6 (20,7)		
	A G	141(0,496) 143(0,504)	47 (0,443) 59 (0,557)	31 (0,534) 27 (0,466)	0,29 ²	1.54 [0.69 – 3.42]
					1,11	0.65 [0.29 – 1.45]
					0,41 ³	1.45 [0.60 – 3.54]
			0,68	0.69 [0.28 – 1.68]		
			0,62 ¹	0.80 [0.37 – 1.72]		
			0,95	0.89 [0.47 – 1.68]		
		1.39 [0.70 – 2.77]				
		0,86 ²	1.16 [0.47 – 2.86]			
		0,31	1.07 [0.48 – 2.38]			
			0.77 [0.29 – 2.04]			
			0,52 ³	1.45 [0.51 – 4.16]		
			1,32	1.20 [0.48 – 2.97]		
				0.55 [0.19 – 1.61]		
				0,35 ¹	0.81 [0.52 – 1.26]	
				0,87	1.24 [0.79 – 1.94]	
				0,6 ²	1.16 [0.66 – 2.05]	
				0,28	0.86 [0.49 – 1.51]	
				0,26 ³	1.44 [0.76 – 2.74]	
				1,25	0.69 [0.36 – 1.32]	

Примечание: ¹ – сравнение пациентов с ипРМЖ и представителями КГ; ² – сравнение больных с идРМЖ и в КГ; ³ – отличия между больными с ипРМЖ и идРМЖ; ипРМЖ – инфильтративно-протоковый; идРМЖ – инфильтративно-дольковый.

Однако у больных со смешанным типом РМЖ в сравнении с контролем выявлено, что частота аллеля *MTHFR677T* (OR = 2,23, $\chi^2=6,41$, $p=0,01$) и генотипа *MTHFR677TT* (OR = 3,82, $\chi^2=7,56$, $p=0,02$) выше, а аллель *MTHFR677C* обладает протективным эффектом (OR=0,45, $\chi^2=6,41$, $p=0,01$). Также, у данных больных, аллель *MTHFR677T* встречался чаще в сравнении с редкими формами рака (OR=2,87, $\chi^2=4,50$, $p=0,03$) (табл. 3.1.2.2.).

Таблица 3.1.2.2.

Сравнительная частота аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных различными формами РМЖ

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)			P, χ^2	OR [95% CI:]
		КГ (n=142)	Смешанный (n=23)	Редкие формы (n=16)		
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C C/T T/T	66 (46,5) 64 (45,1) 12 (8,5)	6 (26,1) 11 (47,8) 6 (26,1)	8 (50,0) 7 (43,8) 1 (6,3)	0,02 ¹ 7,56	0.41 [0.15 – 1.09]
						1.12 [0.46 – 2.70]
						3.82 [1.27–11.52]
	C T	196 (0,690) 88 (0,310)	23 (0,500) 23 (0,500)	23 (0,719) 9 (0,281)	0,01 ¹ 6,41	0.35 [0.09 – 1.36]
						1.18 [0.33 – 4.25]
						5.29 [0.57–49.14]
						0.45 [0.24 – 0.84]
<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A A/C C/C	75 (52,8) 47 (33,1) 20 (14,1)	15 (65,2) 8 (34,8) 0 (0)	7 (43,8) 8 (50,0) 1 (6,3)	0,15 ¹ 3,81	1.68 [0.67 – 4.20]
						1.08 [0.43 – 2.72]
						0.13 [0.01 – 2.18]
	A C	197 (0,694) 87 (0,306)	38 (0,826) 8 (0,174)	22 (0,688) 10 (0,313)	0,35 ² 2,07	0.69 [0.25 – 1.97]
						2.02 [0.71 – 5.72]
						0.41 [0.05 – 3.25]
A/A A/G	92 (64,8) 44 (31,0)	14 (60,9) 9 (39,1)	9 (56,3) 7 (43,8)	0,25 ³ 2,74	0.41 [0.11 – 1.53]	
					1.88 [0.51 – 6.90]	
					4.55 [0.17–118.9]	
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A A/G	92 (64,8) 44 (31,0)	14 (60,9) 9 (39,1)	9 (56,3) 7 (43,8)	0,07 ¹ 3,39	2.10 [0.94 – 4.68]
						0.48 [0.21 – 1.06]
						0.97 [0.44 – 2.14]
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A A/G	92 (64,8) 44 (31,0)	14 (60,9) 9 (39,1)	9 (56,3) 7 (43,8)	0,94 ² 0,01	1.03 [0.47 – 2.27]
						0.46 [0.16 – 1.35]
						2.16 [0.74 – 6.28]
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A A/G	92 (64,8) 44 (31,0)	14 (60,9) 9 (39,1)	9 (56,3) 7 (43,8)	0,15 ³ 2,04	0.85 [0.34 – 2.09]
						1.43 [0.58 – 3.56]

	G/G	6 (4,2)	0 (0)	0 (0)		0.45 [0.02 – 8.20]
					0,46 ² 1,57	0.70 [0.25 – 1.99] 1.73 [0.61 – 4.95] 0.64 [0.03 – 11.8]
					0,96 ³ 0,08	0.83 [0.23 – 3.02] 1.21 [0.33 – 4.42] 1.42 [0.03–75.48]
	A G	228 (0,803) 56 (0,197)	37 (0,804) 9 (0,196)	25 (0,781) 7 (0,219)	0,98 ¹ 0,00	1.01 [0.46 – 2.21] 0.99 [0.45 – 2.17]
					0,77 ² 0,08	0.88 [0.36 – 2.13] 1.14 [0.47 – 2.77]
					0,8 ³ 0,06	0.87 [0.29 – 2.64] 1.15 [0.38 – 3.49]
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A A/G G/G	35 (24,6) 71 (50,0) 36 (25,4)	7 (30,4) 12 (52,2) 4 (17,4)	3 (18,8) 10 (62,5) 3 (18,8)	0,67 ¹ 0,80	1.34 [0.51 – 3.52] 1.09 [0.45 – 2.63] 0.62 [0.20 – 1.94]
					0,64 ² 0,90	0.71 [0.19 – 2.62] 1.67 [0.57 – 4.83] 0.68 [0.18 – 2.52]
					0,71 ³ 0,69	0.53 [0.11 – 2.46] 1.53 [0.42 – 5.61] 1.10 [0.21 – 5.74]
	A G	141 (0,496) 143 (0,504)	26 (0,565) 20 (0,435)	16 (0,500) 16 (0,500)	0,39 ¹ 0,75	1.32 [0.70 – 2.47] 0.76 [0.40 – 1.42]
					0,97 ² 0,00	1.01 [0.49 – 2.11] 0.99 [0.47 – 2.05]
					0,57 ³ 0,32	0.77 [0.31 – 1.90] 1.30 [0.53 – 3.22]

Примечание: ¹ – сравнение пациентов со смешанным РМЖ и представителями КГ; ² – сравнение больных с редкими формами РМЖ и КГ; ³ – отличия между больными со смешанным и редкими формами РМЖ. Жирным шрифтом выделены значимые различия частот.

Таким образом, в результате проведённого исследования было показано, что у больных со смешанным типом РМЖ частота носительства генотипа *MTHFR677TT* и аллеля *MTHFR677T* достоверно выше, чем в контроле, а у последнего и по сравнению с редкими формами РМЖ.

3.1.3. Полиморфизм генов белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в зависимости от молекулярного подтипа опухоли

При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ выявлено, что в сравнении с контролем у больных с

люминальным В подтипом генотип *MTHFR677TT* встречался чаще (OR=2,53, $\chi^2=6,72$, $p=0,03$), а генотип *MTHFR677CT* обладает протективным эффектом (OR=0,50, $\chi^2=4,24$, $p=0,03$). При сравнении между люминальными А и В подтипами наблюдались различия по частоте генотипа *MTHFR677CT* (OR=0,41, $\chi^2=4,26$, $p=0,03$) (табл. 3.1.3.1.).

Таблица 3.1.3.1.

Сравнительная частота аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных различными молекулярными подтипами РМЖ

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)			P, χ^2	OR [95% CI:]
		КГ (n=142)	Lum тип А (n=39)	Lum тип В (n=58)		
<i>MTHFR</i> (C677T)	С/С С/Т Т/Т	66 (46,5) 64 (45,1) 12 (8,4)	16 (41,0) 19 (48,7) 4 (10,3)	30 (51,7) 17 (29,3) 11 (19,0)	0,81 ¹ 0,40	0.80 [0.39 – 1.64] 1.15 [0.56 – 2.35] 1.23 [0.37 – 4.07]
					0,03² 6,72	1.23 [0.66 – 2.27] 0.50 [0.26 – 0.97] 2.53 [1.04 – 6.13]
					0,13 ³ 4,07	1.54 [0.67 – 3.49] 0.41 [0.17 – 0.97] 2.04 [0.60 – 6.97]
	С Т	196 (0,690) 88 (0,310)	51 (0,654) 27 (0,346)	77 (0,664) 39 (0,336)	0,54 ¹ 0,37	0.84 [0.49 – 1.44] 1.17 [0.69 – 2.00]
					0,60 ² 0,26	0.88 [0.55 – 1.40] 1.12 [0.71 – 1.78]
					0,88 ³ 0,02	0.39 [0.15 – 1.03] 0.95 [0.52 – 1.75]
	<i>MTHFR</i> (A1298C)	А/А А/С С/С	75 (52,8) 47 (33,1) 20 (14,1)	19 (48,7) 13 (33,3) 7 (18,0)	28 (48,3) 24 (41,4) 6 (10,3)	0,81 ¹ 0,40
0,49 ² 1,40						0.83 [0.45 – 1.53] 1.42 [0.76 – 2.67] 0.70 [0.26 – 1.85]
0,49 ³ 1,40						0.98 [0.43 – 2.21] 1.41 [0.60 – 3.29] 0.52 [0.16 – 1.70]
А С		197 (0,694) 87 (0,306)	51 (0,654) 27 (0,346)	80 (0,688) 36 (0,313)	0,50 ¹ 0,44	0.83 [0.49 – 1.41] 1.19 [0.70 – 2.03]
					0,93 ² 0,01	0.98 [0.61 – 1.56] 1.02 [0.63 – 1.62]
					0,60 ³ 0,27	1.17 [0.63 – 2.16] 0.85 [0.46 – 1.56]
<i>MTR</i> (A2756G)		А/А А/Г Г/Г	92 (64,8) 44 (31,0) 6 (4,2)	24 (61,5) 14 (35,9) 1 (2,6)	37 (63,8) 18 (31,0) 3 (5,2)	0,49 ¹ 1,43
	0,46 ²					0.95 [0.50 – 1.81]

					1,57	1.00 [0.51 – 1.93] 1.23 [0.29 – 5.11]
					0,96 ³ 0,08	1.10 [0.47 – 2.54] 0.80 [0.34 – 1.89] 2.07 [0.20 – 20.6]
	A G	228 (0,803) 56 (0,197)	62 (0,795) 16 (0,205)	92 (0,793) 24 (0,207)	0,87 ¹ 0,02	0.95 [0.51 – 1.77] 1.05 [0.56 – 1.95]
					0,82 ² 0,04	0.94 [0.55 – 1.60] 1.06 [0.62 – 1.81]
					0,97 ³ 0,01	0.98 [0.48 – 2.01] 1.01 [0.49 – 2.05]
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A A/G G/G	35 (24,6) 71 (50,0) 36 (25,4)	8 (20,5) 20 (51,3) 11 (28,2)	16 (27,6) 28 (48,3) 14 (24,1)	0,84 ¹ 0,32	0.78 [0.33 – 1.87] 1.05 [0.51 – 2.13] 1.15 [0.52 – 2.55]
					0,91 ² 0,18	1.16 [0.58 – 2.32] 0.93 [0.50 – 1.71] 0.93 [0.46 – 1.90]
					0,71 ³ 0,66	1.47 [0.56 – 3.88] 0.88 [0.39 – 1.99] 0.80 [0.32 – 2.03]
	A G	141 (0,496) 143 (0,504)	36 (0,462) 42 (0,538)	60 (0,517) 56 (0,483)	0,58 ¹ 0,29	0.86 [0.52 – 1.43] 1.15 [0.69 – 1.90]
					0,70 ² 0,14	1.08 [0.70 – 1.67] 0.92 [0.59 – 1.41]
					0,44 ³ 0,57	1.25 [0.70 – 2.22] 0.80 [0.45 – 1.42]

Примечание: ¹ – сравнение пациенток с люминальным А типом РМЖ и представителями КГ; ² – сравнение больных с люминальным В типом РМЖ и КГ; ³ – отличия между больными с люминальным (Lum) А и В типами РМЖ. Жирным шрифтом выделены значимые различия частот.

При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных с HER2-позитивным и базальным молекулярно-биологическими подтипами РМЖ выявлено, что в сравнении с контролем у больных с базальным подтипом РМЖ генотип *MTHFR677CT* обладает протективным эффектом (OR=0,26, $\chi^2=4,68$, p=0,03). При сравнении между HER2-позитивным и базальным подтипами наблюдались схожие различия по частоте генотипа *MTHFR677CT* (OR=0,11, $\chi^2=5,03$, p=0,02) (табл. 3.1.3.2.).

Сравнительная частота аллелей и генотипов полиморфизма генов белков фолатного цикла у больных с различными молекулярными подтипами РМЖ

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота генотипа, аллеля, n (%)			P, χ^2	OR [95% CI:]	
		КГ (n=142)	HER2+ (n=6)	Базальный (n=17)			
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C C/T T/T	66 (46,5) 64 (45,1) 12 (8,4)	2 (33,3) 4 (66,7) 0 (0)	12 (70,6) 3 (17,6) 2 (11,8)	0,52 ¹ 1,30	0.57 [0.10 – 3.24] 2.43 [0.43 – 13.7] 1.80 [0.20 – 16.2]	
					0,13 ² 4,07	2.76 [0.92 – 8.25] 0.26 [0.07 – 0.94] 1.44 [0.29 – 7.07]	
					0,07 ³ 5,21	4.80 [0.65 – 35.2] 0.11 [0.01 – 0.88] 0.80 [0.06 – 10.5]	
	C T	196 (0,690) 88 (0,310)	8 (0,667) 4 (0,333)	27 (0,794) 7 (0,206)	0,86 ¹ 0,02	0.89 [0.26 – 3.06] 1.11 [0.32 – 3.79]	
					0,21 ² 1,56	1.73 [0.72 – 4.12] 0.57 [0.24 – 1.37]	
					0,37 ³ 0,79	1.92 [0.44 – 8.30] 0.51 [0.12 – 2.23]	
	<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A A/C C/C	75 (52,8) 47 (33,1) 20 (14,1)	4 (66,7) 2 (33,3) 0 (0)	7 (41,2) 9 (52,9) 1 (5,9)	0,59 ¹ 1,05	1.78 [0.31 – 10.0] 1.01 [0.17 – 5.71] 1.01 [0.11 – 8.89]
						0,23 ² 2,86	0.62 [0.22 – 1.73] 2.27 [0.82 – 6.27] 0.38 [0.04 – 3.03]
						0,51 ³ 1,31	0.35 [0.04 – 2.46] 2.25 [0.32 – 15.7] 0.43 [0.02 – 8.03]
A C		197 (0,694) 87 (0,306)	10 (0,833) 2 (0,167)	23 (0,676) 11 (0,324)	0,30 ¹ 1,06	2.20 [0.47 – 10.3] 0.45 [0.09 – 2.11]	
					0,83 ² 0,04	0.92 [0.43 – 1.97] 1.08 [0.50 – 2.31]	
					0,29 ³ 1,07	0.41 [0.07 – 2.24] 2.39 [0.44 – 12.8]	
<i>MTR</i> (A2756G)		A/A A/G G/G	92 (64,8) 44 (31,0) 6 (4,2)	5 (83,3) 1 (16,7) 0 (0)	9 (52,9) 8 (47,1) 0 (0)	0,62 ¹ 0,94	2.71 [0.30 – 23.9] 0.44 [0.05 – 3.92] 3.77 [0.39 – 36.5]
						0,32 ² 2,25	0.61 [0.22 – 1.68] 1.97 [0.71 – 5.47] 1.41 [0.16 – 12.5]
						0,12 ³ 4,13	0.22 [0.02 – 2.35] 4.44 [0.42 – 46.5] 0.35 [0.01 – 6.56]
	A G	228 (0,803) 56 (0,197)	11 (0,917) 1 (0,083)	26 (0,765) 8 (0,235)	0,32 ¹ 0,95	2.70 [0.34 – 21.3] 0.37 [0.04 – 2.92]	
					0,60 ² 0,27	0.79 [0.34 – 1.85] 1.25 [0.53 – 2.91]	

					0,25 ³ 1,30	0.29 [0.03 – 2.65] 3.38 [0.37 – 30.3]
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A A/G G/G	35 (24,6)	0 (0)	5 (29,4)	0,37 ¹ 1,93	0.43 [0.05 – 3.67] 2.00 [0.35 – 11.2] 1.47 [0.25 – 8.37]
		71 (50,0)	4 (66,7)	10 (58,8)	0,46 ² 1,54	1.27 [0.41 – 3.86] 1.42 [0.51 – 3.96] 0.39 [0.08 – 1.80]
		36 (25,4)	2 (33,3)	2 (11,8)	0,22 ³ 2,99	2.91 [0.28 – 30.2] 0.71 [0.10 – 5.03] 0.26 [0.02 – 2.52]
	A G	141 (0,496)	4 (0,333)	20 (0,588)	0,26 ¹ 1,22	0.50 [0.14 – 1.72] 1.97 [0.58 – 6.69]
		143 (0,504)	8 (0,667)	14 (0,412)	0,31 ² 1,02	1.44 [0.70 – 2.98] 0.69 [0.33 – 1.42]
					0,12 ³ 2,30	2.85 [0.71 – 11.3] 0.35 [0.08 – 1.39]

Примечание: ¹ - сравнение пациентов с HER2+ подтипом РМЖ и представителями КГ; ² - сравнение больных с базальным подтипом РМЖ и КГ; ³ - отличия между больными с HER2+ и базальным подтипами РМЖ. Жирным шрифтом выделены значимые различия частот.

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что у больных с люминальным В подтипом РМЖ частота носительства генотипа *MTHFR677TT* достоверно выше, чем в контроле, а также наблюдались межтиповые различия по частоте генотипа *MTHFR677CT* как между люминальными А и В, так и HER2+ и базальным подтипами РМЖ.

3.1.4. Прогнозирование возникновения пролиферативных заболеваний молочной железы в зависимости от носительства генетического полиморфизма

Для оценки независимых факторов прогнозирования возникновения ПЗМЖ была использована бинарная логистическая регрессия. Проведенный логит-анализ для группы больных РМЖ не дал значимых результатов, а логистическая регрессия, проведенная на материале для пациенток с ДОМЖ, дала обнадеживающие результаты. Так, оценивалось влияние 2 факторов, показавших значимую частотную разницу: генотип *MTHFR1298AC* и аллель *MTR2756A*. Вклад факторов, включенных в модель, составляет 81,6%, причем положительная предсказуемая ценность 45,7%. Свободный член и коэффициент регрессии в

многофакторной модели прогнозирования развития ДОМЖ представлен в таблице 3.1.4.1.

О достаточно высокой достоверности данной математической модели, при построении итогового уравнения бинарной логистической регрессии, свидетельствует $\chi^2=13,24$ для 4 степеней свободы, при уровне значимости $p=0,0002$.

Таблица 3.1.4.1.

Свободный член и коэффициенты регрессии в многофакторной модели прогнозирования развития ДОМЖ в зависимости от изучаемого полиморфизма

Показатель	Оценка	Std. Error	z value	Pr(> z)	χ^2
B_0	-2.2931	0.6300	-3.640	0.000273**	13,2471
<i>MTHFR1298AC</i>	0.8145	0.3347	2.434	0.014939*	5,9282
<i>MTR2756A</i>	0.6562	0.3342	1.964	0.049583*	3,8555

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; B_0 – свободный член.

Итоговое уравнение вероятности развития ДОМЖ:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(0,8145x + 0,6562x) + 2,2931}};$$

где p - вероятность развития ДОМЖ, x - принимает значение 1 при наличии гетерозиготного генотипа *MTHFR1298AC* и аллели *MTR2756A*.

Таким образом, выявлена связь развития ДОМЖ с сочетанным носительством *MTHFR1298AC* и *MTR2756A*, модель прогнозирования вероятности наступления заболевания представлена в виде уравнения. Многофакторный статистический ROC-анализ полиморфизма генов фолатного обмена позволил нам выявить 2 статистически достоверных предиктора ДОМЖ, с помощью которых можно формировать группы риска.

Итоги исследования генетического полиморфизма генов белков фолатного обмена *MTHFR*(C677T), *MTHFR*(A1298C), *MTR*(A2756G) и *MTRR*(A66G) свидетельствуют об отсутствии явной ассоциации отдельных генотипов и аллелей полиморфизма основных белков фолатного цикла с риском развития рака молочной железы, однако, выявлено, что носительство аллеля *MTHFR*677T (OR=2,23) и генотипа *MTHFR*677TT (OR=3,82) ассоциировано со смешанным типом РМЖ. У больных ДОМЖ в Забайкальском крае отмечалась высокая частота носительства аллеля *MTR*2756A (OR=1,98) и генотипа *MTHFR*1298AC (OR=2,40).

Комбинация генотипов *MTHFR*1298AC x *MTR*2756AA, и ее аддитивный эффект, представляют особый интерес и могут быть связаны со значительным риском развития изучаемой патологии. Индивидуальный генетический индекс в группах сравнения (у больных РМЖ и ДОМЖ) практически не отличался от его показателей в контрольной группе ($p > 0,05$).

3.2. Концентрация аминотиолов у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

3.2.1. Концентрация аминотиолов в сыворотке у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

По данным нашего исследования у больных ПЗМЖ относительно контрольной группы в сыворотке крови при исследовании тиолов отмечался незначительный дисбаланс в сторону увеличения общей концентрации гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина. При исследовании концентрации тиолов в сыворотке крови у пациентов с ДОМЖ отмечалось увеличение содержания гомоцистеина до 8,7 [7,7-9,9] ($p < 0,02$) и снижение цистеинилглицина ($p < 0,002$), а у больных РМЖ - повышение уровня гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина ($p < 0,00002$), в сравнении с контролем (табл. 3.2.1.1).

Таблица 3.2.1.1.

Содержание тиолов в сыворотке крови у больных ПЗМЖ и контрольной группы, Ме [P25-P75], мкмоль/л

Группы	Цистеин	Гомо- цистеин	Глутатион	Цистеинил- глицин	Глутамил- цистеин
КГ (n=142)	212,6 [167,7-264,8]	8,0 [7,3-9,1]	3,1 [2,6-3,8]	43,2 [32,5-53,9]	3,2 [2,4-3,9]
ДОМЖ (n=60)	198,0 [153,0-245,6]	8,7 [7,7-9,9] ¹	3,3 [2,7-4,0]	35,3 [26,2-48,3] ²	3,0 [2,3-3,8]
РМЖ (n=122)	209,9 [165,3-274,3]	9,6 [8,6-10,8] ^{3,4}	3,8 [3,3-4,4] ^{3,4}	46,0 [33,9-57,2] ⁴	3,8 [3,1-4,9] ^{3,4}
ПЗМЖ (n=182)	201,5 [162,6-263,5]	9,2 [8,2-10,6] ³	3,7 [3,1-4,3] ²	42,2 [31,1-53,3]	3,5 [2,7-4,3] ¹

Примечание (u-тест) – ¹ - $p < 0,05$, ² - $p < 0,002$, ³ - $p < 0,00002$ при сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых; ⁴ - $p < 0,005$ при сравнении в группах исследуемых с РМЖ и ДОМЖ.

В сыворотки крови больных ДОМЖ старших возрастных групп 40-49 и 60-69 лет, по сравнению с контролем, отмечается снижение уровня цистеина в 1,2 и 1,6 раз, цистеинилглицина в 1,3 и 1,4 ($p < 0,05$) и глутамилцистеина в 1,3 раза, соответственно. Также наблюдается незначительное повышение уровня гомоцистеина – среди лиц в возрасте 30-39 лет - в 1,1 раза ($p < 0,05$). В группе больных с РМЖ изменения уровня сывороточных тиолов, в сравнении с контрольными показателями, отмечались в возрастных группах 40-49 и 50-59 лет, где было повышено содержание гомоцистеина в 1,1 и 1,3 раза, а также глутатиона в 1,2 и 1,5 раза ($p < 0,0001$), соответственно. У последних, лиц 50-59 лет, а также 30-39-летних уровень глутамилцистеина превышал в 1,3 раза контрольные значения ($p < 0,0001$). При сравнении содержания сывороточных тиолов между подгруппами достоверные отличия отмечались только в возрастной категории 50-69 лет, где у больных РМЖ концентрация цистеина в 1,4 раза, гомоцистеина и глутатиона в 1,3 раза, цистеинилглицина в 1,5 раз, а глутамилцистеина в 1,25-1,5 раза была выше относительно соответствующего показателя в группе с ДОМЖ ($p < 0,05$) (табл. 3.2.1.2.).

Таблица 3.2.1.2.

Содержание тиолов в сыворотке крови исследуемых групп, относительно возраста, Ме [P25; P75], мкмоль/л

Возраст (лет)	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеин-глицин	Глутамил-цистеин
КГ (n=142)					
30-39 (n=19)	187,3 [152,4;256,4]	8,1 [7,3;9,2]	3,3 [2,8;4,0]	42,6 [32,9;53,6]	3,1 [2,2;3,7]
40-49 (n=57)	216,7 [181,6;257,1]	8,2 [7,6;9,0]	3,1 [2,7;3,6]	46,5 [38,6;56,5]	3,5 [3,0;4,4]
50-59 (n=53)	206,6 [172,1;263,7]	7,2 [6,4;7,8]	2,6 [2,2;2,8]	39,5 [28,7;46,9]	3,1 [2,2;3,6]
60-69 (n=13)	234,4 [222,1;290,8]	8,3 [7,6;11,9]	3,0 [2,7;4,9]	47,1 [45,5;57,7]	3,6 [2,9;4,0]
ПЗМЖ (n=182)					
30-39 (n=36)	198,6 [143,9;253,9]	8,9 [8,3;10,4] ¹	3,5 [3,0;3,8]	46,3 [31,1;53,2]	3,7 [2,6;4,6]
40-49 (n=41)	187,4 [152,8;223,1] ¹	8,8 [7,9;9,9]	3,5 [2,7;4,2]	37,6 [26,4;49,1] ¹	3,2 [2,5;3,8] ¹
50-59 (n=72)	220,2 [171,0;263,2]	9,3 [8,0;10,4] ²	3,8 [3,0;4,2] ²	42,9 [33,8;58,2]	3,9 [2,8;4,7]
60-69 (n=33)	189,8 [158,5;285,6]	9,9 [8,8;11,7]	4,1 [3,4;4,6]	43,7 [32,6;52,7]	3,6 [3,0;5,3]
ДОМЖ (n=60)					
30-39 (n=25)	198,6 [168,4;264,8]	9,1 [8,2;11,3] ¹	3,5 [2,9;4,1]	45,6 [31,0;51,4]	3,5 [2,3;4,1]
40-49 (n=20)	184,4 [146,6;212,7] ¹	8,5 [7,3;9,2]	3,2 [2,5;3,8]	35,4 [28,2;49,0] ¹	2,7 [2,3;3,8] ¹
50-59 (n=10)	243,1 [203,6;263,0]	7,6 [6,9;8,5] ³	2,9 [2,6;3,4] ³	33,8 [26,7;40,4] ³	3,2 [2,2;3,4] ³
60-69 (n=5)	146,4 [135,9;161,3] ^{1,3}	8,8 [7,7;11,5]	3,6 [2,9;4,2]	33,5 [25,3;37,6] ¹	2,6 [2,2;2,9] ³
РМЖ (n=122)					
30-39 (n=11)	208,5 [138,9;238,0]	8,6 [8,2;8,9]	3,5 [3,3;3,6]	47,6 [30,3;58,3]	4,1 [3,1;5,5] ²
40-49 (n=21)	198,8 [155,1;271,4]	8,8 [8,6;10,2] ²	3,6 [3,3;4,4] ²	41,8 [26,4;51,2]	3,3 [2,9;4,0]
50-59 (n=62)	208,6 [167,9;263,1]	9,6 [8,6;10,4] ²	3,9 [3,4;4,3] ²	50,1 [38,5;60,3]	4,0 [3,1;4,9] ²
60-69 (n=28)	198,4 [162,7;294,9]	9,9 [8,9;11,7]	4,0 [3,5;4,7]	46,0 [32,6;53,7]	3,9 [3,1;5,7]

Примечание (U-тест): ¹ - p<0,05, ² - p<0,0001 при сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых исследуемых; ³ - p<0,05 при сравнении между группами с ДОМЖ и РМЖ.

