

На правах рукописи



Марковский Александр Викторович

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Чита - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук,
доцент

Страмбовская Наталья Николаевна

Научный консультант:

Заслуженный работник высшей школы РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Витковский Юрий Антонович

Официальные оппоненты:

Дворниченко Виктория Владимировна - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой онкологии и лучевой терапии

Баирова Татьяна Ананьевна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека", г. Иркутск, руководитель лаборатории персонализированной медицины

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск

Защита диссертации состоится «20» мая 2020 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.02 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России и на сайте: <http://chitgma.ru>

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.118.02
д.м.н., доцент



Н.А. Мироманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Пролиферативные заболевания молочной железы (ПЗМЖ) являются одной из наиболее важных медико-социальных проблем современного общества. Это обусловлено устойчивой тенденцией роста, как доброкачественных образований молочной железы (ДОМЖ), которые диагностируются у 25% женщин в возрасте до 30 и у 60% – старше 40 лет (Huh S.J. et al., 2016; Visscher D.W. et al., 2016; De Santis C.E. et al., 2019), так и рака молочной железы (РМЖ), являющегося самым распространенным женским раковым заболеванием в мире (Bray F. et al., 2018; Wu T.Y., Lee J. 2018). В России РМЖ является ведущей патологией в структуре онкологической заболеваемости и смертности у женского населения, удельный вес которых составляет 20,9% и 16,2%, соответственно, а абсолютное число вновь выявленных больных на 2018 год составило – 70,6 тыс. (Barchuk A. et al., 2018; Каприн А.Д. и др. 2019).

На сегодняшний день прогресс молекулярной генетики с привлечением биохимии позволяет рассматривать патогенез РМЖ, 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 метаболические события в жизнедеятельности маммоцитов (Mullooly M. et al., 2017; Russnes H.G. et al., 2017; Lebron-Zapata L., Jochelson M.S. 2018).

Степень разработанности темы исследования

Большинство молекулярно-генетических работ (Al-Eitan L.N. et al., 2019; Mahdavi M. et al., 2019; Tolba M.F. et al., 2019), посвященных изучению роли одиночных полиморфизмов генов-кандидатов, потенциально связанных со злокачественной трансформацией клеток и риском развития РМЖ (генов стероидного метаболизма, апоптоза и др.) не затрагивают участие более распространенных, но низкопенетрантных вариантов – например, 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 (Awwad N. et al., 2015; Kohnken R. et al., 2015; Zhang D. et al., 2015).

Роль полиморфизма генов фолатного метаболизма в изменении восприимчивости к РМЖ многими авторами оценивается противоречиво, а в отношении ДОМЖ и вовсе не определена, так как единичные работы в этой области не позволяют сделать объективных выводов. Согласно одним данным, риск развития РМЖ может быть связан с полиморфизмом генов

белков фолатного обмена *MTHFR*C677T, *MTHFR*A1298C, *MTRR*A66G и *MTR*A2756G (Wu X. et al., 2014, 2016; Shaik M.N. et al., 2016). Другие источники не продемонстрировали каких-либо существенных связей между полиморфными вариантами C677T и A1298C гена *MTHFR* и риском развития РМЖ (Pooja Singh et al., 2015; Castiglia P. et al., 2019). Неоднозначно мнение относительно основного показателя нарушения фолатного обмена клеток – гомоцистеина, а также 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 (Ciocci M. et al., 2016; Nichols H.V. et al., 2017; Djuric D. et al., 2018; Chen Y. et al., 2018), что еще раз подчеркивает важность изучения данного вопроса.

Таким образом, идентификация генов и изучение этиопатогенетических механизмов, связанных с нарушениями фолатного обмена, может способствовать формированию фундаментальных представлений в области молекулярной генетики о механизмах развития пролиферативных заболеваний молочной железы, а также разработке объективных критериев для формирования групп повышенного риска.

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 клинко-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 *MTR2756A* и генотип *MTHFR1298AC*, в большей степени их комбинация *MTHFR1298ACxMTR2756A*, 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 *MTHFR677T*, преимущественно в гомозиготном варианте.

Впервые выявлено, что комплексное носительство генотипов *MTHFR1298AAxMTR2756AG*, *MTHFR677TTxMTHFR1298AAxMTRR66GG* ассоциировано с развитием ДОМЖ, а *MTR2756AGxMTRR66AG*, *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* – 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 аминокислот 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 молочной железы 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

Проведено комплексное исследование 182 больных с морфологически верифицированными пролиферативными заболеваниями молочной железы. Группу контроля составили 142 относительно здоровые женщины без онкологических заболеваний в анамнезе. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края. Материалом исследования служили сыворотка крови и образцы ткани молочной железы. В работе использовались лабораторные (биохимический, генетический и морфологический) и статистические методы исследований (логит-регрессия, MDR-анализ).