При изучении концентрации тиолов относительно стадии РМЖ оказалось, что у лиц на I стадии уровень гомоцистеина ($p=0,0002$) и глутатиона ($p=0,01$) превышает нормальные значения (в 1,2 раза). У обследуемых II и III стадии помимо рассматриваемых выше тиолов (гомоцистеина и глутатиона) был выше и уровень глутамилцистеина (в 1,2 раза, $p<0,0001$), чем в КГ. При расчетах ввиду малочисленности 0 и IV групп (включавшие три и две женщины, соответственно), полученные результаты по данным группам не учитывались. Однако при сравнении между собой IIА и IIВ (в 1,2 раза, $p=0,04$) и IIВ и IIIВ (в 1,3 раза, $p=0,03$) стадиями РМЖ был отмечен рост и снижение содержания цистеинилглицина, соответственно. Также содержание общего цистеина и глутамилцистеина на IIВ стадии в крови выше чем на I (в 1,2 раза, $p=0,03$) (табл. 3.2.1.3.).

Таблица 3.2.1.3.

Содержание тиолов в сыворотке крови больных РМЖ на разных клинических стадиях ($n=122$), Ме [P25-P75], мкмоль/л

Стадия	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеин-глицин	Глутамил-цистеин	
КГ ($n=142$)	212,6 [167,7-264,8]	8,0 [7,3-9,1]	3,1 [2,6-3,8]	43,2 [32,5-53,9]	3,2 [2,4-3,9]	
I ($n=23$)	198,8 [152,9;222,2]	9,7 ¹ [8,5;10,8]	3,8 ¹ [3,0;4,2]	44,3 [31,0;57,5]	3,5 [3,0;4,5]	
II	A ($n=49$)	214,1 [158,6;310,0]	9,8 [8,4;11,1]	4,0 [3,3;4,6]	43,2 [33,4;53,7]	3,5 [3,0;5,3]
	B ($n=16$)	244,2 ⁴ [189,7;319,7]	9,5 [9,1;10,7]	3,9 [3,6;4,2]	52,8 ² [44,5;65,5]	4,3 ⁴ [3,7;6,1]
	A+B ($n=65$)	222,2 [168,7;311,5]	9,6 ¹ [8,6;11,0]	3,9 ¹ [3,3;4,5]	46,0 [34,4;54,7]	3,9 ¹ [3,2;5,7]
III	A ($n=12$)	214,4 [173,8;293,3]	9,4 [8,7;10,7]	3,9 [3,3;4,6]	44,8 [34,2;58,0]	4,0 [2,8;4,9]
	B ($n=11$)	195,8 [167,9;314,6]	10,5 [8,7;13,0]	3,6 [2,9;4,7]	39,7 ³ [21,1;51,2]	3,8 [3,1;5,1]
	C ($n=6$)	225,5 [184,8;238,6]	9,2 [8,7;9,7]	3,9 [3,6;4,1]	57,5 [48,7;60,0]	4,5 [3,8;4,7]
	A+B+C ($n=29$)	214,7 [179,6;280,3]	9,6 ¹ [8,7;11,5]	3,7 ¹ [3,4;4,6]	46,7 [34,8;58,5]	4,0 ¹ [3,1;4,9]

Примечание: (u-тест) – ¹ - $p<0,05$, относительно соответствующего показателя в КГ; ² - $p<0,05$, относительно соответствующего показателя на предыдущей стадии; ³ - $p<0,05$ при сравнении между IIВ и IIIВ стадиями РМЖ; ⁴ - $p<0,05$ при сравнении между I и IIВ стадиями РМЖ.

Анализируя показатели тиолов в сыворотке крови больных РМЖ, относительно гистологического типа опухоли, обнаруживается, что при сравнении с контролем, в группах больных с ИПР и ИДР, а также смешанным и редкими формами рака, значимо повышен уровень гомоцистеина на 8-22,5%, глутатиона на 12,9-32,2% и глутамилцистеина 12,5-34,3%, соответственно. При этом наибольшая концентрация данных тиолов была в группе с редкими формами рака. Также наблюдались и межтиповые различия: уровень цистеинилглицина у больных ИДР, смешанным и с редкими формами рака был выше на 22,3% ($p=0,007$), 11,4% ($p=0,02$) и 32,4% ($p=0,008$), соответственно, чем у больных с наиболее часто встречаемым при РМЖ типом – ИПР. Среди всех изучаемых гистологических типов РМЖ наименьшая концентрация сывороточного гомоцистеина (ниже на 10,3-12,6%) наблюдалась в группе со смешанным раком, и отличалась от других типов (ИПР, ИДР и редких форм) ($p<0,05$). Также стоит отметить превышение в 1,2 раза (17%) ($p=0,04$) уровня глутатиона в группе с ИДР по сравнению со смешанным типом рака. Между уровнем сывороточного цистеина и морфологическими изменениями молочной железы у больных с РМЖ ассоциаций не выявлено (табл. 3.2.1.4.).

Таблица 3.2.1.4.

Содержание тиолов в сыворотке крови у больных РМЖ, относительно гистологического типа опухоли, (Ме [P25-P75]), мкмоль/л

Гистотип	Цистеин	Гомо-цистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин	Глутамил-цистеин
КГ (n=142)	212,6 [167,7-264,8]	8,0 [7,3-9,1]	3,1 [2,6-3,8]	43,2 [32,5-53,9]	3,2 [2,4-3,9]
ИПР (n=53)	197,2 [159,3-310,0]	9,6 ⁴ [8,7-12,1]	3,8 ² [3,2-4,4]	41,3 [24,4-52,2]	3,4 ¹ [2,7-4,5]
ИДР (n=29)	238,6 [184,8-291,9]	9,7 ³ [8,8-10,6]	4,1 ³ [3,6-4,3]	50,5 ⁵ [35,6-60,0]	4,3 ² [3,5-5,8]
Смешанный (n=24)	216,6 [173,4-271,4]	8,7 ¹ [8,2-9,8]	3,5 ^{1,6} [3,2-4,1]	46,0 ⁵ [38,5-58,9]	3,6 ¹ [3,0-4,6]
Редкие формы (n=16)	200,7 [149,5-234,4]	9,8 ² [8,8-11,1]	4,0 ¹ [3,4-4,7]	54,7 ^{1,5} [42,2-60,9]	4,3 ¹ [3,3-4,8]

Примечание: (u-тест) - ¹ - $p<0,05$, ² - $p<0,001$, ³ - $p<0,0001$, ⁴ - $p<0,000001$ при сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых исследуемых; ⁵ - $p<0,05$ при сравнении с соответствующим показателем в группе с ИПР; ⁶ - $p<0,05$ при сравнении между группами с ИДР и смешанным типом РМЖ.

В сыворотке крови больных с люминальным А и В, а также базальным и HER2neu+ молекулярно-биологическим подтипами РМЖ, также как среди пациентов с различными морфологическими формами, повышен уровень гомоцистеина на 16,2-28,7%, глутатиона на 16,1-41,9% и глутамилцистеина 25,8-41,9% в сравнении с контролем ($p < 0,05$). При этом максимальные значения концентрации данных тиолов наблюдались в группе с HER2neu+ подтипом рака. Были и межтиповые отличия по уровню цистеина и глутатиона ($p = 0,02$) у больных с люминальным А, а также концентрации последнего ($p = 0,002$) у пациенток с HER2neu+ типом, в сравнении с группой больных с наиболее часто встречаемым люминальным В типом РМЖ. Между уровнем сывороточного цистеинилглицина и иммуногистохимическими изменениями молочной железы у больных с РМЖ ассоциаций не выявлено (табл. 3.2.1.5.).

Таблица 3.2.1.5.

Содержание тиолов в сыворотке крови у больных РМЖ, относительно молекулярно-биологического подтипа опухоли, (Ме [P25-P75]), мкмоль/л

Подтип	Цистеин	Гомо-цистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин	Глутамил-цистеин
КГ (n=142)	211,5 [167,4-265,9]	8,0 [7,2-9,1]	3,1 [2,6-3,7]	43,1 [32,3-53,8]	3,2 [2,4-3,9]
Люминальный А (n=39)	193,4 [167,9-231,3]	9,8 ⁴ [8,6-11,5]	4,1 ³ [3,4-4,6]	51,7 [34,4-61,5]	4,1 ² [3,1-5,1]
Люминальный В (n=58)	235,6 ⁵ [173,4-311,4]	9,3 ⁴ [8,4-10,6]	3,6 ^{5,2} [3,2-4,1]	44,3 [31,5-54,3]	3,9 ² [3,0-4,6]
Базальный (n=17)	191,0 [135,1-292,6]	9,6 ¹ [7,9-10,4]	4,1 ¹ [3,1-4,6]	41,3 [33,0-47,1]	3,2 [2,7-3,5]
HER2 + (n=6)	273,7 [205,1-357,4]	10,3 ² [9,8-11,7]	4,4 ² [4,2-5,2]	54,2 [44,6-63,3]	4,4 ¹ [3,5-4,9]

Примечание (u-тест) – ¹ - $p < 0,05$, ² - $p < 0,001$, ³ - $p < 0,0001$, ⁴ - $p < 0,000001$ при сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых исследуемых; ⁵ - $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем в группе с люминальным типом А.

При изучении уровня сывороточных тиолов в зависимости от отягощенности патологией сердечно-сосудистой системы у больных РМЖ была отмечена более высокая концентрация цистеинилглицина и глутамилцистеина, как среди лиц, отягощённых (в 1,6 ($p = 0,0001$) и 1,5 ($p = 0,002$) раза), так и не отягощённых (в 1,3 ($p = 0,008$) и 1,5 ($p = 0,03$) раза) заболеваниями ССС, в

сравнении с соответствующими показателями у пациенток с ДОМЖ, соответственно. Также у больных РМЖ с заболеваниями ССС отличался уровень глутатиона ($p=0,006$) и глутамилцистеина ($p=0,03$), превышая соответствующий показатель в 1,2 раза, в сравнении больными из этой же группы, но без патологии ССС. Наблюдалась аналогичная ситуация и при сравнении концентрации тиолов в общей группе больных ПЗМЖ, где помимо содержания глутатиона ($p=0,009$) и глутамилцистеина ($p=0,001$), отличался и уровень цистеинилглицина ($p=0,007$), также в 1,2 раза. Заболевания ССС у больных с ДОМЖ не влияли на уровень изучаемых сывороточных аминотиолов (табл. 3.2.1.6.).

Таблица 3.2.1.6.

Содержание тиолов в сыворотке крови исследуемых групп, относительно сердечно-сосудистых заболеваний, Me [P25-P75], мкмоль/л

Группы	Цистеин	Гомо-цистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин	Глутамил-цистеин
Группы с заболеваниями ССС					
ДОМЖ (n=23)	241,4 [153,0-305,0]	9,0 [7,7-13,0]	3,6 [3,0-4,2]	30,5 ¹ [23,6-33,8]	2,6 ¹ [2,2-3,9]
РМЖ (n=85)	213,5 [168,0-273,1]	9,7 [8,6-10,9]	4,0 [3,4-4,5]	47,7 [37,6-57,7]	3,9 [3,2-4,9]
ПЗМЖ (n=108)	215,6 [167,9-276,7]	9,7 [8,5-11,1]	4,0 [3,4-4,5]	44,3 [34,1-56,5]	3,9 [3,2-4,7]
Группы без заболеваний ССС					
ДОМЖ (n=37)	178,0 [132,0-216,2]	9,2 [8,5-13,5]	3,7 [3,0-4,3]	30,1 ¹ [12,9-40,8]	2,4 ¹ [2,0-3,5]
РМЖ (n=37)	193,3 [155,1-275,6]	8,9 [8,6-10,5]	3,6 ² [2,9-4,0]	39,5 [27,2-54,3]	3,6 ² [2,4-4,7]
ПЗМЖ (n=74)	190,4 [141,7-272,7]	9,1 [8,6-11,0]	3,7 ³ [3,0-4,1]	35,1 ³ [23,6-49,4]	3,1 ³ [2,1-4,2]

Примечание (u-тест): - $p<0,05$ при сравнении соответствующих показателей между лицами отягощёнными и не отягощёнными наличием заболеваний ССС: – ¹ в группах с РМЖ и ДОМЖ; – ² в группе больных РМЖ; – ³ в общих группах (ПЗМЖ).

При изучении взаимосвязей между концентрациями тиолов в сыворотке крови в контрольной группе была найдена прямая корреляционная связь различной силы между всеми изучаемыми тиолами ($p<0,01$). В группе больных ДОМЖ были найдены умеренные отрицательные связи между уровнем гомоцистеина и количеством цистеинилглицина ($R=-0,4$; $p<0,01$), а также глутамилцистеина ($R=-0,4$; $p=0,02$). Причем, концентрация последних

(цистеинилглицина и глутамилцистеина) имели сильную положительную связь между собой ($R=0,7$; $p<0,00002$). Среди больных с РМЖ выявлены средние прямые связи концентрации глутамилцистеина с количеством цистеина ($R=0,5$; $p=0,0000001$), гомоцистеина ($R=0,3$; $p=0,0008$), глутатиона ($R=0,4$; $p=0,00004$) и цистеинилглицина ($R=0,7$; $p=0,0000001$), а также между содержанием цистеина и цистеинилглицина ($R=0,3$; $p=0,003$) и гомоцистеина ($R=0,2$; $p=0,01$). Уровень глутатиона был связан умеренной прямой связью с количеством гомоцистеина ($R=0,5$; $p=0,0000001$) и цистеинилглицина ($R=0,4$; $p=0,00001$) (табл. 3.2.1.7.).

Таблица 3.2.1.7.

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрациями тиолов сыворотки крови в изучаемых группах

	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин
КГ (n=142)				
Гомоцистеин	0,3 p=0,0003			
Глутатион	0,2 p=0,007	0,9 p=0,0000001		
Цистеинил-глицин	0,8 p=0,0000001	0,6 p=0,0000001	0,6 p=0,0000001	
Глутамил-цистеин	0,6 p=0,0000001	0,5 p=0,0000001	0,4 p=0,000002	0,8 p=0,0000001
ДОМЖ (n=60)				
Гомоцистеин	-0,2 p=0,28			
Глутатион	0,1 p=0,71	0,2 p=0,39		
Цистеинил-глицин	0,3 p=0,16	-0,4 p=0,01	0,04 p=0,81	
Глутамил-цистеин	0,2 p=0,20	-0,4 p=0,02	0,1 p=0,43	0,7 p=0,00002
РМЖ (n=122)				
Гомоцистеин	0,2 p=0,01			
Глутатион	0,1 p=0,32	0,5 p=0,0000001		
Цистеинил-глицин	0,3 p=0,003	-0,02 p=0,8	0,4 p=0,00001	
Глутамил-цистеин	0,5 p=0,0000001	0,3 p=0,0008	0,4 p=0,00004	0,7 p=0,0000001

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

При корреляционном анализе обнаружена разнонаправленная зависимость уровня экспрессии иммуногистохимических маркеров и концентрации тиолов в сыворотке, причем в случае с онкопротеином HER2-neu прямая с гомоцистеином ($R=0,2$; $p=0,03$) и глутатионом ($R=0,19$; $p=0,04$), а с антигеном Ki-67 связь была прямая с цистеином ($R=0,19$; $p=0,04$) и обратная с гомоцистеином ($R=-0,24$; $p=0,03$) и глутатионом ($R=-0,22$; $p=0,02$). Другие ИГХ-маркеры не ассоциировались с содержанием тиолов в крови (табл. 3.2.1.8.).

Таблица 3.2.1.8.

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией тиолов сыворотки крови и уровнем экспрессии маркеров ИГХ у больных РМЖ

	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин	Глутамил-цистеин
Ki 67	0,19 p=0,04	-0,24 p=0,03	-0,22 p=0,02	-0,14 p=0,14	-0,10 p=0,25
HER2-neu	0,12 p=0,19	0,20 p=0,03	0,19 p=0,04	-0,04 p=0,60	0,10 p=0,26
ER	0,01 p=0,91	-0,03 p=0,71	-0,15 p=0,09	0,03 p=0,72	0,09 p=0,30
PgR	-0,07 p=0,43	-0,05 p=0,56	- 0,09 p=0,34	0,05 p=0,57	0,07 p=0,44

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

Таким образом, при исследовании содержания аминотиолов в сыворотке крови пациенток с ПЗМЖ, отмечался явный дисбаланс с увеличением концентрации гомоцистеина, причем у больных РМЖ присутствовало также повышение глутатиона и глутамилцистеина, а у пациентов с ДОМЖ и снижение цистеинилглицина, в сравнении с контролем. Пик различий концентрации тиолов в сыворотке крови среди больных ПЗМЖ (максимум) пришелся на возрастную категорию женщин 40–59 лет. В зависимости от возраста в группах концентрация не менялась, а вот при сравнении между группами больных РМЖ и ДОМЖ в 50–69 лет достоверно отличалась. Различия по уровню гомоцистеина относительно контроля, наблюдались у больных ДОМЖ 30–39 лет, а у пациенток с РМЖ 40–59 лет.

У больных с различными гистотипами (ИПР, ИДР, смешанного и редких форм) и молекулярно-биологическими подтипами (люминальным А и В, базальным и HER2neu+) РМЖ наблюдался более высокий уровень сывороточных тиолов, а именно гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина, относительно контроля. При этом максимальные значения концентрации данных тиолов наблюдались в группе с редкими формами рака и HER2neu+ подтипом РМЖ.

Отягощенность сопутствующей патологией со стороны сердечно-сосудистой системы у больных РМЖ оказывала влияние на уровень изучаемых тиолов в сыворотке (глутатиона и глутамилцистеина), а у больных ДОМЖ такой связи не наблюдалось, в сравнении с соответствующими больными без патологии ССС. Однако, наблюдавшиеся межгрупповые различия (между больными с РМЖ и ДОМЖ) по концентрации сывороточных тиолов (цистеинилглицина и глутамилцистеина) были независимы от патологии ССС.

3.2.2. Концентрация аминотиолов в опухолевой ткани молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

При исследовании тиолов в опухолевой ткани молочной железы у больных ПЗМЖ (как доброкачественными, так и злокачественными) наблюдались достоверные различия с контролем в отношении концентраций глутатиона и глутамилцистеина, превышающие у больных РМЖ в 16,6 и 1,6 раза, а у пациенток с ДОМЖ в 9 и 2 раза, соответственно. Причем у последних больных также наблюдались изменения уровня цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина, который превышал в 2-3 раза соответствующий показатель как в контроле, так и в группе с РМЖ ($p < 0,05$) (табл. 3.2.2.1.). Большинство показателей содержания тиолов в ткани молочной железы у больных ПЗМЖ сопоставимо с аналогичными у подгрупп разных возрастных категорий. Однако стоит отметить у больных РМЖ 40-49 лет трехкратное превышение уровня цистеинилглицина, в сравнении с группой 30-39 лет ($p < 0,05$). Сравнение проводилось только внутри исследуемых подгрупп больных ввиду малочисленности группы контроля (16 женщин), где о статистической достоверности результата говорить сложно (табл. 3.2.2.2.).

Таблица 3.2.2.1.

Содержание аминокислот в опухолевой ткани молочной железы в группах сравнения (Me [P25; P75]), нмоль/мг

Группы	Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомоцистеин	Глутамил-цистеин
Контроль (n=16)	313,9 [196,2;685,3]	25,0 [7,4;44,6]	1,4 [0,6;3,2]	5,7 [3,4;7,7]	2,7 [1,2;5,2]
ДОМЖ (n=60)	939,2 ² [436,6;1385,4]	61,9 ² [31,7;119,8]	12,7 ² [4,3;33,7]	11,9 ² [6,0;23,0]	5,6 ² [3,7;9,6]
РМЖ (n=122)	345,2 ¹ [147,0;704,1]	25,9 ¹ [15,4;58,3]	23,3 ² [7,2;109,6]	6,0 ¹ [3,9;12,9]	4,3 ² [2,5;9,8]
ПЗМЖ (n=182)	402,8 [163,8;847,7]	31,8 [15,8;71,3]	19,9 ³ [6,3;71,8]	6,4 [4,0;14,7]	4,8 ² [2,7;9,6]

Примечание: (u-тест) ¹ - p<0,05 при сравнении между группами с РМЖ и ДОМЖ; ² - p<0,05; ³ - p<0,0000001 при сравнении относительно соответствующего показателя в группе контроля.

Таблица 3.2.2.2.

Содержание тиолов в опухолевой ткани в группах сравнения относительно возраста, Me [P25; P75], нмоль/мг

Возраст (лет)	Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомоцистеин	Глутамил-цистеин
ДОМЖ (n=60)					
30-39 (n=25)	852,7 [333,8;1355,6]	61,6 [23,6;99,9]	12,9 [6,4;14,7]	16,4 [9,6;18,5]	4,6 [3,7;8,0]
40-49 (n=20)	712,9 [266,3;1155,2]	76,9 [33,1;109,5]	65,1 [4,3;1272,6]	7,6 [3,1;40,8]	3,3 [2,4;41,8]
50-59 (n=10)	1428,9 [511,3;1437,9]	62,1 [31,7;87,6]	16,6 [7,4;33,7]	8,5 [7,2;12,6]	6,1 [3,5;7,2]
60-69 (n=5)	551,5 [436,6;894,0]	44,3 [32,7;49,6]	2,6 [1,4;5,9]	7,5 [2,3;12,3]	4,0 [2,7;153,1]
РМЖ (n=122)					
30-39 (n=11)	430,8 [323,0;783,5]	13,8 [6,7;18,3]	3,4 [2,7;7,8]	7,4 [5,0;11,4]	3,4 [2,8;5,1]
40-49 (n=21)	520,6 [120,1;968,2]	40,6 ¹ [14,3;88,2]	20,3 [6,2;197,8]	6,1 [4,2;31,2]	6,5 [3,2;10,6]
50-59 (n=62)	359,6 [186,6;651,0]	38,2 [19,8;71,8]	39,5 [9,0;111,4]	6,4 [3,9;20,6]	4,0 [2,9;13,2]
60-69 (n=28)	251,3 [135,4;476,6]	22,0 [15,8;43,2]	47,5 [11,2;107,9]	5,8 [3,0;8,9]	3,4 [2,1;6,5]

Примечание: (u-тест) ¹ - p<0,05, относительно соответствующего показателя предыдущей возрастной группы.

Анализ содержания аминотиолов в опухолевой ткани больных РМЖ на разных клинических стадиях показал существенные отличия. Критерием Краскела – Уоллиса установлено, что в опухолевой ткани молочной железы больных с различными стадиями РМЖ, а также морфологически неизменной ткани группы контроля наблюдаются различия по содержанию глутатиона ($H=29,51$, $p=0,00001$; $\chi^2=18,37$, $p=0,0004$) и глутамилцистеина ($H=13,18$, $p=0,004$; $\chi^2=7,55$, $p=0,05$). Так, концентрация глутатиона достоверно превышала контрольные значения в 17,3, 23,2 и 15,5 раза, соответственно при I, II и III стадиях РМЖ. Схожие изменения наблюдались относительно содержания глутамилцистеина, только уже среди больных IIВ (в 1,3 раза) и III (в 3,1 раза) стадии РМЖ, причем концентрация данного тиола у последних (на III стадии) существенно выше, чем на II стадии, в 2,3 раза и имела максимальное значение среди всех стадий для этого показателя. Необходимо отметить, что ввиду малочисленности подгрупп с 0 и IV стадией рака молочной железы (включавшие три и две женщины, соответственно), полученные результаты по данным группам при расчетах не учитывались (табл. 3.2.2.3.).

Таблица 3.2.2.3.

Содержание тиолов в опухолевой ткани больных РМЖ на разных клинических стадиях, нмоль/мг

Стадия РМЖ		Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомоцистеин	Глутамил-цистеин
Контроль (n=16)		313,9 [196,2;685,3]	25,0 [7,4;44,6]	1,4 [0,6;3,2]	5,7 [3,4;7,7]	2,7 [1,2;5,2]
I (n=23)		350,2 [156,6;699,6]	31,4 [19,1;54,1]	24,2 [8,8;117,3] ³	6,2 [4,3;11,4]	3,7 [2,5;7,2]
II	A (n=49)	281,6 [138,5;421,9]	23,0 [15,7;50,0]	47,8 [8,0;168,6] ³	4,8 [2,6;7,4]	3,9 [1,6;7,3]
	B (n=16)	508,5 [326,2;789,6]	52,7 [15,6;84,9] ³	9,9 [3,9;33,0] ³	6,5 [3,3;15,7]	3,6 [2,8;13,4] ³
	A+B (n=65)	333,6 [141,5;600,0]	27,9 [15,7;62,2]	32,5 [4,3;109,6] ³	5,1 [3,0;8,8]	3,7 [1,9;8,3]
III	A (n=12)	719,2 [376,5;819,6]	40,6 [20,8;88,2]	19,4 [9,4;45,2] ³	6,1 [4,2;16,5]	6,9 [5,2;10,7] ³
	B (n=11)	334,4 [148,9;636,1]	45,7 [21,7;76,9]	205,6 [16,1;79,6] ³	31,0 [14,7;56,4] ³	25,2 [11,1;88,7] ³
	C (n=6)	482,5 [86,2;951,6]	16,3 [13,2;28,2]	38,7 [9,4;241,6] ³	5,0 [3,6;9,0]	6,5 [4,9;8,8]
	A+B+C (n=29)	636,2 [148,9;851,4]	33,3 [18,3;76,9]	21,7 [9,4;299,9] ³	11,9 [4,2;31,2]	8,5 [5,2;27,7] ^{1,2,3}
Критерий Краскелла - Уоллеса		H = 0,73 df = 3; p = 0,86	H = 2,04; df = 3; p = 0,56	H = 29,51; df = 3; p = 0,00001	H = 4,21; df = 3; p = 0,23	H = 13,18; df = 3; p = 0,004
Медианный Тест		$\chi^2 = 0,86$; p = 0,83	$\chi^2 = 0,09$; p = 0,99	$\chi^2 = 18,37$; p = 0,0004	$\chi^2 = 3,42$; p = 0,33	$\chi^2 = 7,55$; p = 0,05

Примечание: (u-тест) – ¹ - p<0,05 - относительно соответствующего показателя на I стадии; ² - p<0,005 - относительно соответствующего показателя на предыдущей стадии; ³ - p<0,05 - при сравнении относительно соответствующего показателя в группе контроля; df - число степеней свободы; жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

При исследовании концентрации тиолов опухолевой ткани МЖ у больных РМЖ с различным гистологическим типом, было выявлено явное превышение уровня глутатиона в 12-30 раз ($p < 0,05$), с максимальным значением у больных со смешанным типом рака, относительно данного показателя в нормальной ткани МЖ. Также наблюдались значимые отличия и уровня глутамилцистеина, где у лиц с инфильтративно-протоковым РМЖ он был в 1,5 раза выше в сравнении с контролем (табл. 3.2.2.4.).

Таблица 3.2.2.4.

Содержание тиолов опухолевой ткани у больных с различными гистологическими типами РМЖ, Me [P25; P75], нмоль/мг

Гистотип	Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомо-цистеин	Глутамил-цистеин
Контроль (n=16)	313,9 [196,2;685,3]	25,0 [7,4;44,6]	1,4 [0,6;3,2]	5,7 [3,4;7,7]	2,7 [1,2;5,2]
ИПР (n=53)	420,0 [194,5;783,5]	30,8 [17,2;66,1]	19,9 ⁴ [4,0;60,0]	7,5 [3,9;14,7]	4,0 ¹ [2,1;10,6]
ИДР (n=29)	294,3 [105,4;651,0]	20,8 [12,5;44,5]	17,1 ³ [7,8;77,4]	5,6 [3,2;11,9]	5,0 [2,7;6,6]
Смешанный (n=24)	281,5 [137,7;636,2]	20,8 [11,3;62,2]	42,3 ³ [16,1;121,2]	5,5 [4,1;8,3]	4,2 [2,4;11,1]
Редкие формы (n=16)	340,6 [147,0;650,9]	25,3 [22,1;49,6]	38,4 ² [5,1;121,2]	5,8 [2,9;9,9]	3,1 [2,7;7,2]

Примечание: (u-тест) – ¹ - $p < 0,05$, ² - $p < 0,0001$, ³ - $p < 0,00001$, ⁴ - $p < 0,0000001$ при сравнении относительно соответствующего показателя в группе контроля.

При исследовании концентрации тиолов опухолевой ткани МЖ у больных с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ, было выявлено превышение уровня глутатиона в 10,5 - 27 раз ($p < 0,05$), с максимальным значением у больных с базальным типом рака, относительно данного показателя в контроле. Самый высокий уровень глутатиона определялся в группе базального подтипа (37,8 нмоль/мг), самый низкий – в HER2-позитивном подтипе (14,8 нмоль/мг) по сравнению со средним уровнем всей выборки (23,3 нмоль/мг). Также наблюдалась более высокая концентрация глутамилцистеина (в 1,9 раза, $p = 0,01$) в группе лиц с люминальным В подтипом РМЖ в сравнении с контролем (табл. 3.2.2.5.).

Таблица 3.2.2.5.

Содержание тиолов опухолевой ткани у больных с различными молекулярно-биологическими типами РМЖ, Ме [P25; P75], нмоль/мг

Подтип	Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомо-цистеин	Глутамил-цистеин
КГ (n=16)	313,9 [196,2;685,3]	25,0 [7,4;44,6]	1,4 [0,6;3,2]	5,7 [3,4;7,7]	2,7 [1,2;5,2]
Люминальный А (n=39)	311,8 [153,0-701,9]	25,4 [15,7-52,2]	17,1 ⁴ [8,0-72,5]	6,1 [4,3-11,9]	3,9 [2,1-9,2]
Люминальный В (n=58)	440,7 [142,7-851,4]	34,6 [15,4-72,7]	27,5 ⁴ [9,4-121,2]	5,9 [4,0-16,4]	5,1 ¹ [2,5-10,3]
Базальный (n=17)	194,5 [147,0-421,9]	25,0 [17,2-31,9]	37,8 ³ [10,6-94,6]	6,0 [3,3-7,2]	5,1 [2,0-7,3]
HER2 (+) (n=6)	317,4 [148,9-614,6]	25,5 [16,7-39,8]	14,8 ¹ [1,9-147,7]	7,1 [3,2-31,1]	2,8 [2,0-7,1]

Примечание: (u-тест) – ¹ - $p < 0,05$, ² - $p < 0,0001$, ³ - $p < 0,00001$, ⁴ - $p < 0,0000001$ при сравнении относительно соответствующего показателя в группе контроля.

При изучении уровня тиолов в образцах опухолевой ткани МЖ у пациенток с ПЗМЖ (как с ДОМЖ, так и РМЖ) с отягощенностью патологией сердечно-сосудистой системы и без таковой, отличий не выявлено. Однако при межгрупповом сравнении такая связь отмечалась, и у больных с ДОМЖ в сравнении с РМЖ, уровень цистеина превышал в 3 раза ($p=0,01$) в обоих случаях (как в группах с отягощенностью, так и без нее). Схожие данные были получены и в отношении цистеинилглицина, но превышение концентрации было двукратным, а уровень достоверности был вероятным ($p=0,05$). При сравнении общих групп ПЗМЖ у лиц без заболеваний ССС отмечались более высокие концентрации гомоцистеина ($p=0,03$) и глутамилцистеина ($p=0,01$) в 1,3 и 1,6 раза соответственно, в сравнении с больными имевшими отягощенность по данной патологии (табл. 3.2.2.6.).

Таблица 3.2.2.6.

Содержание тиолов в опухолевой ткани в группах сравнения, относительно заболеваний ССС, Ме [P25; P75], нмоль/мг

Группы	Цистеин	Цистеинил-глицин	Глутатион	Гомоцистеин	Глутамилцистеин
С заболеваниями ССС					
ДОМЖ (n=23)	894,0 [511,3;1321,4]	60,8 [32,7;87,6]	16,6 [2,6;53,8]	11,4 [7,2;12,6]	3,9 [2,7;6,1]
РМЖ (n=85)	315,6 ¹ [145,4;716,0]	27,1 ⁴ [15,8;56,1]	23,3 [7,7;71,8]	5,8 [3,2;10,3]	3,9 [2,2;7,2]
ПЗМЖ (n=108)	348,3 [148,9;795,6]	31,7 [16,2;60,8]	22,5 [7,4;71,1]	6,0 [3,7;11,6]	3,9 [2,4;7,2]
Без заболеваний ССС					
ДОМЖ (n=37)	984,4 [407,9;1385,4]	88,4 [23,6;134,5]	12,4 [5,9;14,7]	12,8 [5,9;22,9]	7,2 [4,2;9,6]
РМЖ (n=37)	359,6 ² [186,6;651,0]	38,2 ⁴ [19,8;71,8]	39,5 [9,0;111,4]	6,4 ⁴ [3,9;20,6]	4,0 ⁴ [2,9;13,2]
ПЗМЖ (n=74)	437,4 [224,6;863,9]	31,9 [14,8;102,3]	14,7 [4,2;121,3]	7,8 ³ [4,6;23,2]	6,5 ³ [3,2;14,3]

Примечание (u-тест): ¹ - $p < 0,05$ при сравнении групп РМЖ и ДОМЖ отягощённых наличием заболеваний ССС; ² - $p < 0,05$ при сравнении групп РМЖ и ДОМЖ не отягощённых наличием заболеваний ССС; ³ - $p < 0,05$ при сравнении общих групп (ПЗМЖ) отягощённых и не отягощённых наличием заболеваний ССС; ⁴ - $p = 0,05$.

При расчете коэффициента корреляции Спирмена у здоровых участниц исследования выявлены положительные связи средней и высокой силы между общей концентрацией цистеина и содержанием глутатиона ($R=0,5$; $p=0,04$), гомоцистеина и глутамилцистеина ($R=0,6$; $p=0,01$), а также между уровнем глутатиона и содержанием гомоцистеина ($R=0,7$; $p=0,003$), глутамилцистеина ($R=0,8$; $p=0,0004$) и цистеинилглицина ($R=0,5$; $p=0,02$). Причем содержание последнего коррелировало и со значением гомоцистеина ($R=0,7$; $p=0,004$).

В группе больных ДОМЖ обнаружены сильные прямые связи между содержанием цистеина и уровнем гомоцистеина ($R=0,6$; $p=0,001$), цистеинилглицина ($R=0,7$; $p=0,00007$) и глутамилцистеина ($R=0,7$; $p=0,0003$). Причем содержание двух последних тиолов коррелировало как между собой ($R=0,6$; $p=0,003$), так и с концентрацией гомоцистеина.

При сравнении концентрации изучаемых аминотиолов в опухолевой ткани среди больных РМЖ найдена корреляционная зависимость слабой и средней силы

между всеми тиолами, за исключением связи между глутатионом и гомоцистеином. Наблюдалась и отрицательная связь между уровнем цистеина и глутатиона ($R=-0,3$; $p=0,007$) (табл. 3.2.2.7.). Также, в данной группе важно отметить прямую зависимость размера опухолей с содержанием глутамилцистеина в опухолевой ткани МЖ ($R=0,2$; $p=0,03$).

Таблица 3.2.2.7.

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией тиолов ткани молочной железы в изучаемых группах

	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин
Контроль (n=16)				
Гомоцистеин	0,6 p=0,01			
Глутатион	0,5 p=0,04	0,7 p=0,003		
Цистеинил-глицин	0,4 p=0,12	0,7 p=0,004	0,5 p=0,02	
Глутамил-цистеин	0,6 p=0,01	0,4 p=0,09	0,8 p=0,0004	0,3 p=0,24
ДОМЖ (n=60)				
Гомоцистеин	0,6 p=0,001			
Глутатион	0,2 p=0,30	0,2 p=0,27		
Цистеинил-глицин	0,7 p=0,00007	0,7 p=0,00001	0,3 p=0,11	
Глутамил-цистеин	0,7 p=0,0003	0,5 p=0,01	0,36 p=0,06	0,6 p=0,003
РМЖ (n=122)				
Гомоцистеин	0,4 p=0,000002			
Глутатион	-0,3 p=0,007	0,1 p=0,18		
Цистеинил-глицин	0,7 p=0,0000001	0,5 p=0,0000001	0,3 p=0,006	
Глутамил-цистеин	0,3 p=0,0009	0,6 p=0,0000001	0,3 p=0,0005	0,4 p=0,000008

* Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

Таким образом, анализ данных по содержанию тиолов в образцах опухолевой ткани МЖ показал у больных ПЗМЖ достоверные различия, как относительно контроля, так и между подгруппами (РМЖ и ДОМЖ). В обеих

подгруппах наблюдалось более высокое содержание глутатиона и глутамилцистеина, а у пациенток с ДОМЖ также и цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина, уровень которых превышал соответствующий показатель как в контроле, так и в группе с РМЖ ($p < 0,05$).

При исследовании концентрации тиолов опухолевой ткани МЖ у больных РМЖ наблюдались схожие различия как относительно гистологического, так и молекулярно-биологического типа, где был выявлен более высокий уровень глутатиона среди всех форм, с максимумом при смешанном гистотипе и базальном подтипе РМЖ, а также более высокая концентрация глутамилцистеина у больных с инфильтративно-протоковым РМЖ и с люминальным В подтипом РМЖ, относительно данного показателя в контрольной группе.

Клинические стадии РМЖ, а также такие факторы как возраст и отягощенность патологией сердечно-сосудистой системы не оказывали значимого влияния на уровень тканевых аминотиолов в образцах опухоли МЖ больных ПЗМЖ. Также стоит отметить наличие корреляционной зависимости в основном средней силы между содержанием всех изучаемых тиолов в ткани МЖ как у больных ПЗМЖ, так и в контроле.

3.2.3. Взаимосвязь концентрации тиолов в сыворотке крови и ткани молочной железы у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

Изучение корреляционных взаимосвязей между значениями маркеров нарушения фолатного обмена в сыворотке и ткани молочной железы в исследуемых группах показало, что в КГ выявлена положительная корреляционная связь между концентрацией глутамилцистеина в ткани МЖ и сывороточным уровнем глутатиона ($R=0,5$; $p < 0,05$), а также гомоцистеина ($R=0,6$; $p < 0,05$). В группе больных РМЖ выявлена положительная корреляционная связь между концентрациями цистеинилглицина с цистеином в ткани МЖ и гомоцистеина с глутатионом ($R=0,2$; $p < 0,05$) в сыворотке, соответственно. В группе больных с ДОМЖ взаимосвязей не выявлено (табл. 3.2.3.1.).

Таблица 3.2.3.1.

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией тиолов сыворотки крови и ткани молочной железы в изучаемых группах

Ткань	Сыворотка				
	Цистеин	Гомо- цистеин	Глутатион	Цистеин- глицин	Глутамил- цистеин
Контроль (n=16)					
Цистеин	0,2 p=0,43	0,2 p=0,50	0,2 p=0,49	0,1 p=0,59	0,1 p=0,59
Гомоцистеин	-0,1 p=0,63	0,1 p=0,81	0,1 p=0,84	-0,2 p=0,57	-0,2 p=0,57
Глутатион	-0,2 p=0,36	0,4 p=0,15	0,4 p=0,16	-0,1 p=0,69	-0,1 p=0,69
Цистеинил- глицин	0,2 p=0,49	0,2 p=0,47	0,2 p=0,41	0,2 p=0,52	0,2 p=0,52
Глутамил- цистеин	0,1 p=0,74	0,5 p=0,02	0,5 p=0,02	0,3 p=0,33	0,3 p=0,33
PMЖ (n=122)					
Цистеин	-0,004 p=0,96	0,2 p=0,03	0,1 p=0,23	0,1 p=0,52	0,1 p=0,19
Гомоцистеин	-0,03 p=0,70	0,1 p=0,31	0,2 p=0,10	-0,1 p=0,34	-0,1 p=0,45
Глутатион	0,1 p=0,55	-0,1 p=0,28	-0,1 p=0,59	0,1 p=0,46	-0,01 p=0,89
Цистеинил- глицин	-0,1 p=0,35	0,2 p=0,04	0,2 p=0,03	0,1 p=0,23	0,1 p=0,35
Глутамил- цистеин	-0,0009 p=0,99	0,01 p=0,87	0,1 p=0,41	-0,1 p=0,19	-0,1 p=0,55
ДОМЖ (n=60)					
Цистеин	-0,04 p=0,84	0,1 p=0,70	0,1 p=0,53	-0,1 p=0,54	0,1 p=0,63
Гомоцистеин	-0,1 p=0,47	0,1 p=0,51	0,1 p=0,60	-0,03 p=0,86	-0,1 p=0,79
Глутатион	0,3 p=0,18	0,3 p=0,14	0,01 p=0,93	-0,03 p=0,86	0,1 p=0,78
Цистеинил- глицин	-0,2 p=0,36	0,3 p=0,11	0,3 p=0,14	-0,2 p=0,24	-0,03 p=0,86
Глутамил- цистеин	-0,2 p=0,24	0,3 p=0,17	0,1 p=0,47	-0,1 p=0,51	-0,1 p=0,55

* Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

Таким образом, у больных PMЖ показатели метаболизма фолатного обмена опухолевой ткани MЖ, а именно цистеин и цистеинилглицин, коррелируют с сывороточным содержанием гомоцистеина и глутатиона, соответственно; в

группе с ДОМЖ значимых корреляций не обнаружено. В контроле, среди изучаемых аминотиолов в неизменной ткани МЖ, концентрация глутамилцистеина имела достоверную связь с уровнем глутатиона и гомоцистеина в сыворотке крови.

3.3. Носительство генетического полиморфизма и концентрация тиолов у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

3.3.1. Взаимосвязь носительства отдельного полиморфизма генов фолатного обмена и аминотиолов в сыворотке и ткани молочной железы

При изучении уровня тиолов сыворотки крови в зависимости от носительства генетических вариантов изучаемых полиморфизмов в контрольной группе у носителей мутантного гомозиготного генотипа *MTHFR1298CC* и *MTR2756GG* выявлено повышение уровня цистеина в 1,2 и 1,3 раза, соответственно ($p < 0,05$), по сравнению с соответствующими значениями у обладателей нормального генотипа. В группе больных с ДОМЖ среди носителей рискового аллеля *MTHFR677T* ($p = 0,02$), а также в группе с РМЖ у обладателей аллеля *MTR2756G* ($p = 0,02$), выявлена положительная ассоциация с более высоким уровнем (в 1,2 раза) сывороточного глутатиона и гомоцистеина, соответственно, в отличие от носителей нормального аллеля этих SNP.

При сравнении концентрации тиолов в группе больных с ДОМЖ и соответствующим показателем в контроле, наблюдались как более низкие значения в случае с цистеинилглицином у носителей аллеля *MTHFR677C* и *MTR2756A* (в 1,3 раза; $p < 0,001$), а также цистеина при *MTR2756G* (в 1,5 раза; $p < 0,05$), так и более высокие, например, гомоцистеина у обладателей *MTRR66G* и *MTHFR1298A*, причем у последних совместно с глутатионом (в 1,1 раза; $p < 0,001$). Вероятная тенденция к снижению уровня глутамилцистеина и цистеинилглицина, а также к повышению глутатиона, наблюдалась у обладателей следующих генотипов *MTHFR677CC*, *MTHFR1298AA* и *MTRR66AA* ($p < 0,1$). Стоит отметить и вероятное повышение уровня гомоцистеина ($p < 0,1$) у обладателей генотипа *MTRR66GG*, как в подгруппе больных ДОМЖ, так и среди здоровых.

При изучении концентрации сывороточных тиолов у больных с РМЖ, в сравнении с контрольной группой, достоверно выявлен более высокий уровень гомоцистеина и глутатиона у носителей аллелей *MTHFR677C*, *MTHFR1298A*, *MTR2756A* и *MTRR66A* с максимальным отличием в 1,3 раза у обладателей последнего ($p < 0,05$). Из числа минорных аллелей аналогичным эффектом в отношении уровня гомоцистеина обладали – *MTRR66G* и *MTHFR677T* ($p < 0,001$). Также среди больных РМЖ наблюдались более высокие концентрации в сравнении с контролем и глутамилцистеина, у носителей аллелей *MTHFR677C*, *MTHFR1298A*, *MTR2756A* и *MTRR66G*, превышающие в 1,1-1,3 раза с наибольшим процентом отличия у последнего ($p < 0,001$).

При сравнении содержания тиолов в сыворотке больных (РМЖ и ДОМЖ) носителей одноименных аллелей одного полиморфизма, также были выявлены различия, причем у больных РМЖ наблюдалась более высокая концентрация сразу нескольких изучаемых аминотиолов: при носительстве аллеля *MTHFR677C* – уровня гомоцистеина и глутатиона, при *MTHFR1298A* – цистеина, при *MTR2756A* – глутатиона, а при всех вышеперечисленных – цистеинилглицина и глутамилцистеина. В данной группе, также отмечены различия по содержанию глутамилцистеина и гомоцистеина при обладании *MTRR66G* и *MTHFR677T*, соответственно (табл. 3.3.1.1.).

При изучении содержания аминотиолов опухолевой ткани в зависимости от носительства генетических вариантов изучаемых полиморфизмов, также была показана достоверная связь. Так, в группе больных с ДОМЖ у обладателей полиморфного маркера *MTRR66AA* и *MTHFR1298AA* наблюдалась более высокая концентрация гомоцистеина в образцах ткани МЖ в 4,8 и 2,4 раза соответственно, в сравнении с носителями минорного аллеля этих SNP. При этом носительство аллеля *MTRR66G* коррелировало со снижением гомоцистеина в 3,2 раза ($p < 0,05$), относительно больных – носителей нормального генотипа данного полиморфизма. В группе больных с РМЖ у носителей аллеля *MTR2756G* наблюдался в 1,5 раза выше уровень гомоцистеина относительно нормального аллеля ($p < 0,05$). При сравнении концентрации аминотиолов в образцах

опухолевой ткани молочной железы в группах, среди больных РМЖ у носителей аллелей, всех изучаемых полиморфизмов (677С, 677Т, 1298А и 1298С аллели *MTHFR*; 2756А и 2756G аллели *MTR*; 66А и 66G аллели *MTRR*), отмечены в 2-4 раза более низкие значения цистеина и цистеинилглицина, а также гомоцистеина но только уже при наличии аллелей *MTHFR*1298А, *MTR*2756А и *MTRR*66А ($p < 0,05$) в сравнении с соответствующим показателем в группе с ДОМЖ носителей одноименных аллелей. При сравнении полученных значений в контрольной группе носителей различных аллелей изучаемых полиморфизмов генов фолатного метаболизма значимых отличий не выявлено (табл. 3.3.1.2.).

При изучении уровня тиолов сыворотки крови у больных различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ в зависимости от носительства генетических вариантов изучаемых полиморфизмов, в группе с люминальным А типом у носителей гетерозиготного генотипа *MTR*2756AG выявлено более высокий уровень гомоцистеина (в 1,2 раза, $p = 0,03$), по сравнению с соответствующим значением у обладателей нормального генотипа. В группе больных с люминальным В типом среди носителей рискованного генотипа *MTHFR*1298CC выявлена ассоциация с более высоким уровнем (в 1,6 раза, $p = 0,03$) сывороточного цистеина, а также у обладателей аллеля *MTR*2756G с концентрацией сывороточного цистеинилглицина (в 1,3 раза, $p = 0,03$) и глутамилцистеина (в 1,2 раза, $p = 0,04$), в отличие от носителей нормального аллеля и генотипа этих SNP. Также, в данной группе больных с люминальным В типом РМЖ, была показана связь носительства генотипа *MTHFR*677ТТ со снижением содержания глутамилцистеина в 1,2 раза ($p = 0,01$), относительно больных – носителей мажорного генотипа данного полиморфизма (табл. 3.3.1.3.).

Таблица 3.3.1.1.

Содержание тиолов в сыворотке крови у носителей различных аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма,
(Ме [P25; P75]) мкмоль/л

Полиморфизм	Аллель	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинилглицин	Глутамилцистеин
КГ (n=142)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	222,1 [173,3;276,3]	8,3 [7,5;9,3]	3,2 [2,7;3,9]	44,3 [36,9;55,0]	3,4 [2,7;3,9]
	TT	209,8 [171,5;254,0]	7,5 [6,3;8,7]	2,6 [2,1;3,5]	36,5 [29,1;53,0]	2,9 [2,3;4,0]
	CT+TT	198,6 [165,9;249,9]	7,9 [6,8;8,8]	3,0 [2,5;3,7]	40,6 [29,7;52,7]	3,1 [2,3;4,0]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	213,6 [167,9;249,9]	8,0 [7,2;8,9]	3,0 [2,6;3,7]	43,0 [32,0;54,7]	3,3 [2,4;4,1]
	CC	256,9 [181,9;314,8] ⁴	8,5 [6,8;11,0]	3,2 [2,4;7,3]	45,7 [36,2;58,2]	3,2 [2,6;3,6]
	AC+CC	210,0 [164,8;280,1]	8,0 [7,1;9,2]	3,1 [2,5;3,9]	43,7 [32,5;53,7]	3,2 [2,4;3,8]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	215,2 [167,9;278,3]	8,3 [7,3;9,2]	3,2 [2,6;3,9]	44,5 [35,2;54,1]	3,3 [2,6;3,9]
	GG	291,5 [263,7;342,5] ⁴	8,7 [5,7;15,9]	3,5 [1,8;9,9]	51,3 [29,7;70,2]	3,4 [2,6;5,5]
	AG+GG	204,5 [162,2;249,7]	7,8 [6,8;8,7]	3,0 [2,4;3,4]	38,6 [29,9;52,1]	2,9 [2,3;3,8]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	218,1 [171,9;285,5]	7,7 [6,8;8,9]	2,9 [2,4;3,6]	42,6 [29,9;54,7]	3,3 [2,3;4,1]
	GG	203,2 [167,1;283,4]	8,7 [7,4;9,7]	3,2 [2,8;3,7]	43,2 [37,0;51,2]	3,2 [2,6;3,7]
	AG+GG	207,2 [166,9;249,9]	8,1 [7,3;9,1]	3,1 [2,7;3,7]	43,3 [32,9;52,6]	3,2 [2,5;3,8]
ДОМЖ (n=60)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	202,6 [175,3;240,9]	8,5 [7,6;9,3]	3,1 [2,5;3,7]	33,6 [25,3;41,1] ²	2,9 [2,1;3,6]
	TT	139,0 [123,1;216,2]	7,9 [7,8;8,8]	3,2 [3,1;3,5]	30,4 [30,2;49,1]	2,4 [2,3;3,8]
	CT+TT	190,4 [138,1;256,8]	9,1 [7,8;10,1] ²	3,7 [3,0;4,2] ^{1,4}	35,2 [25,9;49,1]	3,2 [2,2;3,8]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	171,9 [139,9;243,1] ¹	8,8 [8,0;11,4] ²	3,5 [3,0;4,3] ¹	32,5 [17,7;48,3] ¹	2,6 [2,1;3,8]
	CC	224,0 [196,8;248,9]	8,1 [6,0;10,5]	3,3 [2,3;8,0]	45,8 [31,7;60,2]	3,0 [2,4;3,6]
	AC+CC	200,6 [176,8;255,6]	8,8 [7,4;9,7]	3,3 [2,6;3,8]	36,8 [27,4;48,8]	3,1 [2,3;3,9]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	198,2 [153,2;248,9]	8,8 [7,7;10,8]	3,3 [2,6;3,9]	35,2 [25,5;48,5] ²	2,9 [2,1;3,8]
	AG	196,6 [139,9;243,1] ¹	8,9 [7,9;9,8]	3,6 [3,0;4,2]	33,6 [30,1;49,2]	2,9 [2,3;3,8]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	202,6 [183,4;243,1]	8,7 [7,2;9,8]	3,8 [2,9;4,2]	37,1 [28,0;49,4]	3,5 [2,2;3,9]
	GG	198,6 [139,9;264,8]	9,9 [9,1;13,2] ²	4,0 [2,3;5,0]	39,2 [22,9;62,6]	3,2 [1,9;4,2]
	AG+GG	193,4 [146,1;248,9]	8,8 [7,7;10,1]	3,3 [2,6;4,0]	33,5 [25,5;47,7]	2,9 [2,2;3,8]

PMЖ (n=122)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	201,5 [155,1;291,9]	9,5 [8,6;10,6] ^{2,5}	3,9 [3,5;4,4] ^{2,6}	46,7 [32,6;54,8] ⁵	3,9 [3,1;4,7] ^{1,6}
	TT	197,1 [159,3;280,3]	9,6 [8,9;10,0] ^{1,5}	3,8 [2,4;4,2]	42,6 [27,5;47,8]	3,3 [2,9;4,2]
	CT+TT	214,1 [168,8;272,3]	9,8 [8,5;11,0]	3,8 [3,2;4,4]	45,6 [35,0;59,3]	3,8 [3,1;5,1]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	214,7 [168,0;273,1] ⁵	9,5 [8,6;10,7] ³	3,8 [3,3;4,3] ²	46,2 [35,1;60,8] ⁵	4,0 [3,0;5,1] ^{1,5}
	CC	198,4 [167,9;291,9]	9,7 [8,4;21,6]	4,0 [3,3;4,4]	34,4 [31,5;53,7]	4,0 [2,7;4,6]
	AC+CC	199,4 [158,8;293,4]	9,7 [8,6;11,4]	3,9 [3,3;4,5]	45,3 [31,7;53,1]	3,9 [3,1;4,5]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	205,1 [159,3;272,7]	9,4 [8,4;10,4] ¹	3,8 [3,3;4,3] ^{1,5}	45,3 [32,6;58,2] ⁵	3,8 [3,0;5,0] ^{1,6}
	GG	245,0 [168,7;321,4]	9,3 [8,7;9,9]	3,9 [3,6;4,2]	65,7 [49,7;81,7]	5,1 [3,9;6,4]
	AG+GG	211,9 [165,7;290,3]	10,0 [8,8;12,9] ⁴	4,0 [3,5;4,6]	48,0 [35,0;55,4]	4,1 [3,2;4,7]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	233,7 [160,8;297,1]	9,4 [8,5;10,6] ²	3,7 [3,3;4,4] ¹	42,7 [29,1;55,2]	3,6 [2,9;5,1]
	GG	214,4 [180,6;311,4]	9,8 [8,7;12,7] ¹	3,7 [3,2;4,2]	52,3 [35,6;58,5]	4,2 [3,3;4,9] ^{2,5}
	AG+GG	205,7 [162,8;271,4]	9,6 [8,6;11,0]	3,9 [3,3;4,4]	46,7 [34,4;57,5]	4,0 [3,1;4,9]

Примечание: (U-тест) - ¹ p<0,05, ² p<0,001, ³ p<0,0001 - достоверность различий между группами больных ДОМЖ и РМЖ, носителей изучаемых аллелей и группой здоровых исследуемых; ⁴ p<0,05 - достоверность различий внутри группы исследуемых, носителей изучаемых аллелей; ⁵ p<0,05, ⁶ p<0,001 - достоверность различий между группами больных ДОМЖ и РМЖ, носителей изучаемых аллелей.