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 клиничко-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*, *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG*, *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.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности и обоснованности выводов основных научных положений диссертации определяются достаточным объемом материала, использованием современных клинических, биохимических и генетических методов обследования пациентов, а также применением адекватных поставленным задачам статистических методов.

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» (Санкт-Петербург, 2019).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования по изучению генетического полиморфизма генов фолатного метаболизма *MTHFR*C677T, *MTHFR*A1298C, *MTRR*A2756G и *MTRR*A66G, их влияния на содержание гомоцистеина, цистеина и глутатиона в сыворотке крови и опухолевой ткани молочной железы при пролиферативных заболеваниях молочной железы внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедр онкологии и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», а также в лечебно-диагностическую работу ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» г. Читы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 176 источников, из которых 19 отечественных и 157 зарубежных авторов; иллюстрирована 49 таблицами и 5 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для проведения исследования были сформированы неотобранные выборки пациенток с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ ($n=122$, средний возраст – $53,3 \pm 7,6$ лет) и ДОМЖ ($n=60$, средний возраст – $45,5 \pm 10,4$ лет), проходивших обследование и лечение в хирургическом отделении опухолей молочных желез Забайкальского краевого онкологического диспансера (г. Чита) за период 2014-2016 г. Критериями исключения служили: острые воспалительные заболевания и хронические в стадии обострения, наличие тяжелых сопутствующих соматических заболеваний, беременность. Контрольную группу составили 142 относительно здоровые неродственные женщины (средний возраст – $48,6 \pm 8,5$ лет), проживающие в тех же районах, что и обследуемая группа, не имеющих онкопатологии, острых и хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний на момент обследования. Для лабораторных методов исследования использовались образцы сыворотки крови, опухолевого материала и морфологически неизменной ткани молочной железы.

Исследования выполнены с информированного согласия испытуемых. В работе с обследуемыми соблюдались этические принципы, предъявляемые

Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 ред.) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Протокол исследования № 69 одобрен локально этическим комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА от 24 декабря 2014 г.

Лабораторные методы исследований: концентрацию аминотиолов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (в сыворотке - Zhloba A.A., Vlashko E.L., 2004., а в ткани - Rajmakers и соавт., 2001). Подготовка биоптата тканей молочной железы проводилась с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (TissueLyser II, Qiagen, Германия). Для морфологического и иммуногистохимического исследования использовались стандартные методики.

Молекулярно-генетическое исследование полиморфизма генов фолатного обмена *MTHFR*(C677T), *MTHFR*(A1298C), *MTR*(A2756G), *MTRR*(A66G) осуществлялось методом ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени с использованием наборов «Генетика Метаболизма Фолатов» ООО «НПО ДНК-Технология» (г. Москва). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс».

Статистическая обработка проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., США), MDR 3.0 (Multifactor Dimensionality Reduction). 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). Для оценки связи между количественными признаками использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. 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 и генотипов с предрасположенностью к изучаемой патологии судили по величине относительного риска заболевания (RR) и отношению шансов (OR).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Частота полиморфных генетических маркеров в группах наблюдения

В результате молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга. Различия наблюдались по генотипу *MTHFR*1298AC с большей частотой встречаемости у больных ПЗМЖ (OR=1,65, p=0,03) (табл. 1).

**Частота аллелей и генотипов полиморфизма генов
MTHFR, *MTR* и *MTRR* в группах сравнения**

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота аллеля, генотипа		P	χ^2
		Контроль (n=142)	ПЗМЖ (n=182)		
<i>MTHFR</i> (C677T)	C/C	66 (46,5%)	88 (48,9%)	0,74	0,59
	C/T	64 (45,1%)	74 (41,1%)		
	T/T	12 (8,5%)	18 (10,0%)		
	C	196 (0,690)	250 (0,694)	0,91	0,01
	T	88 (0,310)	110 (0,306)		
<i>MTHFR</i> (A1298C)	A/A	75 (52,8%)	83 (46,1%)	0,03	4,69
	A/C	47 (33,1%)	81 (45,0%)		
	C/C	20 (14,1%)	16 (8,9%)		
	A	197 (0,694)	247 (0,686)	0,84	0,04
	C	87 (0,306)	113 (0,314)		
<i>MTR</i> (A2756G)	A/A	92 (64,8%)	125 (69,4%)	0,18	3,42
	A/G	44 (31,0%)	53 (29,4%)		
	G/G	6 (4,2%)	2 (1,1%)		
	A	228 (0,803)	303 (0,842)	0,20	1,66
	G	56 (0,197)	57 (0,158)		
<i>MTRR</i> (A66G)	A/A	35 (24,6%)	39 (21,7%)	0,79	0,48
	A/G	71 (50,0%)	96 (53,3%)		
	G/G	36 (25,4%)	45 (25,0%)		
	A	141 (0,496)	174 (0,483)	0,74	0,11
	G	143 (0,504)	186 (0,517)		

Примечание: выделены значимые различия частот.

Выявлено, что в группе больных ДОМЖ частота носительства генотипа *MTHFR*1298AC ($p=0,02$) и аллеля *MTR*2756A ($p=0,04$) была больше относительно контроля, степень риска развития заболевания для них составила 1,83 [CI 95%: 1,19-2,80] и 1,67 [CI 95%: 1,00-2,80], соответственно. Относительная вероятность выявления генотипа *MTHFR*1298AC и аллеля *MTR*2756A 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 *MTR*2756G (OR=0,50 [CI 95%: 0,26-0,96]). При сравнении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров у пациентов с РМЖ отличий не выявлено, как в сравнении с контролем, так и подгруппой с ДОМЖ.

В ходе MDR-анализа установлены патогенетически значимые ассоциации, детерминирующие риск развития ПЗМЖ – рисковые комбинации *MTHFR*1298ACx*MTR*2756AA 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]) (табл. 2).

**Рисковые комбинации полиморфных вариантов генов
MTHFR, MTR и MTRR в группах сравнения**

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>MTHFR</i> 1298AC x <i>MTR</i> 2756AA	26 (18,3%)	27 (45,7%)*	30 (24,8%)	57 (31,7%)*	15,5; 7,4 (<0,05) _{1,3}
<i>MTHFR</i> 1298AA x <i>MTR</i> 2756AA	52 (36,6%)	13 (21,6%)*	40 (33,1%)	54 (30%)	4,05 (0,04) ₁
<i>MTHFR</i> 1298AC x <i>MTR</i> 2756AA x <i>MTRR</i> 66AG	15 (10,6%)	15 (25,4%)*	14 (11,6%)	29 (16,1%)	7,24 (0,007) ₁
<i>MTHFR</i> 1298AC x <i>MTR</i> 2756AA x <i>MTRR</i> 66GG	6 (4,2%)	8 (13,6%)*	7 (5,8%)	15 (8,3%)	5,6 (0,01) ₁
<i>MTHFR</i> 677CC x <i>MTHFR</i> 1298AC x <i>MTR</i> 2756AA x <i>MTRR</i> 66AG	9 (6,3%)	9 (15,3%)*	11 (9,1%)	20 (11,1%)	4,23 (0,04) ₁

Примечание: * (χ^2), 1,2,3 – в сравнении с контрольной группой.

Выявлено, что у больных РМЖ смешанного гистотипа частота аллеля *MTHFR*677T (OR=2,23, $\chi^2=6,41$, p=0,01) и генотипа *MTHFR*677TT (OR=3,82, $\chi^2=7,56$, p=0,02) выше в сравнении с контролем, а аллель *MTHFR*677C обладает протективным эффектом (OR=0,45, $\chi^2=6,41$, p=0,01). Аллель *MTHFR*677T встречался чаще у данных больных в сравнении с редкими формами рака (OR=2,87, $\chi^2=4,50$, p=0,03).

Установлено, что у больных с люминальным В подтипом РМЖ генотип *MTHFR*677TT встречался чаще (OR=2,53, $\chi^2=6,72$, p=0,03), а *MTHFR*677CT - реже (OR=0,50, $\chi^2=4,24$, p=0,03) в сравнении с контролем. Частота носительства генотипа *MTHFR*677CT у больных люминальным А и В (OR=0,41, $\chi^2=4,26$, p=0,03), а также HER2-позитивным и базальным (OR=0,11, $\chi^2=5,03$, p=0,02) подтипами РМЖ различались.

Расчет индивидуального генетического индекса не показал влияния на развитие ПЗМЖ, а проведенный логит-анализ выявил вклад генотипа *MTHFR*1298AC и аллеля *MTR*2756A в развитие ДОМЖ (табл. 3).