Таблица 3.3.1.2.

Содержание тиолов в ткани молочной железы у носителей различных аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма,
(Ме [P25; P75]) нмоль/мг

Полиморфизм	Аллель	Цистеин	Цистеинилглицин	Глутатион	Гомоцистеин	Глутамилцистеин
Контроль (n=16)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	299,9 [218,4;484,1]	32,9 [7,7;46,5]	1,2 [0,6;3,4]	6,1 [3,0;7,2]	2,6 [1,6;4,4]
	TT	650,1 [174,1;1270,2]	17,0 [5,2;42,4]	1,6 [0,4;3,0]	5,5 [3,8;8,2]	2,8 [1,0;5,5]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	264,4 [170,5;1610,2]	16,2 [5,4;38,9]	1,4 [0,4;4,9]	5,8 [3,2;7,3]	1,9 [1,0;5,6]
	CC	299,9 [218,4;327,8]	42,7 [7,7;46,5]	1,2 [0,6;1,9]	5,7 [3,0;10,3]	1,7 [1,6;4,4]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	661,2 [170,5;984,2]	25,4 [7,5;62,1]	2,5 [1,2;4,8]	5,9 [4,1;7,3]	3,6 [1,8;5,2]
	GG	299,9 [218,4;484,1]	32,9 [7,2;42,7]	0,8 [0,6;1,9]	5,7 [2,2;10,3]	1,7 [1,3;7,5]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	679,2 [88,3;1270,2]	18,6 [1,9;35,3]	1,1 [0,2;2,0]	4,4 [0,6;8,2]	2,6 [0,3;4,9]
	GG	299,9 [218,4;650,1]	42,4 [9,7;42,7]	1,8 [1,2;3,0]	5,8 [5,7;10,3]	5,5 [1,6;7,5]
ДОМЖ (n=60)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	936,5 [360,9;1370,5]	59,9 [19,2;122,9]	13,5 [2,9;49,5]	12,0 [6,3;23,9]	5,4 [2,7;9,6]
	TT	939,2 [511,3;1428,9]	74,6 [44,3;102,3]	11,1 [5,9;16,7]	11,0 [6,0;23,0]	5,6 [3,7;9,3]
	CT+TT	939,2 [511,3;1428,9]	74,6 [44,3;102,3]	11,1 [5,9;16,7]	11,0 [6,0;23,0]	5,6 [3,7;9,3]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	132,5 [436,6;1682,2]	99,9 [49,6;126,0]	12,9 [5,9;30,7]	17,9 [8,5;32,0]	7,2 [4,0;9,8]
	CC	852,7 [407,9;1344,8]	60,9 [21,8;93,0]	12,4 [3,9;41,9]	7,5 [5,2;16,4] ¹	4,2 [2,7;8,7]
	AC+CC	852,7 [407,9;1344,8]	60,9 [21,8;93,0]	12,4 [3,9;41,9]	7,5 [5,2;16,4]	4,2 [2,7;8,7]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	918,6 [422,3;1407,2]	61,3 [26,8;109,9]	12,7 [6,1;32,1]	10,5 [5,6;18,2]	5,6 [3,6;9,6]
	AG	108,6 [714,9;1321,4]	95,4 [49,6;126,0]	8,6 [2,6;41,9]	17,6 [8,5;32,0]	5,6 [3,7;9,3]
	AG+GG	108,6 [714,9;1321,4]	95,4 [49,6;126,0]	8,6 [2,6;41,9]	17,6 [8,5;32,0]	5,6 [3,7;9,3]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	133,1 [511,3;1428,9]	113,0 [87,6;214,7]	14,8 [12,4;30,3]	29,0 [12,8;70,3]	7,4 [5,1;9,8]
	GG	984,4 [436,6;1437,9]	60,8 [44,3;62,1]	13,9 [3,9;53,8]	6,0 [2,3;12,6] ¹	4,0 [3,7;5,6]
	AG+GG	873,4 [422,3;1370,5]	59,3 [22,7;97,7]	8,3 [4,0;37,9]	9,1 [4,5;17,2] ¹	4,4 [3,2;9,4]
PMЖ (n=122)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	311,8 [142,7;598,0] ²	22,8 [12,0;46,4] ²	21,8 [6,7;94,6]	6,3 [3,1;12,3]	3,8 [2,1;7,5]
	TT	382,8 [161,5;1435,2]	50,0 [19,8;82,7]	50,2 [10,6;347,8]	6,4 [4,6;22,0]	5,4 [3,5;13,8]

	CT+TT	382,8 [153,0;740,8] ²	30,5 [16,2;72,7]	22,5 [8,6;111,4]	5,9 [4,1;14,7]	4,4 [2,4;10,6]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	381,0 [161,5;793,9] ²	28,8 [12,5;66,1] ²	19,4 [6,2;147,7]	6,1 [4,3;13,5] ²	5,2 [2,9;9,7]
	CC	311,8 [215,7;844,1]	22,7 [17,2;44,5]	24,1 [8,0;51,6]	5,2 [3,1;21,4]	3,6 [1,8;13,2]
	AC+CC	306,1 [138,5;598,0] ²	25,0 [15,4;49,3]	24,1 [7,1;60,0]	5,6 [3,1;12,4]	3,6 [2,1;9,2]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	298,5 [138,5;704,2] ²	24,0 [14,3;56,2] ²	24,1 [5,1;121,3]	5,2 [3,1;11,4] ²	4,1 [2,4;7,3]
	GG	571,5 [359,6;783,5]	17,1 [12,0;22,1]	23,6 [2,7;44,6]	4,6 [1,4;7,8]	4,4 [1,4;7,5]
	AG+GG	476,8 [148,9;712,8] ²	26,4 [18,4;62,2] ²	21,3 [8,6;62,3]	7,9 [4,4;14,7] ¹	5,7 [2,9;11,1]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	359,6 [186,6;740,8] ²	26,4 [12,5;71,8] ²	35,2 [2,4;197,8]	6,0 [4,0;13,5] ²	6,1 [2,2;10,7]
	GG	346,3 [222,8;783,5]	31,9 [19,0;56,1]	43,9 [9,4;71,1]	7,1 [3,7;31,1]	5,0 [3,0;13,1]
	AG+GG	311,8 [138,5;701,9] ²	25,3 [15,4;52,1] ²	21,8 [7,8;77,4] ²	6,0 [3,4;12,4]	4,0 [2,4;8,6]

Примечание: (U-тест): ¹ - p<0,05 при сравнении между аллелями одного полиморфизма внутри группы; ² - p<0,05 при сравнении между одноименными аллелями одного полиморфизма у больных РМЖ и ДОМЖ.

Таблица 3.3.1.3.

Содержание тиолов в сыворотке крови у больных с различными молекулярными подтипами рака молочной железы носителей аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма, (Me [P25; P75]) мкмоль/л

Полиморфизм	Аллель	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинилглицин	Глутамилцистеин
КГ (n=142)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	222,1 [173,3;276,3]	8,3 [7,5;9,3]	3,2 [2,7;3,9]	44,3 [36,9;55,0]	3,4 [2,7;3,9]
	TT	209,8 [171,5;254,0]	7,5 [6,3;8,7]	2,6 [2,1;3,5]	36,5 [29,1;53,0]	2,9 [2,3;4,0]
	CT+TT	198,6 [165,9;249,9]	7,9 [6,8;8,8]	3,0 [2,5;3,7]	40,6 [29,7;52,7]	3,1 [2,3;4,0]
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	213,6 [167,9;249,9]	8,0 [7,2;8,9]	3,0 [2,6;3,7]	43,0 [32,0;54,7]	3,3 [2,4;4,1]
	CC	256,9 [181,9;314,8]	8,5 [6,8;11,0]	3,2 [2,4;7,3]	45,7 [36,2;58,2]	3,2 [2,6;3,6]
	AC+CC	210,0 [164,8;280,1]	8,0 [7,1;9,2]	3,1 [2,5;3,9]	43,7 [32,5;53,7]	3,2 [2,4;3,8]
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	215,2 [167,9;278,3]	8,3 [7,3;9,2]	3,2 [2,6;3,9]	44,5 [35,2;54,1]	3,3 [2,6;3,9]
	AG	192,2 [159,6;236,3]	7,7 [6,8;8,5]	2,9 [2,4;3,4]	37,1 [29,9;49,9]	2,8 [2,2;3,8]
	GG	291,5 [263,7;342,5]	8,7 [5,7;15,9]	3,5 [1,8;9,9]	51,3 [29,7;70,2]	3,4 [2,6;5,5]
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	218,1 [171,9;285,5]	7,7 [6,8;8,9]	2,9 [2,4;3,6]	42,6 [29,9;54,7]	3,3 [2,3;4,1]
	GG	203,2 [167,1;283,4]	8,7 [7,4;9,7]	3,2 [2,8;3,7]	43,2 [37,0;51,2]	3,2 [2,6;3,7]

	AG+GG	207,2 [166,9;249,9]	8,1 [7,3;9,1]	3,1 [2,7;3,7]	43,3 [32,9;52,6]	3,2 [2,5;3,8]
Люминальный А (n=39)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	186,3 [171,0;216,6]	9,6 [8,6;11,4] ³	3,8 [3,4;4,6] ³	52,1 [34,4;58,7]	4,2 [3,3;6,1] ¹
	TT	222,2 [162,7;256,8]	9,9 [8,4;30,3]	3,4 [1,8;4,3]	53,5 [12,8;67,5]	4,2 [3,1;6,1]
	CT+TT	211,5 [162,7;231,3]	9,9 [8,8;12,1] ³	4,2 [3,4;4,6] ³	50,5 [34,8;62,6]	3,9 [3,1;4,9] ¹
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	211,5 [169,7;239,6]	10,1 [8,6;12,7] ³	4,2 [3,4;4,6] ¹	54,3 [34,8;65,5]	4,2 [3,2;5,3] ¹
	CC	174,3 [167,9;198,4] ¹	9,4 [8,4;11,5]	4,0 [3,3;4,9]	43,1 [34,3;52,4]	3,5 [2,7;4,1]
	AC+CC	189,0 [167,9;216,6]	9,7 [8,6;10,6] ¹	4,0 [3,4;4,6] ¹	49,8 [34,4;58,4]	4,0 [3,0;4,9] ¹
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	184,8 [169,7;227,8]	9,7 [8,6;10,6] ¹	3,9 [3,4;4,6] ¹	51,8 [35,6;58,8]	4,2 [3,3;5,1] ¹
	AG	198,6 [157,0;244,1]	10,8 [9,8;17,8] ^{3,4}	4,3 [3,4;4,8] ¹	46,6 [26,3;62,1]	3,9 [3,1;5,3] ¹
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	219,7 [173,8;239,7]	9,8 [8,6;10,6] ¹	4,3 [3,6;4,6] ¹	54,7 [49,2;68,1]	4,3 [3,8;5,3] ¹
	GG	188,9 [162,7;216,6]	9,8 [8,7;12,7] ¹	4,0 [3,4;5,0]	53,0 [35,6;54,6]	4,1 [3,1;4,2]
	AG+GG	193,2 [162,8;222,2]	9,8 [8,6;12,1] ³	4,0 [3,4;4,6] ²	50,5 [34,3;58,8]	4,1 [3,0;4,9] ¹
Люминальный В (n=58)						
<i>MTHFR</i> 677 C>T	CC	228,3 [165,6;310,0]	9,3 [8,7;10,6] ¹	3,7 [3,6;4,2] ¹	47,8 [31,7;54,1]	4,0 [3,2;4,6] ¹
	TT	188,5 [159,3;280,3]	9,5 [8,9;10,0] ¹	3,6 [2,4;3,9]	40,5 [27,5;45,3]	3,2 [1,9;3,5] ⁴
	CT+TT	246,8 [189,8;315,2]	9,2 [8,2;10,0] ²	3,4 [2,8;4,0] ⁴	42,8 [27,5;54,3]	3,6 [3,0;5,1] ¹
<i>MTHFR</i> 1298A>C	AA	214,7 [173,4;285,6]	8,9 [8,4;9,5] ³	3,6 [3,3;4,0] ¹	45,3 [36,1;57,5]	3,6 [3,0;5,1]
	CC	347,5 [256,1;419,9] ⁴	15,9 [8,0;26,6]	3,9 [3,3;4,3]	42,6 [28,9;56,0]	5,4 [3,5;6,8]
	AC+CC	236,4 [168,7;314,6]	9,6 [8,4;12,8] ¹	3,6 [3,0;4,2]	44,3 [27,3;52,2]	3,9 [3,2;4,5] ¹
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	220,2 [159,3;311,4]	9,1 [8,1;10,7] ¹	3,6 [3,0;3,9]	41,3 [27,3;51,2]	3,4 [3,0;4,5]
	GG	245,0 [168,7;321,4]	9,3 [8,7;9,9]	3,9 [3,6;4,2]	65,7 [49,7;81,7]	5,1 [3,9;6,4]
	AG+GG	238,6 [199,9;354,2]	9,4 [8,7;10,6] ³	3,6 [3,4;4,2] ²	52,2 [42,6;54,8] ^{1,4}	4,2 [3,9;5,1] ^{2,4}
<i>MTRR</i> 66A>G	AA	275,6 [168,7;315,2]	8,9 [8,2;10,6] ¹	3,6 [3,3;4,2]	39,7 [24,4;49,7]	3,4 [2,8;5,1]
	GG	235,6 [197,2;360,7]	9,4 [8,7;18,7]	3,6 [3,0;3,8]	51,2 [27,3;53,3]	4,2 [4,0;6,3]
	AG+GG	220,2 [173,4;311,4]	9,3 [8,6;10,6] ³	3,6 [3,2;4,0] ¹	46,0 [31,5;54,7]	4,1 [3,1;4,6] ²

Примечание: (U-тест) - ¹ p<0,05, ² p<0,001, ³ p<0,0001 - достоверность различий между группами больных с люминальным А и В типами РМЖ, и группой здоровых исследуемых носителей изучаемых аллелей; ⁴ p<0,05 - достоверность различий внутри группы исследуемых, носителей изучаемых аллелей; ⁵ p<0,05, ⁶ p<0,001 - достоверность различий между группами больных с люминальным А и В типами РМЖ, носителей изучаемых аллелей.

Таким образом, при изучении содержания сывороточных аминокислот в зависимости от носительства отдельных генотипов и аллелей полиморфизма основных белков фолатного цикла, в группе больных с ДОМЖ выявлена положительная ассоциация среди носителей рискового аллеля *MTHFR677T* с уровнем глутатиона, а в группе с РМЖ у лиц с аллелем *MTR2756G* – гомоцистеина. Причем, у больных с люминальным А молекулярно-биологическим подтипом РМЖ определялась связь носительства генотипа *MTR2756AG* с более высоким уровнем гомоцистеина, а с люминальным В типом между генотипом *MTHFR1298CC* и концентрацией цистеина.

В опухолевой ткани молочной железы больных ДОМЖ наблюдался более низкий уровень гомоцистеина у обладателей генотипов *MTRR66GG* (в 4,8 раза), *MTHFR1298CC* (в 2,4 раза) и аллеля *MTRR66G* (в 3,2 раза), а среди пациенток с РМЖ – более высокий у носителей аллеля *MTR2756G* (в 1,5 раза), относительно нормального аллеля. Также выявлены различия и по другим аминокислотам между группами больных ПЗМЖ, носителей изучаемых генотипов, и в сравнении с контролем.

3.3.2. Взаимосвязь комплексного носительства рискованных аллелей и концентрации тиолов в сыворотке и ткани молочной железы

В результате анализа всех возможных межгенных взаимодействий, с использованием метода Multifactor Dimensionality Reduction, четырех полиморфных вариантов генов системы метаболизма фолатов, было обнаружено восемь двух-, трех- и четырёхлокусных комбинаций, которые достоверно ассоциировались с изменением концентрации тиолов как в сыворотке крови, так и в ткани МЖ у пациенток с ПЗМЖ и в контрольной группе.

В КГ у носителей комбинации генотипов *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTR2756GGxMTRR66AA* и *MTR2756GGxMTRR66GG* в сыворотке крови зарегистрирован более низкий уровень цистеинилглицина (в 1,5 раза, $p=0,01$), а у последних и глутамилцистеина (в 1,3 раза, $p<0,05$) в сравнении с другими здоровыми данной группы носителями комбинаций с альтернативными

генотипами. В контрольных образцах морфологически неизменной ткани молочной железы статистически значимых различий для сочетанных генотипов не выявлено, возможно из-за малочисленного размера выборки (n=16).

При оценки комбинированного вклада маркеров полиморфизма генов фолатного обмена у лиц с ПЗМЖ в большинстве случаев в обеих подгруппах (PMЖ и ДОМЖ) встречались комбинации, ассоциированные с более высокой концентрацией гомоцистеина как в сыворотке, так и в опухолевой ткани МЖ. Причем в подгруппе с PMЖ у лиц с сочетаниями генотипов – *MTR2756AGxMTRR66AG* (p=0,03) и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* концентрация гомоцистеина в сыворотке превышала в 1,2 раза (p<0,05), тогда как в образцах опухолевой ткани у лиц той же подгруппы и при носительстве комбинаций *MTHFR1298AAxMTR2756AG+GG* или *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* - в 1,5 и 3,1 раза, соответственно, в сравнении с носителями комбинаций альтернативных генотипов (p<0,05). В группе с ДОМЖ рост тканевого гомоцистеина отмечался при носительстве двухлокусной комбинации – *MTHFR1298AAxMTR2756AG* (в 3,0 раза, p<0,05).

Помимо ассоциаций с гомоцистеином, отмечалась зависимость между сочетанием генотипов *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTRR66GG* и более высоким уровнем сывороточного глутатиона (в 1,3 раза) в подгруппе с ДОМЖ, а также *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* и цистеина опухолевой ткани (в 3,4 раза) в подгруппе с PMЖ, в сравнении с носителями комбинаций альтернативных генотипов (p<0,05) (табл. 3.3.2.1 и 3.3.2.2.).

Влияние комплексного наследования предикторных аллелей и генотипов на концентрацию тиолов, Me [P25; P75]

Комплексное носительство	Цистеин	Гомо- цистеин	Глутатион	Цистеинил- глицин	Глутамил- цистеин
КГ (сыворотка), мкмоль/л					
<i>MTR2756AA x MTRR66AA</i> (n=20)	237,9 [176,3;315,5]	7,9 [6,9;9,1]	2,9 [2,4;3,7]	49,8 [37,6;68,0]	3,5 [2,9;4,3]
<i>MTR2756GG x MTRR66GG</i> (n=12)	196,7 [166,4;255,5]	7,7 [6,9;8,7]	3,0 [2,3;3,2]	34,6 [28,5;42,8] *	2,7 [2,3;3,1] *
КГ (сыворотка), мкмоль/л					
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298AC x</i> <i>MTR2756AA x MTRR66GG</i> (n=18)	219,8 [184,5;288,5]	8,1 [6,9;9,2]	3,2 [2,4;5,5]	44,5 [36,9;53,6]	3,1 [2,4;3,6]
<i>MTHFR677TT x MTHFR1298AA x</i> <i>MTR2756GG x MTRR66AA</i> (n=4)	175,9 [156,8;201,7]	6,7 [6,1;7,8]	2,4 [2,1;2,9]	29,5 [28,8;32,6] *	2,3 [2,2;2,5]
ДОМЖ (сыворотка), мкмоль/л					
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298CC x</i> <i>MTRR66AA</i> (n=15)	206,4 [187,4;223,1]	7,7 [6,9;9,2]	3,0 [2,5;3,8]	40,1 [32,9;49,0]	3,1 [2,6;3,8]
<i>MTHFR677TT x MTHFR1298AA x</i> <i>MTRR66GG</i> (n=12)	174,1 [135,5;248,8]	8,5 [7,7;10,8]	3,9 [3,0;4,4] *	35,8 [22,5;48,7]	2,7 [2,3;3,8]
ДОМЖ (ткань), нмоль/мг					
<i>MTHFR1298AC x MTR2756AA</i> (n=13)	852,7 [436,8;1344,8]	7,5 [6,0;12,6]	12,4 [4,2;33,7]	60,8 [21,8;87,6]	4,2 [3,5;8,0]
<i>MTHFR1298AA x MTR2756AG</i> (n=4)	1107,7 [804,5;2073,7]	22,2 [10,4;51,1] *	8,6 [3,4;12,7]	95,4 [69,1;114,2]	5,6 [3,8;14,5]

Примечание (u-тест) – * - $p < 0,05$, при сравнении с соответствующим показателем внутри группы при комплексном наследовании альтернативных генотипов.

Таблица 3.3.2.2.

Влияние комплексного наследования предикторных аллелей и генотипов на концентрацию тиолов у больных РМЖ,
Me [P25; P75]

Комплексное носительство	Цистеин	Гомо- цистеин	Глутатион	Цистеинил- глицин	Глутамил- цистеин
сыворотка, мкмоль/л					
<i>MTR2756AA x MTRR66AA</i> (n=20)	233,7 [161,9;292,1]	9,2 [8,4;10,1]	3,7[3,2;4,2]	42,7[29,1;54,7]	3,6 [3,2;4,7]
<i>MTR2756AG x MTRR66AG</i> (n=21)	214,7 [151,2;271,4]	10,0 [9,5;11,4] *	4,2 [3,9;4,6]	49,4 [35,2;56,9]	4,2 [3,2;4,7]
сыворотка, мкмоль/л					
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298AC x</i> <i>MTR2756AA x MTRR66GG</i> (n=13)	201,5 [155,1;263,5]	8,9 [7,7;9,9]	3,5 [3,0;3,9]	42,8 [31,0;50,4]	3,9 [3,3;5,5]
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AA x</i> <i>MTR2756AG x MTRR66AG</i> (n=10)	264,1 [141,7;354,1]	10,6 [9,9;17,2] *	3,8 [2,9;4,5]	35,6 [27,5;65,2]	3,3 [2,2;5,1]
ткань, нмоль/мг					
<i>MTHFR1298AC x MTR2756AA</i> (n=26)	175,1 [113,6;520,6]	5,2 [2,2;14,5]	30,3 [7,1;15,2]	27,3 [14,3;65,9]	3,9 [2,7;9,2]
<i>MTHFR1298AA x MTR2756AG/GG</i> (n=19)	476,8 [147,0;1250,6]	7,9 [5,6;29,6] *	11,7 [8,5;33,2]	38,0 [16,2;70,8]	6,4 [3,2;13,7]
ткань, нмоль/мг					
<i>MTHFR677CC x MTHFR1298AC x</i> <i>MTR2756AA x MTRR66GG</i> (n=10)	175,1 [105,5;418,1]	4,7 [2,1;12,3]	58,7 [4,3;26,7]	23,5 [14,8;39,8]	3,3 [2,7;7,2]
<i>MTHFR677CT x MTHFR1298AA x</i> <i>MTR2756AG x MTRR66AG</i> (n=9)	599,9 [227,8;1250,6]*	14,7 [6,1;39,9] *	11,7 [8,5;29,9]	70,8 [33,2;155,2]	5,7 [3,2;16,3]

Примечание (u-тест) – * - $p < 0,05$, при сравнении с соответствующим показателем внутри группы при комплексном наследовании альтернативных генотипов.

3.3.3. Корреляционный анализ генетического индекса и концентрации тиолов в сыворотке и ткани молочной железы

Для оценки аддитивного влияния предиктивных аллелей был проведен корреляционный анализ индивидуального генетического индекса и уровня аминокислот, на основании которого установлена взаимосвязь между величиной IGI и уровнем гомоцистеина, причем в подгруппе с РМЖ – положительная ($R=0,212$; $p=0,02$), а в подгруппе с ДОМЖ – отрицательная ($R= -0,47$; $p=0,01$), и в первом случае изменение концентрации гомоцистеина отмечалось в сыворотке, а во-втором – в опухолевой ткани молочной железы. Среди лиц в контрольной группе изменение IGI не влияло на уровень изучаемых аминокислот (табл. 3.3.3.1).

Таблица 3.3.3.1.

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией тиолов и генетическим индексом в изучаемых группах

Генетический индекс	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинглицин	Глутамилцистеин
Сыворотка					
1–2,5 КГ (n=142)	0,014 $p=0,86$	-0,014 $p=0,86$	-0,018 $p=0,83$	-0,071 $p=0,41$	-0,119 $p=0,16$
1,25–2,25 ДОМЖ (n=60)	-0,002 $p=0,98$	0,131 $p=0,32$	0,09 $p=0,48$	0,07 $p=0,55$	0,03 $p=0,79$
1–2,25 РМЖ (n=122)	0,014 $p=0,87$	0,212 $p=0,02$	0,040 $p=0,66$	-0,016 $p=0,86$	0,032 $p=0,72$
Ткань молочной железы					
1–2,5 Контроль (n=16)	-0,08 $p=0,75$	0,03 $p=0,90$	-0,08 $p=0,76$	0,16 $p=0,54$	0,13 $p=0,60$
1,25–2,25 ДОМЖ (n=60)	-0,124 $p=0,54$	-0,47 $p=0,01$	-0,147 $p=0,47$	-0,281 $p=0,16$	-0,25 $p=0,20$
1–2,25 РМЖ (n=122)	0,09 $p=0,31$	0,09 $p=0,33$	0,008 $p=0,9$	0,09 $p=0,32$	0,06 $p=0,47$

Примечание: жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

Также по результатам полученных данных о тиолах в сыворотке, мы отметили, что в КГ у лиц с генетическим индексом равным 1,5 наблюдался в 1,4 раза ниже уровень цистеинилглицина ($p=0,04$) и глутамилцистеина ($p=0,01$) по

сравнению с соответствующим показателем у исследуемых данной группы с IGI=1,0. В группе с ДОМЖ расчет генетического индекса относительно уровня тиолов показал, что у больных с IGI=1,5-1,75 концентрация цистеина была в 1,3 раза выше ($p=0,01$), а гомоцистеина в 1,2 раза ниже ($p=0,03$), чем у больных с IGI=1,25 этой же группы. Однако у лиц с IGI=2,0 уровень гомоцистеина становится в 1,3 раза выше, чем у больных как с IGI=1,5 ($p=0,009$), так и 1,75 ($p=0,003$). Среди больных РМЖ имеющих IGI=2-2,25, уровень цистеина и гомоцистеина превышал в среднем в 1,3 раза соответствующий показатель в группе у лиц с IGI=1,0-1,25 ($p=0,03$) (табл. 3.3.3.2.).

Исследование концентрации аминотиолов в ткани молочной железы с учетом генетического индекса также показало достоверные отличия в группах с ПЗМЖ, но не в контроле. Так у пациенток с ДОМЖ с более высоким IGI равным от 1,5-2 был отмечен более низкий уровень гомоцистеина ($p=0,03$) и цистеинилглицина ($p=0,008$) (в среднем в 3,8 раза), а также глутамилцистеина ($p=0,01$) (в 2,5 раза) в сравнении с соответствующим показателя внутри группы у лиц с IGI=1,25. У больных РМЖ с IGI равным 2,25 и 1,75 наблюдалась более высокая концентрация, соответственно, цистеина и гомоцистеина, превышающая в 2,3 ($p=0,02$) и 1,4 ($p=0,05$) раза аналогичный показатель внутри группы у лиц с IGI=1,5 (табл. 3.3.3.3.).

Содержание тиолов в сыворотке крови исследуемых групп, относительно генетического индекса,
(Ме [P25-P75]), мкмоль/л

Генетический индекс	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинилглицин	Глутамилцистеин
КГ (n=142)					
1,0 (n=4)	238,0 [225,8-294,8]	8,3 [7,6-9,5]	3,1 [2,7-3,8]	56,2 [45,6-73,1]	4,4 [3,5-5,7]
1,25 (n=20)	221,1 [171,9-285,5]	8,4 [7,5-9,4]	3,2 [2,6-4,0]	50,7 [29,2-55,0]	3,7 [2,3-4,3]
1,5 (n=42)	184,0 [166,1-243,7]	7,8 [7,1-8,9]	2,9 [2,5-3,6]	39,8 [32,4-50,5] ¹	3,1 [2,3-3,5] ¹
1,75 (n=45)	206,5 [167,9-244,3]	8,1 [7,3-8,9]	3,1 [2,7-3,7]	43,8 [32,9-51,0]	3,4 [2,5-3,9]
2,0 (n=23)	207,4 [161,5-288,5]	8,0 [7,3-10,2]	3,0 [2,6-3,9]	47,1 [32,0-56,7]	3,3 [2,0-3,7]
2,25 (n=8)	245,2 [194,1-265,9]	7,3 [6,2-8,7]	2,8 [2,0-3,8]	38,7 [27,3-70,2]	3,0 [2,1-5,5]
ДОМЖ (n=60)					
1,25 (n=10)	171,8 [143,9-203,6]	9,0 [8,5-13,0]	3,6 [3,3-4,2]	32,5 [12,9-45,6]	2,6 [2,1-3,9]
1,5 (n=18)	220,8 [187,4-243,8] ²	7,7 [7,1-9,2] ²	3,1 [2,7-3,8]	40,1 [32,9-48,3]	3,1 [2,7-3,8]
1,75 (n=19)	196,8 [137,2-251,4]	8,0 [7,6-9,1] ²	3,2 [2,6-3,8]	30,1 [23,7-44,3]	2,5 [2,0-3,8]
2,0 (n=11)	182,5 [130,4-264,8]	9,9 [9,0-13,5] ^{3,4}	3,7 [3,1-5,0]	30,4 [22,9-62,7]	2,9 [2,4-4,2]
2,25 (n=2)	285,4 [173,7-397,0]	9,8 [9,7-9,8]	4,0 [4,0-4,0]	60,5 [49,2-71,9]	6,3 [3,8-8,7]
РМЖ (n=122)					
1,0 (n=3)	148,8 [129,8-173,8]	8,8 [8,6-9,6]	3,7 [3,6-4,0]	41,8 [33,4-43,7]	3,3 [2,6-3,4]
1,25 (n=22)	239,7 [173,4-308,6]	9,1 [8,2-10,3]	3,6 [3,3-4,3]	44,3 [31,8-58,8]	3,8 [3,2-5,9]
1,5 (n=32)	214,7 [171,0-272,7]	9,3 [8,4-11,1]	3,7 [3,0-4,6]	49,2 [28,6-60,3]	4,1 [2,7-5,1]
1,75 (n=38)	193,2 [158,6-258,1]	9,8 [8,8-10,5]	4,2 [3,6-4,7]	45,3 [37,6-54,3]	3,6 [3,2-4,3]
2,0 (n=20)	226,8 [165,3-368,5]	10,0 [9,5-12,2] ²	4,0 [3,3-4,6]	52,9 [34,1-57,7]	4,3 [3,1-6,0]
2,25 (n=7)	198,8 [180,6-235,6] ¹	9,2 [8,2-25,5]	3,3 [2,5-3,8]	41,1 [17,9-51,3]	3,6 [3,2-4,1]

Примечание (u-тест): ¹ - p<0,05, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,0; ² - p<0,05, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,25; ³ - p<0,01, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,75; ⁴ - p<0,01, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,5.

Таблица 3.3.3.3.

Содержание тиолов в ткани молочной железы исследуемых групп, относительно генетического индекса,
(Me [P25-P75]), нмоль/мг

Генетический индекс	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинилглицин	Глутамилцистеин
Контроль (n=16)					
1,0 (n=4)	718,5 [127,6-1705,1]	6,3 [3,3-7,3]	2,7 [1,1-5,0]	25,4 [8,7-42,6]	3,7 [1,4-5,6]
1,5 (n=2)	212,6 [174,1-251,1]	3,2 [2,2-4,2]	0,6 [0,4-0,9]	5,4 [5,2-5,6]	1,1 [1,0-1,2]
1,75 (n=3)	672,4 [484,1-698,2]	7,2 [3,8-14,6]	1,6 [0,8-6,1]	74,2 [32,9-107,4]	3,3 [2,8-4,3]
2,0 (n=4)	489,0 [302,8-1300,2]	5,6 [4,3-11,1]	1,8 [0,5-5,1]	13,4 [8,5-29,7]	3,6 [1,4-6,5]
2,25 (n=3)	218,4 [153,1-300,0]	5,7 [1,7-10,3]	1,2 [0,6-1,9]	42,7 [7,6-46,5]	1,6 [1,3-53,5]
ДОМЖ (n=60)					
1,25 (n=16)	1355,6 [1321,4-1682,2]	29,3 [17,9-70,3]	14,7 [12,3-58,9]	126,0 [99,9-222,4]	9,6 [5,2-79,8]
1,5 (n=14)	474,1 [407,9-551,5]	7,4 [7,2-11,4] ¹	5,8 [1,4-16,6]	32,2 [14,4-87,6] ¹	3,8 [2,8-6,1] ¹
1,75 (n=18)	575,8 [313,4-1145,3]	5,5 [1,9-11,1] ¹	8,3 [5,1-23,3]	34,0 [18,3-75,3] ¹	5,5 [1,8-8,8]
2,0 (n=12)	989,0 [984,4-1285,2]	12,3 [5,9-16,4] ¹	13,9 [3,9-41,9]	61,7 [60,9-134,5]	4,0 [3,9-9,2]
РМЖ (n=122)					
1,0 (n=4)	344,2 [176,6-819,6]	6,9 [1,2-31,7]	1,4 [0,5-8,1]	10,5 [3,9-88,2]	2,1 [0,6-27,6]
1,25 (n=23)	399,2 [209,0-749,0]	6,3 [4,1-12,5]	39,9 [4,1-192,6]	33,5 [14,1-68,9]	5,7 [3,5-10,3]
1,5 (n=30)	222,8 [120,1-697,2]	4,4 [2,7-7,2]	19,2 [7,2-109,6]	21,9 [12,0-38,0]	3,3 [2,6-8,3]
1,75 (n=38)	322,4 [116,5-614,6]	6,3 [4,4-20,7] ²	28,2 [8,6-94,6]	32,2 [17,7-56,2]	4,1 [2,0-7,3]
2,0 (n=19)	359,0 [247,7-701,9]	7,1 [3,4-16,4]	25,9 [12,0-65,8]	25,4 [15,4-52,2]	4,2 [3,1-11,1]
2,25 (n=8)	502,1 [311,8-1893,7] ²	8,3 [4,2-56,5]	21,3 [3,2-55,8]	39,0 [20,5-100,7]	13,1 [2,4-17,6]

Примечание (u-тест): ¹ - p<0,05, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,25; ² - p<0,05, при сравнении с соответствующим показателем в группе исследуемых с IGI=1,5.

Таким образом, в результате исследования взаимосвязи носительства полиморфных вариантов генов системы метаболизма фолатов и концентрации аминотиолов в сыворотке и ткани МЖ исследуемых групп с ПЗМЖ, были найдены ассоциации как отдельного носительства SNP, так и сочетанного, с более высоким уровнем аминотиолов (цистеина, глутатиона и гомоцистеина), а, следовательно, и риска возникновения данной патологии. Так, среди одиночных SNP, подверженность к более высокому уровню гомоцистеина в сыворотке была ассоциирована с носительством полиморфного маркера *MTR2756G* (при РМЖ), а в ткани МЖ с аллелем *MTRR66A* и *MTHFR1298A* (при ДОМЖ). Сочетанный вклад изучаемых молекулярно-генетических маркеров у лиц с ПЗМЖ был ассоциирован с ростом концентрации гомоцистеина как в сыворотке, так и в опухолевой ткани МЖ. Причем в группе с ДОМЖ рост гомоцистеина отмечался при носительстве двухлокусных комбинаций *MTHFR1298AAxMTR2756AG*, а при РМЖ – как двухлокусных *MTR2756AGxMTRR66AG*, так и четырехлокусных *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG*. Это дает возможность предположить, что, чем больше аллельных вариантов генов фолатного обмена в определенном сочетании оказывает влияние на уровень изучаемых тиолов, тем выше уровень пролиферации опухоли молочной железы.

По итогам исследования уровня тиолов относительно индивидуального генетического индекса у больных РМЖ отмечалась явная тенденция к росту концентрации тиолов (и чаще всего гомоцистеина) с увеличением величины IGI, причем как сывороточных, так и в опухолевой ткани МЖ. В группе с ДОМЖ также наблюдалась достоверная связь уровня аминотиолов с генетическим индексом, но при этом если в сыворотке связь была прямая, то в ткани МЖ она носила обратный характер, и с увеличением IGI уровень тиолов (гомоцистеина, цистеинилглицина и глутамилцистеина) оставался значимо меньше. Из результатов корреляционного анализа, можно сделать вывод, что, чем выше величина IGI, т.е. чем больше рискованных аллелей, тем выше уровень гомоцистеина в сыворотке у больных с РМЖ, и ниже в образцах опухолевой ткани у пациенток с ДОМЖ.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным последних лет относительно значения основных факторов риска в развитии РМЖ (наследственного и возрастного факторов, фоновых предраковых заболеваний, роли иммунодефицита, гормонального дисбаланса при различных эндокринопатиях и ряда других) на молекулярно-клеточном, органном и системном уровнях важная роль отводится наследственной предрасположенности [80], в том числе обуславливающей нарушения метаболизма фолатного обмена [32,71]. Однако, несмотря на широкое изучение генетического полиморфизма генов *MTHFR*, *MTRR* и *MTR* при онкологической патологии, до настоящего момента практически отсутствуют сведения о роли интенсификации процессов метаболизма гомоцистеина и других внутриклеточных тиолов в механизмах развития рака молочной железы, также как о самой связи между изучаемыми полиморфизмами и риском развития данного заболевания, которая по-прежнему вызывает споры.

В результате нашего исследования из всех изучаемых полиморфизмов генов метаболизма фолатов у больных ПЗМЖ определено превалирование частоты носительства генотипа *MTHFR1298AC* по сравнению с контролем (OR=1,65), причем преимущественно у пациенток с ДОМЖ (OR=2,4). У последних также была повышена частота аллеля *MTR2756A* (OR=2,0), а аллель *MTR2756G* носил протективный характер (OR=0,50). Стоит отметить, что частота носительства данных полиморфизмов (*MTHFR1298AC* (54,2 %) и *MTR2756A* (88,3 %)) в группе больных с ДОМЖ превышала общепопуляционные показатели [8]. У больных РМЖ в частотном распределении изучаемых полиморфизмов различий не найдено. Носительство данных полиморфных вариантов (*MTHFR1298AC*, *MTR2756A*), проявивших предикторную направленность, вероятно, вызывает нарушение функции метаболизирующих гомоцистеин ферментов системы фолатного обмена с развитием гипергомоцистеинемии, дисбаланса тиолов, в том

числе в ткани МЖ и локальными метаболическими сдвигами, в определенной степени, способствующими опухолевой прогрессии. Чтобы подтвердить или опровергнуть этот факт необходимо обратиться к известным данным, относительно метаболических нарушений.

MTHFR является ключевым ферментом в метаболизме фолатов, который обеспечивает метильными группами процессы синтеза ДНК и регуляции генов. Активность *MTHFR* у гомо- и гетерозиготных носителей минорного аллеля снижается до 60 и 80% соответственно по сравнению с субъектами, несущими генотип дикого типа 1298AA. Однако, по данным некоторой литературы [121], полиморфизм *MTHFR*A1298C не играет значимой роли в повышении концентрации гомоцистеина или снижении уровня фолата в плазме. Сочетанное носительство генотипов *MTHFR*1298AC и *MTHFR*677CT приводит к таким же изменениям (снижению активности фермента до 30%, повышению концентрации гомоцистеина и снижению уровня фолата в плазме), как при носительстве гомозиготного генотипа *MTHFR*677TT [25].

Результаты двух метаанализов проведенных К. Li и J. Zhang с соавт. на основе 95 оригинальных исследований (44,5 тыс. случаев рака молочной железы и 52 тыс. контроля) показывают, что нет существенной связи между полиморфизмом гена *MTHFR*A1298C и восприимчивостью к раку молочной железы для общей популяции [100,175]. Однако по другим источникам, он имел значительную связь с данной патологией, у кавказцев [28], а также у русских женщин Московского региона [16], особенно с его инфильтративно-дольковым типом и прогрессией опухоли. При этом генотип *MTHFR*1298CC, вероятно, носит протективный характер [109].

В работах, исследующих влияние полиморфизма *MTR*A2756G на уровень гомоцистеина и развитие раковых заболеваний, представлены противоречивые результаты: так, аллель *MTR*2756G, по данным Z. Gong и соавт. был ассоциирован с повышением гомоцистеина [71], в то время как в других работах не влиял [69], а в большинстве исследований, даже снижал [82], что, возможно, связано с активирующим влиянием данной замены. Связь аллеля *MTR*2756A с риском рака

молочной железы упоминалась лишь в одном исследовании доступной нам литературы [83].

Полученные нами данные об отсутствии статистически значимой ассоциации изучаемых полиморфизмов генов фолатного обмена с риском развития РМЖ подтверждаются в наиболее крупных исследованиях: двух метаанализах [29,32] и работе В.Д. Петровой с участием жительниц Алтайского края [19]. Причем в последней исследовалось влияние не только изучаемых нами аллельных вариантов генов ферментов фолатного обмена (A2756G гена *MTR*, A66G гена *MTRR*, C677T и A1298C гена *MTHFR*), но и других генов этой же группы. А также De Cássia Carvalho Barbosa et al., работавшие с пациентками в возрасте 50 лет и старше [89], S.C. Houghton et al. с помощью метаанализа [85,133], Kakkoura [152] и Shaik et al. среди женщин в постменопаузе [137], не обнаружили никакой ассоциации полиморфизмов гена *MTRA2756G* с риском рака молочной железы. Однако, многие результаты зарубежных исследований показывают, что, например, снижение функции фермента MTR может вызывать РМЖ [69,83], и наличие достоверного риска в присутствии генотипов AG/GG гена *MTR*, а для женщин старше 50 – *MTHFR677CT* [28,175]. Также обнаружена связь *MTRA2756G* с РМЖ в Индии и среди европейцев, причем последние с уровнем гомоцистеина плазмы $7,9 \pm 0,3$ мкмоль/л [32].

Однако остается не ясной роль аллельных вариантов *MTHFR677T* и *MTRRA66G* в формировании предрасположенности как к ДОМЖ, так и к РМЖ, что, возможно, обусловлено относительно низкой пенетрантностью или экспрессивностью данных генов. Хотя именно эти полиморфизмы вносят значительный вклад в развитие гипергомоцистеинемии, снижая ферментативную активность соответствующих ферментов. Так, генотип *MTHFR677TT*, встречающийся у 10-16 % популяции, приводит к снижению активности фермента MTHFR на 75 % по сравнению с аллелем “дикого типа” *MTHFR677CC*, что ассоциировано с повышением сывороточного уровня гомоцистеина [101] и высоким риском развития РМЖ в азиатских популяциях [100]. Также и влияние полиморфизма *MTRRA66G* на развитие и течение рака, весьма вероятно [29].

Таким образом, носительство *MTHFR1298AC* и *MTR2756A*, особенно сочетанное *MTHFR1298ACxMTR2756A*, можно рассматривать в качестве вероятного предиктора и перспективного прогностического маркера досимптоматического выявления женщин групп риска по заболеваемости ДОМЖ. Возможная роль данных предикторов в развитии патологии МЖ нами описана впервые, и к настоящему времени неизвестно ассоциаций изучаемых полиморфных вариантов с доброкачественными образованиями молочной железы, хотя ранее такая связь изучалась.

В результате анализа межгенных взаимодействий (с использованием метода Multifactor Dimensionality Reduction) полиморфных вариантов генов системы метаболизма фолатов в развитии ПЗМЖ были установлены четыре модели: 1) однолокусная модель «*MTHFRA1298C* (rs1801131)»; 2) двухлокусная модель «*MTHFRA1298C* (rs1801131) / *MTRA2756G* (rs1805087)»; 3) трехлокусная модель «*MTHFRA1298C* (rs1801131) / *MTRA2756G* (rs1805087) / *MTRRA66G* (rs1801394)»; 4) четырехлокусная модель «*MTHFRC677T* (rs1801133) / *MTHFRA1298C* (rs1801131) / *MTRA2756G* (rs1805087) / *MTRRA66G* (rs1801394)». Однако ни одна модель не обладала удовлетворительными показателями воспроизводимости, чувствительности и специфичности, и соответственно, не было найдено значимых ассоциаций в формировании «патогенетического профиля», приводящего к значительному возрастанию риска возникновения данной патологии.

Только для одного полиморфного варианта – *MTHFR1298AC* (rs1801131) было показано возрастание риска развития ПЗМЖ (OR=1,72, CI95% [1,04-2,61], p=0,03). Для остальных полиморфных вариантов различий выявлено не было. Данный факт и полученные нами результаты моделирования, указывают на то, что ключевая роль в модификации риска спорадического РМЖ принадлежит именно SNP – *MTHFRA1298C* [9]. Это подтверждается в одной из работ [4], где анализировался вклад генов метаболизма фолатов в риск развития РМЖ с помощью MDR. Стоит отметить, что к настоящему времени в литературе встречаются лишь единичные и только зарубежные подобные работы [91,123], а в

отношении ДОМЖ в данном контексте оригинальных научных исследований не имеется вовсе.

Предиктивная роль носительства генотипа *MTHFR1289AC* и аллеля *MTR2756A* в развитии повышенного риска для ПЗМЖ и в большей степени ДОМЖ, находят свое обоснование в результатах фундаментального исследования [33], которое указывает на связь аллеля *MTHFR1289C* с более низким, а аллелей *MTR2756G* и *MTRR66G* – с более высоким метилированием ДНК в ткани молочной железы (в частности элементов LINE-1, которые в норме гиперметилированы). LINE-1 – это ретротранспозоны, часто повторяющиеся генетические элементы, которые равномерно распределены по геному человека и используются для оценки общего уровня метилирования ДНК, являющимся ранним событием в канцерогенезе. Относительно аллеля *MTRR66G*, по нашим данным, частотных различий в исследуемых группах не выявлено, однако в опухолевой ткани МЖ среди пациенток с ДОМЖ обладателей данного аллеля, наблюдалась взаимосвязь с более низким содержанием гомоцистеина (в 3,2 раза ($p < 0,05$)) в сравнении с соответствующим показателем носителей дикого аллеля. Это в свою очередь (повышение внутриклеточного уровня гомоцистеина) также приводит к гипометилированию ДНК [124]. Эти результаты показывают, что генетические варианты генов фолатного метаболизма *MTHFR1289C*, *MTR2756G* и *MTRR66G* являются не только генетической детерминантой гипометилирования ДНК в тканях молочной железы, модифицирующей риск развития ПЗМЖ, но и потенциальным биомаркером для раннего выявления доброкачественного состояния молочной железы, как предрака. Однако необходимо учитывать, что приоритетная роль и взаимосвязь гипо- или гиперметилирования генома в инициации канцерогенеза до конца не установлена.

Интересным представляется тот факт, что по результатам проведенного американскими учеными из онкологического центра им. М.Д. Андерсона Техасского университета [116,122] поиска фактора, который инициирует переход предракового состояния в агрессивную карциному молочной железы, они больше всего склоняются к причастности именно полиморфных вариантов генов

метаболизма фолатов, способных определять тонкие различия на эпигенетическом уровне экспрессии определенных генов (метилования ДНК или гистонов), между предраковыми формами с низким и высоким риском трансформации в рак (поскольку этот переход происходит не всегда), что также оправдывает проведенное нами исследование. Однако следует отметить, что отечественных работ, которые рассматривали бы полиморфизм генов фолатного обмена как перспективное направление поиска высокоспецифичных маркеров и предикторов, подобного состояния, которое определяло бы вероятность перехода в инвазивное заболевание (РМЖ), практически нет.

Известно, что в процессах нарушения метилирования ДНК участвует гомоцистеин – аминокислота, происходящая из метионина. Как участник метионинового цикла, гомоцистеин может быть реметилирован назад в метионин. Метионин – незаменимая аминокислота, которая играет исключительно важную роль во внутриклеточном метаболизме. Он необходим для инициации трансляции и синтеза белковых молекул, а также является единственным субстратом для синтеза S-аденозилметионина – одного из ведущих доноров метильных групп для метилирования ДНК, который превращается в гомоцистеин и S-аденозилгомоцистеин, потенциальный ингибитор процесса метилирования через SAM-зависимую метилтрансферазу. SAM-зависимое метилирование лежит в основе регуляции важнейших внутриклеточных процессов, включая экспрессию генов, активность ферментов и т.п. [108].

В ряде клеток и тканей (в том числе МЖ) метионин может использоваться для синтеза цистеина, который, в свою очередь, является субстратом для синтеза главного внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона, который защищает многие клеточные структуры от окислительного повреждения. Таким образом, утилизация метионина тесно связана с окислительно-восстановительным метаболизмом.

Нарушения превращения гомоцистеина как в метионин, так и в цистеин приводят к повышению уровня как самого гомоцистеина, так и его метаболитов в крови, в том числе отражая степень повреждения ткани МЖ, как

неспецифические маркеры [159]. Однако механизмы, обеспечивающие связь высокого уровня гомоцистеина с целым рядом серьезных патологий, таких как, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания, а также онкологические, включая пролиферативные процессы молочной железы, остаются невыясненными.

Учитывая патогенез ПЗМЖ, где важную роль играют участники метионинового цикла и в особенности гомоцистеин, цистеин и глутатион, нами решено изучить их содержание в сыворотке крови. В результате, у больных ПЗМЖ отмечено сравнительное увеличение концентрации сывороточного гомоцистеина. В группе пациенток с РМЖ отмечались наибольшие изменения концентрации гомоцистеина (9,6 [8,6-10,8] мкмоль/л) в сравнении как с КГ (8,0 [7,3-9,1] мкмоль/л) ($p < 0,00002$), так и группой с ДОМЖ 8,7 [7,7-9,9] мкмоль/л ($p < 0,005$). Схожие данные были получены в работе D. Zhang и соав., где у больных с раком молочной железы, яичников и другой локализации также отмечалось умеренное повышение концентрации гомоцистеина [55]. Вероятно, это связано с нарушением метаболизма метионина в злокачественных клетках, и в частности баланса между реметилированием и транссульфированием, который определяет уровень гомоцистеина и провоцирует оксидантный стресс при его повышении, за счет нарушения лактат-пируватного обмена. В тоже время, в другом исследовании S.C. Noughton и соавт. описывается отсутствие связи между повышенным уровнем гомоцистеина и общим риском развития рака молочной железы, но при этом наблюдается положительная связь с уровнем цистеина [134].

Можно предположить, что такая противоречивость данных, связана с тем, что повышение уровня гомоцистеина – это результат опухолевого роста, а не его причина, так как непосредственными источниками гомоцистеина в крови могут выступать именно пролиферирующие клетки, а из пищевых источников в кровь он не поступает [159]. Однако большинство раковых клеток демонстрирует метиониновую зависимость – гибель или снижение скорости деления при замене метионина его непосредственным предшественником, гомоцистеином [107]. Причина такой ауксотрофии не вполне ясна. В отличие от других аминокислот

гомоцистеин в норме содержится в тканях и крови в низких концентрациях достигающих, примерно, 10 мкМ, и выше 12-15 мкМ уже токсичен для тканей. Для сравнения уровень цистеина в крови варьирует в пределах примерно 33-117 мкМ, а глутатиона составляет 10-15 мМ [76,159].

При изучении содержания сывороточного гомоцистеина в зависимости от носительства отдельных генотипов полиморфизма генов основных белков фолатного цикла внутри исследуемых групп достоверно выявлена прямая связь у больных РМЖ носителей аллеля *MTR2756G* с повышением уровня сывороточного гомоцистеина. Также были различия и между группами больных ПЗМЖ, носителей изучаемых генотипов, с контролем. Так, среди пациенток с ДОМЖ, в возрасте 30-39 лет, у носителей генотипа *MTHFR1298AA* и *MTRR66GG* выявлен более высокий уровень гомоцистеина ($p < 0,05$) превышающий на 10% и 14%, соответственно, данный показатель в сравнении с контролем. У больных РМЖ наблюдается аналогичная ситуация, как среди носителей нормального гомозиготного генотипа *MTHFR677CC*, *MTHFR1298AA*, *MTR2756AA* и *MTRR66AA*, так и рисковому – *MTRR66GG* и *MTHFR677TT*, с наибольшей концентрацией гомоцистеина у обладателей последнего (28%), в остальных случаях он варьировал от 12,6% до 22%, в основном в возрастных группах от 40-49 до 50-59 лет. Важно указать, что в нашем исследовании статистически достоверных различий сывороточной концентрации гомоцистеина в контрольной группе в зависимости от носительства изучаемых полиморфизмов не выявлено. Таким образом, наличие *MTRR66GG*, *MTHFR677TT* влияет на выработку гомоцистеина.

Сочетанное носительство генотипов *MTR2756AGxMTRR66AG* (до 10,0 [9,5;11,4] мкмоль/л) и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* (до 10,6 [9,9;17,2] мкмоль/л) у больных РМЖ приводило к увеличению гомоцистеина в сыворотке крови на 8 и 16 %, соответственно, в сравнении с контролем, а значит и реализации своего неблагоприятного эффекта через развитие ГГЦ. Интересно что, среди больных с ДОМЖ не обнаружено гомозиготного состояния по рисковому аллелю *MTRR2756G*, которое в

большинстве исследований связывают со снижением уровня гомоцистеина в плазме, в отличие от гетерозигот [71,65].

Конечно, прогностическая роль полиморфизмов генов, ответственных за метаболизм гомоцистеина как независимого фактора риска развития ПЗМЖ заслуживает особого внимания, однако было бы в корне неправильным сводить эффекты обсуждаемых генов исключительно к уровню гомоцистеина. Поэтому нами также исследована концентрация среди других серосодержащих аминокислот, метаболизм которых неразрывно связан с гомоцистеином. Так, уровень сывороточного цистеина не имел значимых отличий у больных ПЗМЖ в сравнении с КГ, где у носителей генотипов *MTHFR1298CC* и *MTR2756GG* он повышался на 20,3% и 35,5%, соответственно ($p < 0,05$), в сравнении с диким аллелем. Возможно, такое повышение концентрации сывороточного цистеина, как мощного антиоксидантного потенциала, является протективным фактором в защиту развития патологических изменений в организме, в том числе в молочной железе. Это подтверждается в результатах проспективного «Исследования здоровья медсестер» S.M. Zhang и соавт. [20], среди 32826 женщин, где более высокие концентрации в плазме общего цистеина прогнозируют снижение риска рака молочной железы, а также связью между низким содержанием цистеина в крови и нарушениями функции почек, печени и дефицитом глутатиона [49,140], что может отягощать генотоксические эффекты гипергомоцистеинемии. При этом ГГЦ является показателем нарушения превращения гомоцистеина в цистеин и, соответственно, глутатион и цистеинилглицин (производный метаболит глутатиона), так как ~75% гомоцистеина клетки метаболизируется по пути транссульфурирования [11]. Таким образом, будет иметь место снижение уровня общей антиокислительной защиты организма, и в частности сдвиг интегрального метаболизма маммоцитов в сторону оксидативного стресса – одного из главных факторов риска РМЖ.

В сыворотки крови пациенток с ПЗМЖ наблюдались изменения не только концентрации гомоцистеина. У больных раком молочной железы в сравнении с контролем, также выявлено более высокое содержание глутатиона и

глутамилцистеина (в 1,2 раза, $p < 0,00002$), причем наибольшая концентрация была преимущественно у носителей нормальных аллелей по каждому из изучаемых полиморфизмов, так уровень глутатиона варьировал от 18,7% при *MTR2756AA* до 27,5% при *MTRR66AA*, а глутамилцистеина – аминокислоты необходимой для синтеза глутатиона, от 14,7% при *MTHFR677CC* до 31,2 при *MTRR66GG*. В группе с ДОМЖ наблюдалась аналогичная ситуация, только уже с содержанием сывороточного цистеинилглицина ($p < 0,002$), концентрация которого была ниже у носителей с генотипами *MTHFR677CC* (на 24,2%) и *MTR2756AA* (на 20,9%) ($p < 0,001$), а также глутатиона и цистеина в сравнении с соответствующим показателем в контроле у носителей одноименного генотипа. Найденный нами относительно высокий уровень глутатиона и его прекурсора (глутамилцистеина) в сыворотке крови больных РМЖ, возможно является следствием защитной реакции клеток при прогрессировании опухолевого процесса и своеобразным маркером патологического ремоделирования ткани молочной железы при данном заболевании (в норме его концентрация в крови в тысячу раз меньше, чем в клетке) [7].

Исследований в этой области, а именно изучающих ассоциации между нарушением метаболизма серосодержащих аминокислот и риском развития ПЗМЖ и особенно ДОМЖ (основной патологией молочных желез), очень мало в литературе, а результаты противоречивы, чтобы доказать причинность и дать полное представление о механизме их действия в опухолевом генезе молочной железы. Так, например, в доступной литературе есть лишь одна работа описывающая прямую связь гипергомоцистеинемии у женщин с доброкачественными дисплазиями МЖ [5]. Интересно, что многие заболевания, связанные с гомоцистеином, также связаны с окислительным стрессом, который активен во время канцерогенного процесса и коррелирует с прогнозом заболевания у больных раком молочной железы. В плазме гомоцистеин легко окисляется и может оказывать стресс-индуцирующее действие на клетки с помощью реакционноспособных видов кислорода при образовании дисульфидной связи. Однако цистеин, который также подвергается дисульфидным и АФК-

образующим реакциям, и более распространен, чем гомоцистеин, обычно не связан с болезнью [49].

Интересным представлялось изучить у больных ПЗМЖ особенности содержания определяемых аминотиолов также и в опухолевой ткани молочной железы. У всех исследуемых больных помимо образца сыворотки крови был получен и образец материала опухоли молочной железы, в котором также определяли содержание аминотиолов. Концентрация гомоцистеина и цистеина в опухолевой ткани МЖ, достоверно изменялась только у больных с ДОМЖ, превышая ее в 2-3 раза ($p < 0,05$) в сравнении с соответствующим показателем как в контроле, так и у больных РМЖ. Уровень гомоцистеина и цистеина у последних был наравне с контролем, но при этом была выявлена прямая корреляция между уровнем цистеина в опухолевой ткани МЖ и содержанием сывороточного гомоцистеина ($r = 0,24$, $p = 0,01$). Вероятно, это является признаком напряженной работы систем утилизации гомоцистеина посредством транссульфирования на фоне генетически обусловленного дефицита фолатзависимого реметилирования, о чем свидетельствуют признаки недостаточности детоксикации гомоцистеина в опухолевой ткани, так как соотношение концентраций этих субстратов – (коэффициент цистеин/гомоцистеин) у больных РМЖ (равный 57,5), почти как у контрольной группы (55,0), тогда как у пациенток с ДОМЖ - 78,9.

Относительно низкий уровень цистеина в ткани МЖ у больных РМЖ, в сравнении с группой с ДОМЖ, вероятней всего является проявлением глубоких нарушений метаболизма тиолов и может приводить к снижению глутатиона, так как скорость его синтеза контролируется наличием цистеина, а, следовательно, повысить восприимчивость к окислительному стрессу, воспалению и раку. Схожие данные описаны в результатах одного проспективного исследования Zhang S.M. и соавт., где низкий уровень сывороточного цистеина является прогностическим признаком РМЖ [20].

В обеих подгруппах концентрация глутатиона в опухолевой ткани молочной железы в 9 (при ДОМЖ) и 16,6 раз (при РМЖ) превышала соответствующий показатель в контроле ($p < 0,05$). Средний уровень глутатиона в

образцах опухолевой ткани молочной железы при РМЖ был значительно выше ($p < 0,05$), чем в образцах нормальной ткани и с доброкачественным поражением молочной железы, что подтверждается литературными данными [75]. Однако, например, уровень глутатиона опухолевой ткани большинства новообразований головного мозга ниже, чем в здоровой ткани головного мозга. Возможно, это связано с тем, что механизмы регуляции уровня глутатиона в клетках тканеспецифичны. Еще одним доказательством этого служит работа Enrico Desideri [51], где все компоненты системы глутатиона повышались у пациентов с опухолями молочной железы, и лишь некоторые у больных со злокачественными заболеваниями яичников, печени и легких, что указывает на клиническую ценность глутатиона как биомаркера только при определенных опухолях, в том числе РМЖ.

Также важно отметить, что большинство представленных в литературе исследований сравнивали уровень глутатиона опухоли МЖ с гистологически нормальной перитуморальной тканью, но нет ни одного исследования, доказывающего, что перитуморальная ткань биохимически «нормальна» по отношению к глутатиону. Только в одном исследовании Sreerama et al. было сравнение уровня глутатиона опухолей (1130 ± 1990 нмоль/мг белка) с нормальной тканью МЖ у пациентов без рака и обнаружило его превышение в 4,3 раза [153].

Повышение в опухолевой ткани МЖ у больных с ДОМЖ концентрации глутамилцистеина в 2,1 раза и цистеинилглицина в 2,5 раза, в сравнении с нормальной тканью контроля ($p < 0,05$), являющихся, соответственно прекурсором и метаболитом глутатиона, указывает на его ускоренный метаболизм в данной группе. При этом важно отметить, что рост глутамилцистеина это не только восполнение пула глутатиона вследствие отсутствия ингибирующего действия последнего по типу обратной связи, но и также индикатор напряженности защитных систем клетки, так как антиоксидантное действие глутамилцистеина не зависит от концентраций глутатиона.

В группе больных РМЖ, с максимально высокой концентрацией глутатиона (23,3 [7,2;109,6] мкмоль/л) в опухолевой ткани молочной железы среди всех исследуемых групп, также наблюдались незначительные изменения уровня тканевого глутамилцистеина, превышающего лишь в 1,6 раза, а содержание цистеинилглицина и вовсе не отличалось, в сравнении с соответствующим показателем в контроле. По сравнению с группой ДОМЖ - это может являться указанием на менее выраженную активность метаболизма глутатиона, связанную, например, с блокирующим действием метаболитов опухолевой прогрессии на сульфгидрильные группы различных ферментов системы глутатиона. А в целом, возможно, такие изменения уровня глутатиона – представляют высокую токсичность для биологических молекул, в том числе ДНК, поскольку он легко реагирует со свободными сульфгидрильными группами. По литературным данным, подобное нарушение внутриклеточного баланса глутатиона наблюдается при ряде патологий, таких как, нейродегенеративные заболевания, муковисцидоз, ВИЧ, а также злокачественные новообразования, и может влиять на экспрессию генов, клеточную дифференцировку, пролиферацию и апоптоз [51,74]. Что касается содержания глутатиона в опухолевой ткани молочной железы, результаты исследований разных авторов очень различаются от примерно 10-40 нмоль/мг белка до 250-2000 нмоль/г ткани, или 500-700 мкмоль/г ДНК. Для здоровой ткани молочной железы значения варьируются в пределах 1-10 нмоль/мг белка [75].

Однако, при анализе взаимосвязей между содержанием тиолов в образцах сыворотки и ткани молочной железы, в группе больных с ДОМЖ достоверных корреляций не наблюдалось, как в отличие от группы больных РМЖ, где при увеличении концентрации цистеинилглицина и цистеина в опухолевой ткани МЖ, наблюдался рост, соответственно, сывороточного глутатиона и гомоцистеина ($r=0,2$, $p=0,03$), причем возрастание последнего, вероятно, связано и с уровнем тканевого цистеинилглицина ($r=0,2$, $p=0,07$), так и в отличии от контрольной группы, где концентрация тканевого глутамилцистеина коррелировала с уровнем сывороточного глутатиона и гомоцистеина ($r=0,5$; $p=0,02$). Возможно, такая

работа доноров цистеина и прекурсоров глутатиона (цистеинилглицина и глутамилцистеина) используется клетками МЖ для усиленного ресинтеза глутатиона, который кроме детоксификации и регуляции клеточного редокс-статуса, также участвует и в непосредственном поддержании функциональной целостности ДНК, включая контроль клеточного цикла и пролиферации, а также активность теломеразы и синтез нуклеотидов. Причем истощение глутатиона в ядре клетки ассоциировано с генотоксичностью [125].

Однако по некоторым данным [140], отмеченная нами в группе больных с РМЖ высокая активность цистеинилглицина, имеет негативный характер, так как данный тиол обладает помимо прочего и прооксидантными свойствами (в высоких концентрациях, как и глутатион) и может вносить значительный вклад в развитии окислительного стресса – одного из главных факторов риска РМЖ. Так цистеинилглицин приобретает важное патогенетическое значение для развития ПЗМЖ.

При изучении концентрации аминотиолов в опухолевой ткани МЖ у больных ПЗМЖ, носителей различных аллелей изучаемых полиморфизмов генов метаболизма фолатов было выявлено, что у больных РМЖ носителей минорного аллеля *MTR2756G* и в группе с ДОМЖ у обладателей дикого аллеля *MTRR66A* отмечался значимо более высокий уровень гомоцистеина, превышающий в 1,5 и 3,2 раза, соответственно, при сравнении с соответствующим показателем у носителей альтернативных аллелей одного полиморфизма внутри группы. Такое влияние «рисковых» аллелей *MTR2756G* и *MTRR66A* на уровень тканевого гомоцистеина можно объяснить многогранным эффектом полиморфизма белков фолатного обмена на единый механизм его регулирования среди больных ПЗМЖ.

Высокий уровень гомоцистеина в образцах опухолевой ткани МЖ и его достоверная связь с носительством изучаемых полиморфизмов у больных ПЗМЖ указывает на причастность изучаемых полиморфизма генов в патологических механизмах аберрантной метиляции, нарушающих баланс процессов пролиферации и апоптоза как в доброкачественной, так и злокачественной ткани МЖ, а, следовательно, в механизмах, модулирующих риск развития данной

патологии. Причем, важно подчеркнуть наличие особенностей метаболизма тиолов в ткани МЖ при ПЗМЖ, где у больных РМЖ наблюдались достоверно более низкие значения (в 2-4 раза) всех изучаемых тиолов, кроме глутамилцистеина, среди носителей одноименных аллелей по сравнению с пациентками с ДОМЖ, что позволяет предположить влияние других неизученных механизмов кроме SNP системы фолатного обмена в развитии риска нарушений поддержания адекватного уровня гомоцистеина и других тиолов в ткани МЖ.

Проведенный анализ связей изучаемых молекулярно-генетических маркеров с морфологическими характеристиками РМЖ показал наличие частотных различий относительно контроля у больных со смешанным типом РМЖ, по носительству аллеля *MTHFR677T* ($\chi^2=6,41$, $p=0,01$) и генотипа *MTHFR677TT* ($\chi^2=7,56$, $p=0,02$), тогда как у больных с наиболее распространенными типами РМЖ (ИПР и ИДР) частота аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов не отличалась. Это подтверждают недавние наблюдения, проведенные некоторыми научными группами, где специфические генетические повреждения не ассоциированы с гистологическим типом рака в случае с инвазивной протоковой карциномой. Возможно, это связано с тем, что рак молочной железы протокового типа включает группу опухолей, не имеющих специфических морфологических черт и обладающих высокой генетической гетерогенностью. А так как инвазивная протоковая карцинома включает в себя самую большую группу инвазивных злокачественных новообразований молочной железы, демонстрирующих фундаментальные различия по отношению к некоторым специфическим типам рака, то это требует более детального изучения со стороны генетической однородности и разработкой соответствующей классификации на основе полученных данных. Обнаружены различия в распределении аллеля *MTHFR677T* у больных смешанным и редкими формами РМЖ ($\chi^2=3,73$, $p<0,05$). Среди больных смешанным РМЖ носители аллеля *MTHFR1298A* встречаются, вероятно, чаще, чем в контроле (82,6 против 69,4%; OR=2,10, $\chi^2=3,39$, $p=0,07$), особенно если учитывать доминантную модель наследования с носителями генотипов 1298AA+AC гена *MTHFR* (OR=7,87; CI

95,0,46-134,62, $p=0,05$), что вероятно может влиять на предрасположенность к данной патологии.

Также у больных РМЖ с различными гистологическими типами обнаруживается изменение концентрации тиолов в сыворотке крови. Так, при сравнении с контролем, во всех изучаемых подгруппах у больных (с инфильтративно-протоковым и инфильтративно-дольковым, а также смешанным и редкими формами РМЖ) прослеживается более высокий уровень гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина в среднем в 1,3 раза ($p<0,05$). Аналогичные данные получены и относительно содержания цистеинилглицина, но только в группах с идРМЖ и редкими формами. Однако нами не выявлено изменений уровня цистеина в сыворотке относительно гистотипа РМЖ, что может говорить о независимом механизме его контролирования. Наблюдались и межтипые различия, так уровень сывороточного цистеинилглицина (являющегося метаболитом глутатиона) у больных идРМЖ (22,3%; $p=0,007$), смешанным (11,4%; $p=0,02$) и с редкими формами (32,4%; $p=0,008$) был выше в 1,1-1,3 раза, чем у больных с ипРМЖ - наиболее часто встречаемым типом рака молочной железы из числа всех инфильтрирующих РМЖ (около 80%). В группе с идРМЖ уровень глутатиона и гомоцистеина превышал по сравнению со смешанным типом рака (на 15 и 10% соответственно; $p<0,04$).

При изучении уровня тиолов сыворотки крови у больных с различными гистотипами РМЖ в зависимости от носительства генетических вариантов изучаемых полиморфизмов, была отмечена ассоциация носительства минорного аллеля *MTHFR1298C* в группе больных идРМЖ с более низким уровнем цистеинилглицина (60,1 [52,7;68,1] против 47,5 [34,4;51,7] мкмоль/л), а у пациентов с ипРМЖ, напротив, с более высоким значением – гомоцистеина (9,2 [8,2;11,1] против 10,6 [9,2;18,6] мкмоль/л), в 1,3 и 1,2 раза, соответственно ($p=0,01$), по сравнению с обладателями дикого аллеля. Статистически значимых различий в отношении остальных изучаемых полиморфизмов не выявлено.

Учитывая полученные результаты и тот факт, что в пределах одного и того же гистологического варианта РМЖ прогноз может существенно варьировать

[160], можно предположить, что опухолевый морфогенез в данном случае носит генетически детерминированный характер, а также то, что фактором риска развития смешанного типа РМЖ (наиболее агрессивного) - является аллель *MTHFR677T* (OR=2,23) и генотип *MTHFR677TT* (OR=3,82). Следует отметить, что эти данные получены впервые (ранее ассоциация этого полиморфного маркера с риском развития смешанного РМЖ не была установлена по данным исследований базы PubMed-NCBI (<https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)) и могут указывать на значимую патогенетическую роль нарушения обмена аминокислот как звена системы неспецифической резистентности в развитии различных форм РМЖ. При этом на сегодняшний день не существует крупных исследований со статистически достоверными данными, позволяющими определить прогностическую ценность изучаемых полиморфизмов для больных с различными формами РМЖ. А те что имеются – фрагментарны и включают анализ лишь некоторых популяций. Так, в работе, проведенной учеными из Индии, показано участие лишь полиморфных маркеров A2756G гена *MTR* и C677T гена *MTHFR* фолатного обмена и гипергомоцистеинемии в развитии определенных гистологических типов РМЖ [32].

В опухолевой ткани МЖ у пациенток с ДОМЖ значения большинства изучаемых тиолов превышают, как контрольные значения в 2-9 раз ($p < 0,05$), так и показатели в группе с РМЖ в 2,5-3 раза ($p < 0,05$), что может указывать на специфику обмена и функций тиолов среди различных ПЗМЖ, и прежде всего работы антиоксидантной системы, особенно на ранних этапах патологического процесса при ДОМЖ как стадии предрака. Тем не менее, общий антиоксидантный статус оказался ниже в доброкачественной ткани, чем в раковой, где уровень глутатиона выше среди всех исследуемых групп, а, следовательно, и антирадикальной защиты.

В образцах контроля и раковой ткани МЖ концентрация гомоцистеина находилась практически на одном уровне (5,7 [3,4;7,7] и 6,0 [3,9;12,9] мкмоль/л, соответственно), что, возможно, связано с тем, что наиболее существенным сдвигам в условиях развития РМЖ подвергается не сам уровень гомоцистеина, а

скорее всего интенсивность его обмена в тканях МЖ. Превышение этого же показателя, а также уровня таких тиолов, как цистеин и цистеинилглицин, в группе с ДОМЖ (в 2-3 раза), в сравнении как с РМЖ, так и в контроле, по-видимому, связано с более активным их использованием. Схожие положительные корреляционные связи между сывороточным гомоцистеином и концентрацией тканевого цистеинилглицина (в случае с РМЖ) и глутамилцистеина (в случае с контролем) указывают на возможный общий или параллельный механизм регулирования.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что активность метаболизма аминотиолов в сыворотке и опухолевой ткани больных ПЗМЖ имеет существенные различия. Также можно предположить, что метаболические и генетические вариационные особенности, происходящие в доброкачественных опухолях, представляют собой первую ступень в канцерогенезе РМЖ, а уровень аминотиолов это биохимический критерий изменения метаболических процессов, которые протекают на начальных этапах опухолевого роста. Однако, работ для сравнения полученных нами данных в доступной литературе практически нет, так как в большинстве подобных исследований результаты разных авторов очень различаются, а контрольная группа представлена перитуморальной тканью или доброкачественным поражением [60], и лишь в единичных случаях нормальной тканью МЖ условно здоровых лиц и то только значениями некоторых тиолов [75]. При этом также не учитывается важный факт, что механизмы контроля клеточного метаболизма в фиброаденоме и окружающей ткани - различные, по результатам исследования В.К. Боженко и соавт. [1]. Более того, полученные в нашем исследовании данные были отличными от большинства литературных, как относительно важной роли мутационного потенциала гомоцистеина в развитии ДОМЖ, несмотря на мнение большинства авторов, которые считают, что его действие реализуется только при наличии других наследственных и/или приобретенных факторов риска - не связанных с метаболизмом фолатов, так и в отношении того, что генетические и метаболические изменения, связанные с

метаболизмом аминотиолов, наблюдаемые при раке и доброкачественных образованиях молочной железы, в целом, схожи.

Анализ результатов иммуногистохимического исследования выявил разнонаправленную взаимосвязь экспрессии Ki-67 и HER2neu с уровнем сывороточных аминотиолов, но не в опухолевой ткани и в частности цистеина, гомоцистеина и глутатиона. Известно, что гиперэкспрессия данных белков ИГХ-маркеров ассоциирована с высокой степенью злокачественности опухоли молочной железы, особенно на ранней стадии и с плохим прогнозом заболевания [41,173], что влияет на выбор тактики лечения этих пациенток, а уровень аминотиолов является не менее важным потенциальным прогностическим показателем опухолевого роста. Однако, прогностическая значимость мутаций фолатного метаболизма и аминотиолов во взаимосвязи с уровнем экспрессии иммуногистохимических маркеров (ER, PgR, HER2 и Ki-67) и молекулярно-биологическим подтипом у больных РМЖ остается в настоящее время неизученной.

Исследование влияния мультигенного наследования генетических вариантов ферментов фолатного цикла на концентрацию изучаемых тиолов достоверно показало большое количество сочетанного носительства определенных генотипов, как в группе с ДОМЖ (*MTHFR1298AAxMTR2756AG*), так и в группе с РМЖ (*MTR2756AGxMTRR66AG*, *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG*, которые повышают преимущественно уровень гомоцистеина в сыворотке или в ткани МЖ, по сравнению с носителями альтернативных генотипов. Также встречались комбинации генотипов *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTRR66GG* и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* ассоциированные с повышением концентрации сывороточного глутатиона в группе с ДОМЖ и тканевого цистеина у больных РМЖ, соответственно. С учетом предикторной направленности повышенной концентрации гомоцистеина у пациенток с ПЗМЖ носителей данных комбинаций

генотипов можно предполагать важное патогенетическое и прогностическое значение в развитии данной патологии.

В контрольной группе довольно часто встречалось наличие сочетанного носительства (*MTR2756GGxMTRR66GG* и *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTR2756GGxMTRR66AA*), которое также влияло на содержание сывороточных тиолов, а именно ассоциировалось с более низким уровнем цистеинилглицина и глутамилцистеина, чего при ПЗМЖ не наблюдается и возможно носит протективный характер при окислительном стрессе, в том числе и в нормальной ткани молочной железы.

Кроме того, оценив суммарный вклад повреждения нескольких генов ферментов фолатного метаболизма (согласно результатам определения IGI и корреляционного анализа) в регуляцию аминотиолов, а, следовательно, и патогенез ПЗМЖ, где наблюдалась связь между величиной IGI и уровнем гомоцистеина: прямая - в сыворотке у больных с РМЖ и обратная - в образцах опухолевой ткани у пациенток с ДОМЖ, и учетом того что в этих группах встречались ассоциации только среди двухлокусных (при ДОМЖ) и четырехлокусных (при РМЖ) комбинаций с концентрацией вышеупомянутого тиола, можно предположить большое патогенетическое и прогностическое значение IGI для данного вида патологий.

Таким образом, при изучении ассоциаций межгенных взаимодействий исследуемых генов фолатного цикла и концентрации аминотиолов, удалось установить наиболее патогенетически значимые комбинации генотипов, детерминирующие риск развития ГГЦ, а, следовательно, и ПЗМЖ. Это в свою очередь может свидетельствовать о том, что основной вклад в формирование риска развития ПЗМЖ вносит именно сочетанное носительство рискованных аллелей. Такое увеличение риска подтверждает постулат о том, что сумма эффектов отдельных генотипов всегда ниже суммарного эффекта генотипа и оправдывает проведенное исследование, несмотря на тот факт, что обнаруженные межгенные взаимодействия были статистически незначимыми для всех исследованных мультилокусных моделей. По нашему мнению, это может быть

обусловлено тем, что обследованная выборка пациентов с ПЗМЖ являлась морфологически гетерогенной, не говоря уже об учете молекулярных подтипов РМЖ и значительных трудностях для гистологической диагностики среди ДОМЖ, где нет утвержденной классификации.

Таким образом, изменения тиолового метаболизма при ПЗМЖ, связанные с носительством полиморфизма генов фолатного метаболизма, отражают важную прогностическую роль данных соединений в патогенезе подобного рода нарушений и расширяют наше понимание о происходящих процессах в организме на различном уровне. Внедрение в практику современных ДНК-технологий для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями обмена фолатов, является важным моментом повышения эффективности диагностики РМЖ в период, предшествующий заболеванию. А полученные данные о полиморфизме генов несут информацию о наследуемой предрасположенности к онкологическим заболеваниям различной локализации, составляя генетический профиль больных в персонализированной медицине.

Учитывая полученные результаты в процессе наших исследований, мы предлагаем схему патогенеза РМЖ и ДОМЖ (рис. 1 и 2).

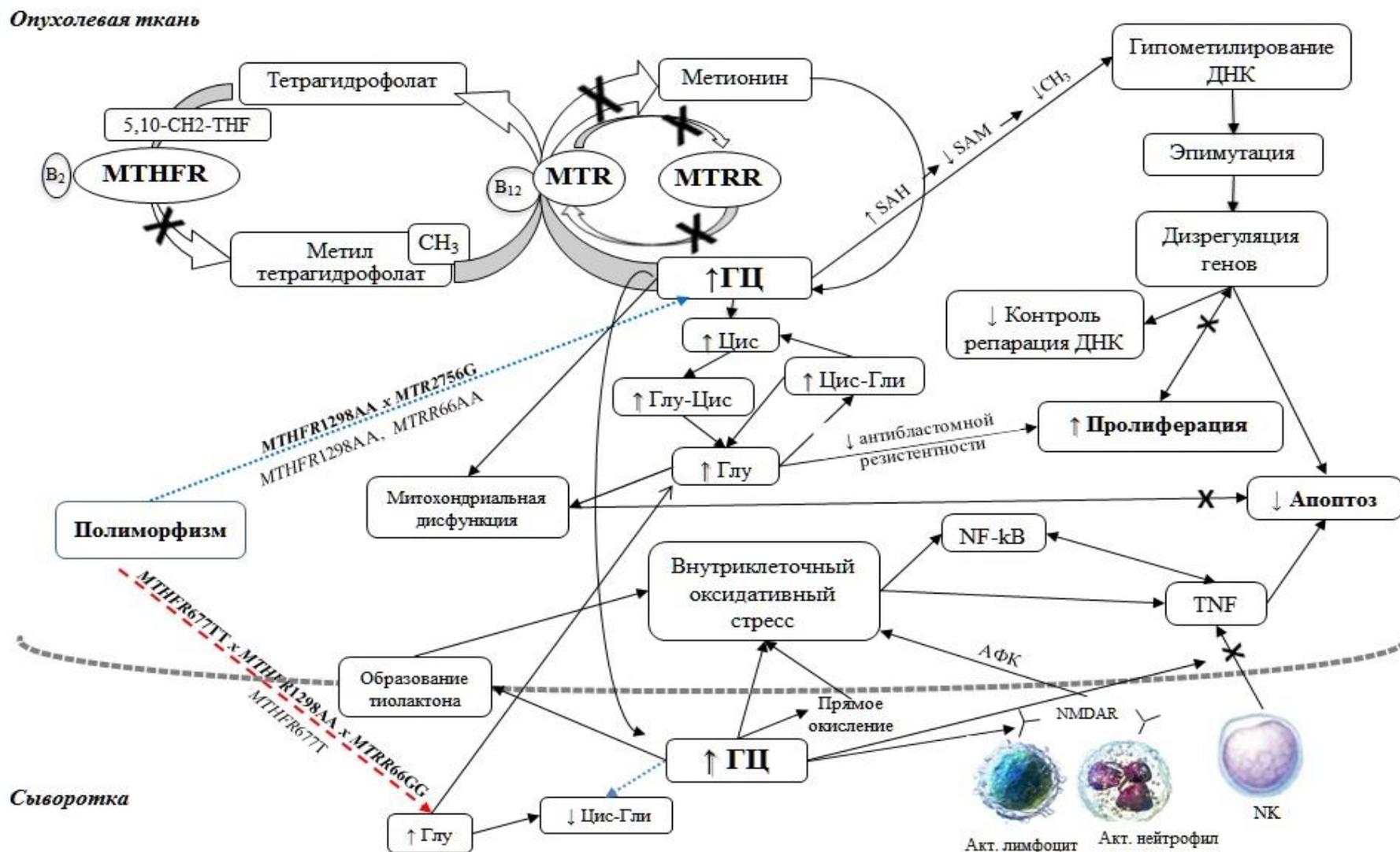


Рисунок 2. Концептуальная схема, отражающая влияние исследуемых маркеров - предикторов ДОМЖ

(- - - - -) активирующие эффекты, (.....) ингибирующие эффекты

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В России заболеваемость раком молочной железы в последние годы неуклонно растет, при этом прослеживается угрожающая тенденция к “омоложению” рака. Сейчас на каждые 100 тысяч женщин в возрасте до 30 лет приходится до 30 больных раком молочной железы по данным состояния онкологической помощи населению России в 2018 году [17]. Учитывая высокие уровни заболеваемости и смертности в масштабах государственного значения, эта проблема обещает оставаться актуальной и в будущем, что приводит к необходимости детального изучения патогенеза данного заболевания.

В результате полученных нами данных выявлено, что генетические полиморфизмы фолатного обмена как отдельных SNP, так и комплексное носительство ассоциированы с ПЗМЖ и преимущественно с формированием доброкачественных образований молочной железы. С возникновением РМЖ носительство изучаемых полиморфизмов не проявило ассоциаций, однако связано с морфологическим и иммуногистохимическим типом, а также стадией заболевания. У пациенток с ДОМЖ по сравнению с КГ более часто встречался генотип *MTHFR1298AC* и аллель *MTR2756A*, носительство которых повышает риск развития данной патологии в 2,5 раза. Частота минорных аллелей *MTR2756G* и *MTRR66G* ассоциирована с патогенетически значимым изменением концентрации гомоцистеина в ткани МЖ, где в первом случае она повышается при РМЖ, а во втором снижается при ДОМЖ. Таким образом, минорный аллель *MTRR66G* проявляет защитный эффект по отношению к ДОМЖ ($p < 0,05$). У пациенток со смешанным и редкими формами, а также с люминальным В подтипом РМЖ повышена частота носительства аллеля *MTHFR677T*, что имеет клиничко-прогностическое значение.

Генетические варианты и в большей степени их сочетанное носительство *MTHFR677T*, *MTHFR1298C*, *MTR2756G* и *MTRR66G* реализуют свой неблагоприятный эффект через развитие ГГЦ. У больных ПЗМЖ в опухолевой ткани молочной железы выявлено высокое содержание аминотиолов относительно контроля, особенно двукратно превышающий уровень

гомоцистеина при ДОМЖ, связанный с реализацией цитотоксических эффектов. Это могло инициировать воспаление, усиление процессов перекисного окисления липидов, а также рост концентрации в тканях МЖ потенциально токсических веществ – радикалов и нарушения состояния естественной системы цитопротекции. Наблюдаемые изменения подтверждают наличие взаимосвязи носительства полиморфизма генов метаболизма фолатов с некоторыми особенностями сывороточного и внутритканевого содержания тиолов: гомоцистеина, а также цистеина и глутатиона.

Комплексное носительство предиктивных аллелей полиморфизма генов метаболизма фолатов вызывает тиоловый дисбаланс с увеличением концентрации гомоцистеина, что оказывает существенное влияние на риск развития ПЗМЖ и преимущественно ДОМЖ. Причем чем больше рискованных аллелей, тем выше величина индивидуального генетического индекса и уровень гомоцистеина в сыворотке у больных с РМЖ ($R=0,212$, $p=0,02$), и ниже в образцах опухолевой ткани у пациенток с ДОМЖ ($R=-0.47$, $p=0,01$). Концентрация тиолов у исследуемых носителей различных аллелей полиморфизма генов метаболизма фолатов различна и вариабельна, тогда как носительство двух и более предиктивных по отношению к ПЗМЖ аллелей в геноме более значимо влияет на уровень тиолов, в частности, повышение гомоцистеина, глутатиона и цистеина. Это создает тиоловый дисбаланс, влияющий на формирование ДОМЖ.

Таким образом, носительство определенных генотипов и аллелей полиморфизма основных белков фолатного цикла, и в большей степени их аддитивный эффект играют значимую роль в нарушении метаболизма гомоцистеина и его производных, что, в конечном счете, может быть фактором повышенного риска как в отношении развития доброкачественных, так и злокачественных пролиферативных заболеваний молочной железы. Оценка данных факторов, особенно у больных РМЖ, где показан наиболее высокий уровень гомоцистеина, представляет практический интерес в каждом конкретном случае онкозаболевания и может быть использована для более эффективного прогнозирования и для выделения особых групп риска по данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. У больных с доброкачественными опухолями молочной железы развитие патологии ассоциировано с носительством генотипа *MTHFR1298AC* и аллели *MTR2756A* с максимальным риском в случае мультигенного наследования *MTHFR1298ACxMTR2756A*. У пациенток с РМЖ ассоциации болезни с отдельными полиморфными маркерами не проявляются, однако заболеваемость гистологически смешанными и редкими формами, а также у больных с люминальным В подтипом имеет связь с носительством аллеля *MTHFR677T*.
2. У больных с ПЗМЖ в геноме выявлены трех- и четырехлокусные рисковые комбинации, причем у лиц с ДОМЖ чаще встречались сочетания генотипов – *MTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66AG*, *MTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66GG*, *MTHFR677CCxMTHFR1298AC xMTR2756AAxMTRR66AG*, а у лиц с РМЖ наблюдался *MTHFR677CCxMTHFR1298CCxMTRR66AA*-комплекс. Количество рисковых аллелей полиморфизма генов белков фолатного обмена не влияет на риск развития пролиферативных заболеваний молочной железы.
3. Пролиферативные, преимущественно злокачественные заболевания молочной железы, в большей мере у пациенток старше 40 лет сопровождаются увеличением концентрации гомоцистеина, глутатиона, глутамилцистеина в сыворотке крови и содержания глутатиона и глутамилцистеина в опухолевой ткани молочной железы. У больных с ДОМЖ в крови снижена концентрация цистеинилглицина, а в ткани молочной железы наблюдается повышение содержания гомоцистеина, цистеина, глутатиона, глутамилцистеина и цистеинилглицина. В сыворотке крови у больных с ДОМЖ, чем больше содержание гомоцистеина, тем меньше концентрация цистеинилглицина и глутамилцистеина.
4. У пациенток с РМЖ концентрация гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина в сыворотке крови и глутатиона в ткани опухоли молочной железы варьирует в зависимости от гистологического типа опухоли, а

содержание глутатиона и глутамилцистеина в опухолевой ткани молочной железы зависит от стадии заболевания. Концентрация гомоцистеина и глутатиона в сыворотке крови у больных РМЖ прямо соотносится с содержанием цистеинилглицина в ткани молочной железы.

5. Содержание тиолов в биологических объектах зависит от молекулярного подтипа рака молочной железы: наибольшие сдвиги концентрации гомоцистеина, глутатиона и глутамилцистеина в крови характерны для HER-2/neu+ подтипа; в опухолевой ткани максимальные изменения уровня глутатиона присущи базальному типу. С повышением пролиферативной активности РМЖ усиливается накопление в крови цистеина и снижается гомоцистеина и глутатиона, а при гиперэкспрессии HER-2/neu уровень гомоцистеина и глутатиона повышается. В сыворотке крови у больных с люминальным А типом РМЖ носителей генотипа *MTR2756AG* увеличивается уровень гомоцистеина, а с люминальным В типом носителей генотипа *MTHFR1298CC* - цистеина, а также у обладателей аллеля *MTR2756G* концентрация цистеинилглицина и глутамилцистеина.
6. У больных РМЖ при носительстве *MTR2756G*-аллеля увеличивается концентрация гомоцистеина как в опухолевой ткани молочной железы, так и в сыворотке крови, а у пациенток с ДОМЖ присутствие в геноме *MTRR66G*-аллеля сопровождается снижением содержания гомоцистеина в опухолевой ткани молочной железы и увеличением глутатиона в сыворотке крови.
7. Комплексное носительство рискованных аллелей генов фолатного метаболизма влияет на содержание аминотиолов в сыворотке крови и в опухолевой ткани молочной железы. У пациенток с ДОМЖ носителей *MTHFR1298AAxMTR2756AG* комплекса и у больных РМЖ носителей *MTR2756AGxMTRR66AG* и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* комбинаций увеличивается концентрация сывороточного гомоцистеина. Сочетанное носительство генотипов *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTRR66GG* у страдающих ДОМЖ сопровождается повышением концентрации сывороточного глутатиона, а носительство

комплекса *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* у больных РМЖ – гомоцистеина и цистеина в опухолевой ткани. С увеличением индивидуального генетического индекса концентрация гомоцистеина повышается в сыворотке крови больных РМЖ и снижается в опухолевой ткани пациенток с ДОМЖ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С целью прогнозирования риска развития доброкачественных заболеваний молочной железы рекомендовано определять полиморфизм генов *MTHFR* (A1298C) и *MTR* (A2756G). Наличие одной из комбинаций генотипов: *MTHFR1298ACxMTR2756AA*, *MTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66AG*, *MTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66GG*, *MTHFR677CCxMTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66AG* у пациенток с ДОМЖ и *MTHFR677CCxMTHFR1298CCxMTRR66AA* - комплекса у больных раком молочной железы – свидетельствует о предрасположенности к этому заболеванию.

Внедрение предложенного метода в медицинскую практику повысит достоверность предсказания риска развития пролиферативных заболеваний молочной железы, что положительно скажется на лечебно-профилактических и диагностических мероприятиях данных онкологических заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ экспрессии генов в фиброаденоме молочной железы / В.К. Боженко, Н.В. Харченко, Е.А. Кудинова [и др.] // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2013. – Т. 4, № 13. – С. 19.
2. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.: ил. – ISBN: 978-5-94869-084-1.
3. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, – 2019. – илл. – 250 с. – ISBN 978-5-85502-251-3.
4. Кипень В.Н. Роль низкопенетрантных аллелей, предрасполагающих к развитию спорадического рака молочной железы // Генетика. – 2017. – Т. 53, № 7. – С. 838-843.
5. Корнацкая А.Г. Особенности обмена гомоцистеина и фолиевой кислоты у женщин с бесплодием и доброкачественной дисплазией молочных желез / А.Г. Корнацкая, О.Д. Дубенко // Репродуктивное здоровье Восточная Европа. – 2015. – №2. – С. 30-44.
6. Королева Н.И. Фиброаденома молочной железы – социально-значимая хирургическая проблема / Н.И. Королева, Л.Д. Школьник, В.С. Фомин // Хирургическая практика. – 2015. – №2. – С. 4-7.
7. Марковский А.В. Ассоциация полиморфизма генов белков фолатного цикла с уровнем гомоцистеина, цистеина и глутатиона в сыворотке крови у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская // Врач-аспирант. – 2016. – Т. 79, № 6.1. – С. 178-184.
8. Марковский А.В. Молекулярно-генетические и сывороточные маркеры нарушений фолатного обмена у больных пролиферативными заболеваниями и раком молочной железы / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков. – DOI: 10.21294/18144861-2017-16-2-50-55 // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 50-55.

9. Марковский А.В. Полиморфизм генов белков фолатного обмена и рак молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская // Врач-аспирант. – 2015. – Т. 70, № 3.2. – С. 230-234.
10. Марковский А.В. Полиморфизм генов фолатного обмена и злокачественные новообразования // Забайкальский медицинский вестник: электронный журнал. – 2018. – № 1. – С. 164-171. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/journal/2018/1/20.pdf> (дата обращения: 17.01.2020).
11. Наумов А.В. Гомоцистеин. Медико-биологические проблемы / А.В. Наумов. – Минск: Профессиональные издания, 2013. – 311 с. – ISBN 978-985-90320-2-8.
12. Поздеев В.К. Пиридоксин-зависимая и пиридоксаль-5'-фосфат-зависимая эпилепсия. Сообщение I. метаболизм витамина В₆, гиповитаминоз, гипервитаминоз, клинические проявления его дефицита и терапия, гипергомоцистеинемия // Психическое здоровье. – 2018. – Т. 16, № 11. – С. 48-80.
13. Результаты генетического скрининга герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и больных раком яичников в российской популяции / Е.И. Батенева, М.Г. Филиппова, А.С. Тюляндина [и др.] // Онкогинекология. – 2015. – № 3. – С. 34-39.
14. Родионов В.В. Доброкачественные заболевания молочных желез / В.В. Родионов, А.А. Сметник // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2018. – № 1. – С. 90-100.
15. Роль гипергомоцистеинемии в механизмах развития гиперкоагуляции у больных ИБС / Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.В. Исакова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник: электронный журнал. – 2019. – № 2. – С. 90-98. – Режим доступа: <http://zabmedvestnik.ru/journal/2019/2/12.pdf> (дата обращения: 17.01.2020).
16. Роль функциональных полиморфных маркеров С677Т и А1298С гена *MTHFR* в патогенезе рака молочной железы у русских женщин московского региона /

- А.М. Бурденный, В.И. Логинов, Т.П. Казубская [и др.] // Патогенез. – 2015. – Т. 13, № 3. – С. 50-55.
17. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – илл. – 236 с. – ISBN 978-5-85502-250-6.
 18. Суспицын Е.Н. Злокачественные новообразования, ассоциированные с наследственными иммунодефицитами / Е.Н. Суспицын, М.А. Махова, Е.Н. Имянитов / Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64, № 1. – С. 7-14.
 19. Формирование групп риска рака молочной железы с учётом отличительных медико-генетических факторов у женщин Алтайского края / В.Д. Петрова, Т.В. Синкина, И.А. Селезнёва [и др.] / Злокачественные опухоли. – 2014. – №3. – С.121-124.
 20. A prospective study of plasma total cysteine and risk of breast cancer / S.M. Zhang, W.C. Willett, J. Selhub [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2003. – Vol.12 (11), Pt 1. – P.1188-1193.
 21. Arévalo-Lorido J.C. Cerebral venous thrombosis with subarachnoid hemorrhage: a case report / J.C. Arévalo-Lorido, J. Carretero-Gómez // Clin Med Res. – 2015. – Vol.13 (1) – P.40-43.
 22. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies / B.L. Tsang, O.J. Devine, A.M. Cordero [et al.]. – DOI 10.3945/ajcn.114.099994 // Am. J. Clin. Nutr. – 2015. – Vol.101 (6). – P. 1286-1294.
 23. Association between lifestyle, menstrual/reproductive history, and histological factors and risk of breast cancer in women biopsied for benign breast disease / R. Arthur, Y. Wang, K. Ye [et al.]. – DOI 10.1007/s10549-017-4347-9 // Breast Cancer Res Treat. – 2017. – 165 (3) – P.623-631.
 24. Association between *MTHFR* C677T polymorphism and risk of prostate cancer: evidence from 22 studies with 10,832 cases and 11,993 controls / M. Abedinzadeh,

- M. Zare-Shehneh, H. Neamatzadeh [et al.]. – DOI 10.7314/apjcp.2015.16.11.4525 // Asian Pac J Cancer Prev. – 2015. – Vol.16 (11). – P. 4525-4530.
25. Association between the *MTHFR* C677T polymorphism, blood folate and vitamin B₁₂ deficiency, and elevated serum total homocysteine in healthy individuals in Yunnan Province, China / J. Ni, L. Zhang, T. Zhou [et al.]. – DOI 10.1016/j.jcma.2016.07.005 // J Chin Med Assoc. – 2017. – Vol.80 (3) – P.147-153.
 26. Association of *CYP* gene polymorphisms with breast cancer risk and prognostic factors in the Jordanian population / L.N. Al-Eitan, D.M. Rababa'h, M.A. Alghamdi, R.H. Khasawneh. – DOI 10.1186/s12881-019-0884-x // BMC Med Genet. – 2019. – Vol. 20 (1). – P.148.
 27. Association of folate and vitamins involved in the 1-carbon cycle with polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) and global DNA methylation in patients with colorectal cancer / A. Ferrari, G.T. Torrezan, D.M. Carraro, S. Aguiar Junior. – DOI 10.3390/nu11061368 / Nutrients. – 2019. – Vol.11 (6). – P. E1368.
 28. Association of *MTHFR* A1298C polymorphism with breast cancer and/or ovarian cancer risk: an updated meta-analysis / W. Liu, Y. Li, R. Li [et al.]. – DOI 10.21010/ajtcam.v13i5.11 // Afr J Tradit Complement Altern Med. – 2016. – Vol. 13 (5). – P. 72-86.
 29. Association of *MTRR* A66G polymorphism with cancer susceptibility: Evidence from 85 studies / P. Wang, S. Li, M. Wang [et al.]. – DOI 10.7150/jca.17379 // J Cancer. – 2017. – Vol. 8 (2). – P. 266-277.
 30. Association of single nucleotide polymorphisms of folate metabolism-related enzyme gene and risk of breast cancer / S.L. Tao, H. Wang, B.S. He [et al.] // Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural science). – 2016. – Vol. 4. – P. 473-478.
 31. Association of the *MTHFR* gene C677T polymorphism with breast cancer in a Turkish population / E.F. Kaya, N. Karakus, A.N. Ulusoy [et al.]. – DOI 10.1159/000448084 // Oncol Res Treat. – 2016. – Vol.39 (9). – P.534-538.

32. Associations between folate metabolism enzyme polymorphisms and breast cancer: A meta-analysis / W. Mo, Y. Ding, Y. Zheng [et al.]. – DOI 10.1111/tbj.13527 // *Breast J.* – 2019. – Vol.00. – P.1-4.
33. Associations between genetic variation in one-carbon metabolism and LINE-1 DNA methylation in histologically normal breast tissues / A.A. Lianos, C. Marian, T.M. Brasky [et al.]. – DOI 10.1080/15592294.2015.1062205 // *Epigenetics.* – 2015. – Vol. 10 (8). – P. 727-735.
34. Bansal A. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance / A. Bansal, M.C. Simon // *J Cell Biol.* 2018. – Vol.217 (7) – P.2291-2298.
35. Baroudi O. Involvement of genetic factors and lifestyle on the occurrence of colorectal and gastric cancer / O. Baroudi, A. Benammar-Elgaaied // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2016. – Vol.107. – P. 72-81.
36. Baseline serum folate, vitamin B₁₂ and the risk of prostate and breast cancer using data from the Swedish AMORIS cohort / A. Essén, A. Santaolalla, H. Garmo [et al.]. – DOI 10.1007/s10552-019-01170-6 // *Cancer Causes Control.* – 2019. – Vol. 30 (6). – P.603-615.
37. Blau O.V. Genetic mutations in acute myeloid leukemia // *Clinical oncohematology.* – 2016. – Vol. 9 (3). – P. 245-256.
38. BMI classification // World Health Organization. URL: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (дата обращения: 15.04.2017).
39. Boonyaratanakornkit V. The role of ovarian sex steroids in metabolic homeostasis, obesity, and postmenopausal breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic implications / V. Boonyaratanakornkit, P. Pateetin // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P.140196.
40. Breast and cervical cancer incidence and mortality trends in Russia 1980-2013 / A. Barchuk, A. Besspalov, H. Huhtala [et al.]. – DOI 10.1016/j.canep.2018.05.008 // *Cancer Epidemiol.* – 2018. – Vol.55 – P.73-80.
41. Breast cancer molecular stratification: from intrinsic subtypes to integrative clusters / H.G. Russnes, O.C. Lingjærde, A.L. Børresen-Dale, C. Caldas. – DOI

- 10.1016/j.ajpath.2017.04.022 // *Am J Pathol.* – 2017. – Vol.187 (10). – P. 2152-2162.
42. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis / S.W. Dyrstad, Y. Yan, A.M. Fowler, G.A. Colditz. – DOI 10.1007/s10549-014-3254-6 // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2015. – Vol. 149 (3). – P. 569-575.
43. Breast cancer statistics, 2019 / C.E. DeSantis, J. Ma, M.M. Gaudet [et al.]. – DOI 10.3322/caac.21583 // *CA Cancer J Clin.* – 2019. – Vol.0 (0). – P.1-14.
44. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer susceptibility among Latinos: a meta-analysis / P. Meneses-Sanchez, S.C. Garcia-Hernandez, L.M. Porchia [et al.]. – DOI 10.1007/s12282-019-00961-8 // *Breast Cancer.* – 2019. – Vol. 26 (5). – P.602-611.
45. Chen P. Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis // *British. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 110. – P. 2327-2338.
46. Chronic inflammation and cancer: paradigm on tumor progression, metastasis and therapeutic intervention / S. Khan, M. Jain, V. Mathur, S.M. Feroz // *Gulf J Oncolog.* – 2016. – Vol. 1 (20). – P.86-93.
47. Clinicopathologic features of breast cancers that develop in women with previous benign breast disease / D.W. Visscher, M.H. Frost, L.C. Hartmann [et al.]. – DOI 10.1002/cncr.29766 // *Cancer.* – 2016. – Vol.122 (3). – P. 378-385.
48. Coughlin S.S. Oxidative stress, antioxidants, physical activity, and the prevention of breast cancer initiation and progression // *J Environ Health Sci.* – 2018. – Vol. 4 (2). – P.55-57.
49. Cysteine allows ovarian cancer cells to adapt to hypoxia and to escape from carboplatin cytotoxicity / S.C. Nunes, C. Ramos, F. Lopes-Coelho [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-018-27753-y // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8 (1). – P.9513.
50. Danforth D.N. Genomic changes in normal breast tissue in women at normal risk or at high risk for breast cancer // *Breast Cancer (Auckl).* – 2016. – Vol.10. – P.109-146.

51. Desideri E. Targeting glutathione metabolism: partner in crime in anticancer therapy / E. Desideri, F. Ciccarone, M.R. Ciriolo // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11 (8). – P. E1926.
52. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer / T. Hasan, R. Arora, A.K. Bansal [et al.]. – DOI 10.1038/s12276-019-0216-4 // *Exp Mol Med*. – 2019. – Vol. 51 (2). – P.21.
53. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity / F. Gentile, A. Arcaro, S. Pizzimenti [et al.]. – DOI 10.3934/genet.2017.2.103 // *AIMS Genet*. – 2017. – Vol. 4 (2). – P.103-137.
54. Dossus L. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors / L. Dossus, P.R. Benusiglio // *Breast Cancer Res*. – 2015. – Vol. 17. – P.37.
55. Elevated homocysteine level and folate deficiency associated with increased overall risk of carcinogenesis: meta-analysis of 83 case-control studies involving 35,758 individuals / D. Zhang, X. Wen, W. Wu [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0123423 // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10 (5). – P.e0123423.
56. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies / H.Y. Peng, C.F. Man, J. Xu, Y. Fan. – DOI 10.1631/jzus.B1400183 // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. – 2015. – Vol. 16 (1). – P.78-86.
57. Epidemiologic risk factors for in situ and invasive breast cancers among postmenopausal women in the National Institutes of Health-AARP diet and health study / M. Mullooly, Z.G. Khodr, C.M. Dallal [et al.]. – DOI 10.1093/aje/kwx206 // *Am J Epidemiol*. – 2017. – Vol. 186 (12). – P.1329-1340.
58. Evaluating genetic variants associated with breast cancer risk in high and moderate-penetrance genes in Asians / M.R. Han, W. Zheng, Q. Cai [et al.]. – DOI 10.1093/carcin/bgx010 // *Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 38 (5) – P.511-518.
59. Evaluation of hyperhomocysteinemia prevalence and its influence on the selected cognitive functions in patients with schizophrenia / B. Trzeźniowska-Drukała, S.

- Kalinowska, K. Safranow [et al.]. – DOI 10.1016/j.pnpbp.2019.109679 // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2019. – Vol.95. – P.109679.
60. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas / S. La Rosa, F. Sessa, L. Colombo [et al.]. – DOI 10.1136/jcp.54.1.37 // *J Clin Pathol*. – 2001. – Vol. 54 (1). – P. 37-41.
 61. Expression of SATB1 and HER2 in breast cancer and the correlations with clinicopathologic characteristics / X. Liu, Y. Zheng, C. Qiao [et al.]. – DOI 10.1186/s13000-015-0282-4 // *Diagn Pathol*. – 2015. – Vol.10. – P.50.
 62. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer / E.A. Rakha, M.E. El-Sayed, J.S. Reis-Filho, I.O. Ellis. – DOI 10.1111/j.1365-2559.2007.02894.x // *Histopathology*. – 2008. – Vol. 52 (1). – P.67-81.
 63. Family history and breast cancer risk among older women in the breast cancer surveillance consortium cohort / D. Braithwaite, D.L. Miglioretti, W. Zhu [et al.]. – DOI 10.1001/jamainternmed.2017.8642 // *JAMA Intern Med*. – 2018. – Vol. 178 (4) – P.494-501.
 64. Folate and its impact on cancer risk / R. Pieroth, S. Paver, S. Day, C. Lammersfeld. – DOI 10.1007/s13668-018-0237-y // *Curr Nutr Rep*. – 2018. – Vol. 7 (3). – P.70-84.
 65. Folate deficiency and gene polymorphisms of *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* elevate the hyperhomocysteinemia risk / W.X. Li, F. Cheng, A.J. Zhang [et al.]. – DOI 10.7754/Clin.Lab.2016.160917 // *Clin Lab*. – 2017 – Vol. 63 (3). – P.523-533.
 66. Folate, vitamin B₁₂, homocysteine and polymorphisms in folate metabolizing genes in children with congenital heart disease and their mothers / K.E. Elizabeth, S.L. Praveen, N.R. Preethi [et al.]. – DOI 10.1038/ejcn.2017.135 // *Eur J Clin Nutr*. – 2017. – Vol. 71 (12). – P.1437-1441.
 67. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model / S. Deghan Manshadi, L. Ishiguro, K.J. Sohn [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0084635 // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9 (1). – P. e84635.

68. Folic acid, vitamin B₆, and vitamin B₁₂ in combination and age-related cataract in a randomized trial of women / W.G. Christen, R.J. Glynn, E.Y. Chew [et al.]. – DOI 10.3109/09286586.2015.1130845 // *Ophthalmic Epidemiol.* – 2016. – Vol. 23 (1). – P. 32-39.
69. Gene-environment interactions and predictors of breast cancer in family-based multi-ethnic groups / M.C. Gonzales, J. Grayson, A. Lie [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.25520 // *Oncotarget.* – 2018. – 9 (49) – P.29019-29035.
70. Genetic alterations in benign breast biopsies of subsequent breast cancer patients / S.D. Soysal, CKY. Ng, L. Costa [et al.]. – DOI 10.3389/fmed.2019.00166 // *Front Med (Lausanne).* – 2019. – Vol.6. – P.166.
71. Genetic variants in one-carbon metabolism genes and breast cancer risk in European American and African American women / Z. Gong, S. Yao, G. Zirpoli [et al.]. – DOI 10.1002/ijc.29434 // *Int J Cancer.* – 2015. – Vol. 137 (3). – P.666-677.
72. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.]. – DOI 10.3322/caac.21492 // *CA Cancer J Clin.* – 2018. – Vol. 68 (6). – P.394-424.
73. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca²⁺ influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death / S.N. Deep, S. Mitra, S. Rajagopal [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.RA119.008820 // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294 (29). – P.11154-11165.
74. Glutathione and transsulfuration in alcohol-associated tissue injury and carcinogenesis / Y. Chen, M. Han, A. Matsumoto [et al.]. – DOI 10.1007/978-3-319-98788-0_3 // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – Vol.1032. – P. 37-53.
75. Glutathione levels in human tumors / M.P. Gamcsik, M.S. Kasibhatla, S.D. Teeter, O.M. Colvin. – DOI 10.3109/1354750X.2012.715672 // *Biomarkers.* – 2012. – Vol. 17 (8). – P. 671-691.

76. Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies / C. Gaucher, A. Boudier, J. Bonetti [et al.]. – DOI 10.3390/antiox7050062 // *Antioxidants* (Basel). – 2018. – Vol. 7 (5). – P. E62.
77. Gos M. Jr. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism / M. Jr. Gos, A. Szepecht-Potocka // *J Appl Genet.* – 2002. – Vol. 43. – P. 511-524.
78. Gu Y. Association between polymorphisms in folate metabolism genes and maternal risk for Down syndrome: A meta-analysis // *Mol Clin Oncol.* – 2017. – Vol. 7 (3). – P.367-377.
79. H₂S-releasing nanoemulsions: a new formulation to inhibit tumor cells proliferation and improve tissue repair / M. Ciocci, E. Iorio, F. Carotenuto [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.12609 // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7 (51). – P. 84338-84358.
80. Hereditary breast cancer; genetic penetrance and current status with *BRCA* / M. Mahdavi, M. Nassiri, M.M. Kooshyar [et al.]. – DOI 10.1002/jcp.27464 // *J Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234 (5). – P.5741-5750.
81. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems / D. Djuric, V. Jakovljevic, V. Zivkovic, I. Srejovic. – DOI 10.1139/cjpp-2018-0112 // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 96 (10). – P.991-1003.
82. Homocysteine metabolism in children and adolescents: influence of age on plasma biomarkers and correspondent genotype interactions / H. Caldeira-Araújo, R. Ramos, C. Florindo [et al.]. – DOI 10.3390/nu11030646 // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11 (3). – P. E646.
83. Hosseini M. Role of polymorphism of methyltetrahydrofolate - homocysteine methyltransferase (*MTR*) A2756G and breast cancer risk // *Polish Journal of Pathology.* – 2013. – Vol. 64 (3). – P.191-195.
84. Hyperhomocysteinemia as a risk factor and potential nutraceutical target for certain pathologies / C. Tinelli, A. Di Pino, E. Ficulle [et al.]. – DOI 10.3389/fnut.2019.00049 // *Front Nutr.* – 2019. – Vol.6. – P.49.

85. Increased homocysteine plasma levels in breast cancer patients of a Mexican population / K.M. Varela Almanza, A.M. Puebla-Pérez, J.I. Delgado-Saucedo [et al.] // *Exp Oncol.* – 2018. – Vol. 40 (2). – P.114-118.
86. Increased plasma homocysteine level is associated with executive dysfunction in type 2 diabetic patients with mild cognitive impairment / S. Tian, J. Han, R. Huang [et al.]. – DOI 10.3233/JAD-170162 // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Vol. 58 (4). – P.1163-1173.
87. Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- κ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway / S. Hajra, A.R. Patra, A. Basu [et al.]. – DOI 10.1016/j.cbi.2018.05.005 // *Chem Biol Interact.* – 2018. – Vol. 290. – P.19-36.
88. Influence of chemotherapeutic drug-related gene polymorphisms on toxicity and survival of early breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy / V. Ludovini, C. Antognelli, A. Rulli [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-017-3483-2 // *BMC Cancer.* – 2017. – Vol. 17 (1). – P.502.
89. Interaction of *MTHFR* C677T and A1298C, and *MTR* A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil / R. de Cássia Carvalho Barbosa, D.M. da Costa, D.E. Cordeiro [et al.] // *Anticancer Res.* – 2012. – Vol. 32. – P. 4805-4811.
90. Jakubowski H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease // *Physiol Rev.* – 2019. – Vol. 99 (1). – P.555-604.
91. Joint effects of folate intake and one-carbon-metabolizing genetic polymorphisms on breast cancer risk: a case-control study in China / W.P. Luo, B. Li, F.Y. Lin [et al.]. – DOI 10.1038/srep29555 // *Sci. Rep.* – 2016. – P. 29555.
92. Kako K. Emerging impacts of biological methylation on genetic information / K. Kako, J.D. Kim, A. Fukamizu // *J Biochem.* – 2019. – Vol. 165 (1). – P.9-18.
93. Ki-67 assessment in early breast cancer: SAKK28/12 validation study on the IBCSG VIII and IBCSG IX cohort / Z. Varga, Q. Li, W. Jochum [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-019-49638-4 // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9 (1). – P.13534.

94. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in Pakistani patients / S. Haroon, A.A. Hashmi, A. Khurshid [et al.]. – DOI 10.7314/apjcp.2013.14.7.4353 // Asian Pac J Cancer Prev. – 2013. – Vol. 14, №7. – P. 4353-4358.
95. Kohnken R. Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications / R. Kohnken, K.M. Kodigepalli, L. Wu. – DOI 10.1186/s12943-015-0446-6 // Molecular Cancer. – 2015. – Vol.14. – P.176.
96. Kuchiba A. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women // Br J Cancer. – 2014. – Vol. 110 (11). – P. 2765-2771.
97. Lack of association between *MTHFR* C677T polymorphism and breast cancer risk in Ahvaz, west south-Iran / G. Mohammadzadeh, M. Karimi, M. Bazyar, S.M. Hosseini. – DOI 10.4103/2277-9175.176352 // Adv Biomed Res. – 2016. – Vol. 5. – P.26.
98. Lebron-Zapata L. Overview of breast cancer screening and diagnosis / L. Lebron-Zapata, M.S. Jochelson // PET Clin. – 2018. – Vol. 13 (3). – P.301-323.
99. Lee M.P. Understanding cancer through the lens of epigenetic inheritance, allele-specific gene expression, and high-throughput technology // Front Oncol. – 2019. – Vol.9. – P.794.
100. Li K. Association of 677 C>T (rs1801133) and 1298 A>C (rs1801131) polymorphisms in the *MTHFR* gene and breast cancer susceptibility: a meta-analysis based on 57 individual studies / K. Li, W. Li, X. Dong // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (6). – P. e71290.
101. Liew S.C. Methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases / S.C. Liew, E.D. Gupta // Eur J Med Genet. – 2015. – Vol. 58 (1). – P.1-10.
102. Ma L.M. Meta-analysis of the association of *MTHFR* polymorphisms with multiple myeloma risk / L.M. Ma, L.H. Ruan, H.P. Yang // Sci Rep. – 2015. – Vol.5. – P.10735.

103. Mammographic density and risk of breast cancer by tumor characteristics: a case-control study / K. Krishnan, L. Baglietto, J. Stone [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-017-3871-7 // BMC Cancer. – 2017. – Vol. 17 (1). – P.859.
104. Mathematical modeling of drug-induced receptor internalization in the HER2-positive SKBR3 breast cancer cell-line / M. Fehling-Kaschek, D.B. Peckys, D. Kaschek [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-019-49019-x // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9 (1). – P.12709.
105. McCully K.S. Hyperhomocysteinemia, suppressed immunity, and altered oxidative metabolism caused by pathogenic microbes in atherosclerosis and dementia // Front Aging Neurosci. – 2017. – Vol. 9. – P.324.
106. Merino Bonilla J.A. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies / J.A. Merino Bonilla, M. Torres Tabanera, L.H. Ros Mendoza // Radiologia. – 2017. – Vol. 59 (5). – P.368-379.
107. Metabolic interactions with cancer epigenetics / X. Gao, M.A. Reid, M. Kong, J.W. Locasale. – DOI 10.1016/j.mam.2016.09.001 // Mol Aspects Med. – 2017. – Vol. 54 – P. 50-57.
108. Methyl group-donating vitamins elevate 3-o-methyldopa in patients with Parkinson disease / T. Müller, C. Jugel, S. Muhlack, F. Klostermann. – DOI 10.1097/WNF.0b013e318283fa18 // Clin. Neuropharmacol. – 2013. – Vol. 36 (2). – P. 52-54.
109. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer: a Sardinian preliminary case-control study / P. Castiglia, V. Sanna, A. Azara [et al.]. – DOI 10.7150/ijms.32162 // Int J Med Sci. – 2019. – Vol. 16 (8). – P.1089-1095.
110. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases / L. Wan, Y. Li, Z. Zhang [et al.]. – DOI 10.1038/s41398-018-0276-6 // Transl Psychiatry. – 2018. – Vol. 8 (1). – P.242.
111. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis / L. Xu, Z. Qin, F. Wang [et al.]. – DOI 10.1042/BSR20170917 // Biosci Rep. – 2017. – Vol. 37 (6). – P. BSR20170917.

112. Methylene-tetrahydrofolate reductase contributes to allergic airway disease / K.R. Eyring, B.S. Pedersen, K.N. Maclean [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0190916 // PLoS One. – 2018. – Vol.13 (1). – P.e0190916.
113. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphic sequence variations influences the susceptibility to chronic myeloid leukemia in Kashmiri Population / S.M. Baba, Z.A. Shah, K. Javaid [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2019.00612 // Front Oncol. – 2019. – Vol.9. – P.612.
114. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis / X.J. Wang, L.H. Xu, Y.M. Chen [et al.]. – DOI 10.1016/j.tjog.2015.08.005 // Taiwan J Obstet Gynecol. – 2015. – Vol. 54 (5). – P. 546-550.
115. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis from 41 studies with 16,480 cases and 22,388 controls / X. Qi, X. Ma, X. Yang [et al.]. – DOI 10.1007/s10549-010-0773-7 // Breast Cancer Res. Treat. – 2010. – Vol. 123. – P. 499-506.
116. Micalizzi D.S. On the trail of invasive cells in breast cancer / D.S. Micalizzi, S. Maheswaran // Nature. – 2018. – Vol. 554 (7692). – P. 308-309.
117. MiR-30b is involved in the homocysteine-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells by regulating the expression of caspase 3 / F. Li, Q. Chen, X. Song [et al.]. – DOI 10.3390/ijms160817682 // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol.16 (8). – P.17682-17695.
118. Morrow M. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer / M. Morrow, S.J. Schnitt, L. Norton // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2015. – Vol. 12 (4). – P. 227-238.
119. *MTHFR* 677C>T polymorphism and the risk of breast cancer: evidence from an original study and pooled data for 28031 cases and 31880 controls / S. Pooja, J. Carlus, D. Sekhar [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0120654 // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (3). – P.e0120654.
120. *MTHFR* 677C→T genotype modulates the effect of a 5-year supplementation with B-vitamins on homocysteine concentration: The SU.FOL.OM3 randomized

- controlled trial / L.K. Fezeu, V. Ducros, J.L. Guéant [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0193352 // PLoS One. – 2018. – Vol. 13 (5). – P.e0193352.
121. *MTHFR* A1298C polymorphisms reduce the risk of congenital heart defects: a meta-analysis from 16 case-control studies / D. Yu, Z. Zhuang, Z. Wen [et al.]. – DOI 10.1186/s13052-017-0425-1 // Ital J Pediatr. – 2017. – Vol. 43 (1). – P.108.
122. Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing / A.K. Casasent, A. Schalck, R. Gao [et al.]. – DOI 10.1016/j.cell.2017.12.007 // Cell. – 2018. – Vol. 172 (1-2). – P. 205-217.
123. Multifactor dimensionality reduction analysis to elucidate the cross-talk between one-carbon and xenobiotic metabolic pathways in multi-disease models / S.M. Naushad, S.V. Vijayalakshmi, Y. Rupasree [et al.]. – DOI 10.1007/s11033-015-3856-z // Mol. Biol. Rep. – 2015. – P. 1211-1224.
124. Murray L.K. The role of one-carbon metabolism and homocysteine in Parkinson's disease onset, pathology and mechanisms / L.K. Murray, N.M. Jadavji // Nutr Res Rev. – 2019. – Vol. 15. – P.1-13.
125. Narayanankutty A. Glutathione, an antioxidant tripeptide: Dual roles in carcinogenesis and chemoprevention / A. Narayanankutty, J.T. Jdevagiri, V. Narayanankutty // Curr Protein Pept Sci. – 2019. – Vol. 20 (9). – P. 907-917.
126. Nazari S.S. An overview of mammographic density and its association with breast cancer / S.S. Nazari, P. Mukherjee // Breast Cancer. – 2018. – Vol. 25 (3) – P. 259-267.
127. Nefic H. The Frequency of the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene in the population / H. Nefic, M. Mackic-Djurovic, I. Eminovic // Med Arch. – 2018. – Vol. 72 (3). – P.164-169.
128. Oxidative stress and breast cancer risk in premenopausal women / H.B. Nichols, C. Anderson, A.J. White [et al.]. – DOI 10.1097/EDE.0000000000000685 // Epidemiology. – 2017. – Vol. 28 (5). – P.667-674.
129. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay / A. Rahal, A. Kumar, V. Singh [et al.]. – DOI 10.1155/2014/761264 // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – P. 761264.

130. Pathway analysis of genetic variants in folate-mediated one-carbon metabolism-related genes and survival in a prospectively followed cohort of colorectal cancer patients / J. Ose, A. Botma, Y. Balavarca [et al.]. – DOI 10.1002/cam4.1407 // *Cancer Med.* – 2018. – Vol. 7 (7). – P.2797-2807.
131. Perła-Kaján J. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia / J. Perła-Kaján, H. Jakubowski // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20 (13). – P. E3140.
132. Personalised pathway analysis reveals association between DNA repair pathway dysregulation and chromosomal instability in sporadic breast cancer / C. Liu, S. Srihari, S. Lal [et al.]. – DOI 10.1016/j.molonc.2015.09.007 // *Mol Oncol.* – 2016. – Vol. 10 (1). – P.179-193.
133. Plasma B-vitamin and one-carbon metabolites and risk of breast cancer before and after folic acid fortification in the United States / S.C. Houghton, A.H. Eliassen, S.M. Zhang [et al.]. – DOI 10.1002/ijc.31934 // *Int J Cancer.* – 2019. – Vol. 144 (8). – P.1929-1940.
134. Plasma B-vitamins and one-carbon metabolites and the risk of breast cancer in younger women / S.C. Houghton, A.H. Eliassen, S.M. Zhang [et al.]. – DOI 10.1007/s10549-019-05223-x // *Breast Cancer Res Treat.* – 2019. – Vol. 176 (1). – P.191-203.
135. Plasma homocysteine levels and genetic polymorphisms in folate metabolism are associated with breast cancer risk in Chinese women / X. Wu, T. Zou, N. Cao [et al.]. – DOI 10.1186/1897-4287-12-2 // *Hered. Cancer Clin. Pract.* – 2014. – Vol. 12. – P. 1198-1206.
136. Polymorphisms in *MTHFR*, *MTR*, *RFC1* and *C β S* genes involved in folate metabolism and thyroid cancer: a case-control study / Zara-Lopes Tairine, ALS. Galbiatti-Dias, MMU. Castanhole-Nunes [et al.]. – DOI 10.5114/aoms.2018.73091 // *Arch Med Sci.* – 2019. – Vol. 15 (2). – P. 522-530.
137. Population-level diversity in the association of genetic polymorphisms of one-carbon metabolism with breast cancer risk / M.N. Shaik, C. Divya, M. Janaki

- Ramaiah [et al.]. – DOI 10.1007/s12687-016-0277-1 // Journal of Community Genetics. – 2016. – Vol. 7 (4). – P. 279-290.
138. Postnatal administration of homocysteine induces cerebellar damage in rats: protective effect of folic acid / H. Koohpeyma, I. Goudarzi, M. Elahdadi Salmani [et al.]. – DOI 10.1007/s12640-018-9979-y // Neurotox Res. – 2019. – Vol. 35 (3). – P.724-738.
139. Price R.J. Folic acid induces cell type-specific changes in the transcriptome of breast cancer cell lines: a proof-of-concept study / R.J. Price, K.A. Lillycrop, G.C. Burdge // J Nutr Sci. – 2016. – Vol.5. – P.e17.
140. Prospective study of serum cysteine and cysteinylglycine and cancer of the head and neck, esophagus, and stomach in a cohort of male smokers / E.H. Miranti, N.D. Freedman, S.J. Weinstein [et al.]. – DOI 10.3945/ajcn.115.125799 // Am J Clin Nutr. – 2016. – Vol. 104 (3). – P. 686-693.
141. Raijmakers M.T.M. Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues / M.T.M. Raijmakers, E.A.P. Steegers, W.H.M. Peters // Human Reproduction. – 2001. – Vol. 16 (11). – P. 2445-2450.
142. Relationship between genetic polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C and their haplotypes) and the incidence of breast cancer among Jordanian Females - case-control study / N. Awwad, A.M. Yousef, A. Abuhaliema [et al.]. – DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.12.5007 // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2015. – Vol. 16 (12). – P. 5007-5011.
143. Relationship between the methylation of folic acid metabolism-related genes and the incidence and prognosis of esophageal cancer among Ethnic Kazakhs / Y. Dong, X. Yi, Z. Yujie [et al.]. – DOI 10.7150/jca.25270 // J Cancer. – 2018. – Vol. 9 (16). – P. 2865-2875.
144. Relevance of plasma levels of free homocysteine and methionine as risk predictors for ischemic stroke in the young / K.J. Rudreshkumar, V. Majumdar, D. Nagaraja, R. Christopher. – DOI 10.1016/j.clnu.2017.07.005 // Clin Nutr. – 2018 – Vol. 37 (5). – P.1715-1721.

145. Response to vitamin B12 and folic acid in myalgic encephalomyelitis and fibromyalgia / B. Regland, S. Forsmark, L. Halaouate [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0124648 // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (4). – P. e0124648.
146. Risk factors and preventions of breast cancer / Y.S. Sun, Z. Zhao, Z.N. Yang [et al.]. – DOI 10.7150/ijbs.21635 // Int J Biol Sci. – 2017. – Vol. 13(11). – P.1387-1397.
147. Role of growth hormone in breast cancer / R. Subramani, S.B. Nandy, D.A. Pedroza [et al.]. – DOI 10.1210/en.2016-1928 // Endocrinology. – 2017. – Vol. 158 (6). – P.1543-1555.
148. Role of key micronutrients from nutrigenetic and nutrigenomic perspectives in cancer prevention / A.I. Irimie, C. Braicu, S. Pasca [et al.]. – DOI 10.3390/medicina55060283 // Medicina (Kaunas). – 2019. – Vol. 55(6). – P. E283.
149. Sak K. The Val158Met polymorphism in *COMT* gene and cancer risk: role of endogenous and exogenous catechols // Drug Metab Rev. – 2017. – Vol. 49 (1). – P. 56-83.
150. Serefidou M. The impact of one carbon metabolism on histone methylation / M. Serefidou, A.V. Venkatasubramani, A. Imhof // Front Genet. – 2019. – Vol.10. – P.764.
151. Single nucleotide polymorphisms of one-carbon metabolism and cancers of the esophagus, stomach, and liver in a Chinese population / S.C. Chang, P.Y. Chang, B. Butler [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0109235 // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – P. e109235.
152. Single-nucleotide polymorphisms in one-carbon metabolism genes, Mediterranean diet and breast cancer risk: a case-control study in the Greek-Cypriot female population / M.G. Kakkoura, C.A. Demetriou, M.A. Loizidou [et al.]. – DOI 10.1007/s12263-015-0453-7 // Genes Nutr. – 2015. – Vol. 10 (2). – P.453.
153. Sreerama L. Cellular levels of class 1 and class 3 aldehyde dehydrogenases and certain other drug-metabolizing enzymes in human breast malignancies / L. Sreerama, N.E. Sladek // Clin Cancer Res. – 1997. – Vol.3. – P. 1901-1914.

154. Stanczyk F.Z. Relationships of sex steroid hormone levels in benign and cancerous breast tissue and blood: A critical appraisal of current science / F.Z. Stanczyk, B.W. Mathews, M.E. Sherman // *Steroids*. – 2015. – Vol. 99 (Pt A). – P. 91-102.
155. Study on the relationship between the *MTHFR* polymorphism, the level of the folic acid and the cervical cancer susceptibility // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2014. – Vol. 45 (2). – P. 258-261.
156. Subtypes of benign breast disease as a risk factor of breast cancer: A systematic review and metaanalyses / F. MSc Salamat, B. Niakan, A. Keshtkar [et al.] // *Iran J Med Sci*. – 2018. – Vol. 43 (4). – P. 355-364.
157. Sun Y. Proliferation inhibition and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells under the influence of colchicine / Y. Sun, X. Lin, H. Chang // *J BUON*. – 2016. – Vol. 21 (3). – P.570-575.
158. The impact of Catechol-O-methyl transferase knockdown on the cell proliferation of hormone-responsive cancers / M.F. Tolba, H.A. Omar, F. Hersi [et al.]. – DOI 10.1016/j.mce.2019.03.007 // *Mol Cell Endocrinol*. – 2019. – Vol. 15 (488). – P.79-88.
159. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health / H. Škovierová, E. Vidomanová, S. Mahmood [et al.]. – DOI 10.3390/ijms17101733 // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol. 17(10). – P.pii: E1733.
160. The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes / Y.J. Heng, S.C. Lester, G.M. Tse [et al.]. – DOI 10.1002/path.4847 // *J Pathol*. – 2017. – Vol. 241(3). – P. 375-391.
161. The Numb/p53 circuitry couples replicative self-renewal and tumor suppression in mammary epithelial cells / D. Tosoni, S. Zecchini, M. Coazzoli [et al.]. – DOI 10.1083/jcb.201505037 // *J Cell Biol*. – 2015. – Vol. 211 (4). – P. 845-862.
162. The proliferative activity of mammary epithelial cells in normal tissue predicts breast cancer risk in premenopausal women / S.J. Huh, H. Oh, M.A. Peterson [et al.]. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-15-1927 // *Cancer Res*. – 2016. – Vol.76 – P.1926-1934.

163. The relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and hematological malignancy / N. Jiang, X. Zhu, H. Zhang [et al.]. – DOI 10.7754/clin.lab.2013.130447 // Clin Lab. – 2014. – Vol. 60 (5). – P. 767-74.
164. The relationship between S-adenosylhomocysteine and coronary artery lesions: A case control study / X. Huang, X. Lv, H. Song [et al.]. – DOI 10.1016/j.cca.2017.07.001 // Clin Chim Acta. – 2017. – Vol. 471. – P. 314-320.
165. The role of genetic polymorphisms as related to one-carbon metabolism, vitamin B6, and gene-nutrient interactions in maintaining genomic stability and cell viability in chinese breast cancer patients / X. Wu, W. Xu, T. Zhou [et al.]. – DOI 10.3390/ijms17071003 // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17 (7). – P. pii: E1003.
166. The role of oxidative stress modulators in breast cancer / H. Gurer-Orhan, E. Ince, D. Konyar [et al.]. – DOI 10.2174/0929867324666170711114336 // Curr Med Chem. – 2018. – Vol. 25 (33). – P. 4084-4101.
167. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy / F. Hecht, C.F. Pessoa, L.B. Gentile [et al.]. – DOI 10.1007/s13277-016-4873-9 // Tumour Biol. – 2016. – Vol. 37 (4). – P.4281-4291.
168. Thiol redox chemistry: role of protein cysteine oxidation and altered redox homeostasis in allergic inflammation and asthma / S. Hoffman, J. Nolin, D. McMillan [et al.]. – DOI 10.1002/jcb.25017 // J Cell Biochem. – 2015. – Vol. 116 (6). – P. 884-892.
169. Timlin H. Hyperhomocysteinemia and lupus nephritis / H. Timlin, R. Manno, H. Douglas // Cureus. – 2019. – Vol. 11 (7). – P.e5065.
170. Toledano M.B. The unfinished puzzle of glutathione physiological functions, an old molecule that still retains many enigmas / M.B. Toledano, M.E. Huang // Antioxid Redox Signal. – 2017. – Vol. 27 (15). – P.1127-1129.
171. Traube F.R. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation / F.R. Traube, T. Carell // RNA Biol. – 2017. – Vol. 14 (9). – P.1099-1107.
172. Troesch B. Potential links between impaired one-carbon metabolism due to polymorphisms, inadequate B-vitamin status, and the development of Alzheimer's

- Disease / B. Troesch, P. Weber, M.H. Mohajeri // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8 (12). – P. E803.
173. Waks A.G. Breast Cancer Treatment: A Review / A.G. Waks, E.P. Winer // *JAMA*. – 2019. – Vol. 321 (3). – P. 288-300.
174. Wu T.Y. Promoting breast cancer awareness and screening practices for early detection in low-resource settings / T.Y. Wu, J. Lee // *Eur J Breast Health*. – 2018. – Vol. 15 (1). – P.18-25.
175. Zhang J. Association between MTHFR gene 1298A>C polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis based on 38 case-control studies with 40,985 subjects / J. Zhang, L. Zhang, G. Li // *World J Surg Oncol*. – 2016. – Vol. 14 (1). – P. 230.
176. Zhloba A.A. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection / A.A. Zhloba, E.L. Blashko // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. – 2004. – Vol. 800 (1-2). – P. 275-280.