**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>MTHFR</i> 1298AC	0.8145	0.3347	2.434	0.014939*	5,9282
<i>MTR</i> 2756A	0.6562	0.3342	1.964	0.049583*	3,8555

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

Модель прогнозирования вероятности развития ДОМЖ представлена в виде уравнения:

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

где p - вероятность развития ДОМЖ, x - принимает значение 1 при наличии гетерозиготного генотипа *MTHFR1298AC* и аллели *MTR2756A*. В случае расчета $p \geq 0,39$ следует считать вероятным развитие ДОМЖ.

2. Концентрация аминотиолов у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы

Выявлено, что в сыворотке крови у пациентов с ДОМЖ ($p < 0,02$) и РМЖ более высокая концентрация гомоцистеина ($p < 0,002$), а у последних больных также уровень глутатиона и глутамилцистеина ($p < 0,00002$) в сравнении с контролем (табл. 4).

Таблица 4

**Содержание сывороточных тиолов в группах сравнения
Me [P25-P75], мкмоль/л**

Группы	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинил-глицин	Глутамил-цистеин
Контроль (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]	3,3 [2,7-4,0]	35,3** [26,2-48,3]	3,0 [2,3-3,8]
РМЖ (n=122)	209,9 [165,3-274,3]	9,6***# [8,6-10,8]	3,8***# [3,3-4,4]	46,0# [33,9-57,2]	3,8***# [3,1-4,9]

Примечание: (u-тест) – * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,002$, *** - $p < 0,00002$ при сравнении с соответствующим показателем в КГ; # - $p < 0,005$ при сравнении в группах исследуемых с РМЖ и ДОМЖ.

Обнаружено, что у больных с различными гистологическими (инфильтративно-протоковым, инфильтративно-дольковым, смешанным и редкими формами) и молекулярными (люминальным А и В, базальным и HER2neu+) подтипами РМЖ уровень тиолов в сыворотке крови отличается в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

Установлена разнонаправленная корреляционная зависимость между уровнем экспрессии иммуногистохимических маркеров и концентрацией 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 ($R=-0,22$; $p=0,02$) (табл. 5).

Таблица 5

Коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией сывороточных тиолов и уровнем экспрессии иммуногистохимических маркеров 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

Примечание: выделены статистически значимые связи.

В опухолевой ткани молочной железы у больных ПЗМЖ наблюдалось более высокое содержание 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, относительно контроля. У пациенток с ДОМЖ уровень цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина превышал соответствующий показатель как в контроле, так и в группе с РМЖ ($p < 0,05$) (табл. 6).

Таблица 6

Содержание аминокислот в 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 [*] [436,6;1385,4]	61,9 [*] [31,7;119,8]	12,7 [*] [4,3;33,7]	11,9 [*] [6,0;23,0]	5,6 [*] [3,7;9,6]
РМЖ (n=122)	345,2 [#] [147,0;704,1]	25,9 [#] [15,4;58,3]	23,3 [*] [7,2;109,6]	6,0 [#] [3,9;12,9]	4,3 [*] [2,5;9,8]

Примечание: (u-тест) ^{*} - $p < 0,05$ при сравнении относительно соответствующего показателя в КГ; [#] - $p < 0,05$ при сравнении между группами с РМЖ и ДОМЖ.

Выявлено, что у больных с различным гистологическим и молекулярным подтипом РМЖ концентрация глутатиона опухолевой ткани МЖ в 10,5-30 раз выше ($p < 0,05$), относительно данного показателя в нормальной ткани молочной железы. В данной группе наблюдалась положительная корреляционная связь между концентрацией цистеинилглицина с цистеином в ткани МЖ и гомоцистеина с глутатионом ($R=0,2$; $p < 0,05$) в сыворотке крови, соответственно. В группе больных с ДОМЖ достоверных взаимосвязей не выявлено.

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

В группе больных с ДОМЖ выявлена положительная ассоциация среди носителей рискового аллеля *MTHFR677T* с уровнем глутатиона, а в группе с

PMЖ у лиц с аллелем *MTR2756G* – гомоцистеина. Причем, у больных с люминальным А молекулярно-биологическим подтипом PMЖ 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 PMЖ – более высокий у носителей аллеля *MTR2756G* (в 1,5 раза), относительно нормального аллеля.

Установлена связь между величиной генетического индекса и уровнем гомоцистеина, причем в подгруппе с PMЖ - положительная ($R=0,212$; $p=0,02$) и в сыворотке, а в подгруппе с ДОМЖ - отрицательная ($R= -0,47$; $p=0,01$) и в опухолевой ткани МЖ. В контрольной группе генетический индекс не влиял на уровень изучаемых аминотиолов (табл. 7).

Таблица 7

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

Генетический индекс	Цистеин	Гомоцистеин	Глутатион	Цистеинглицин	Глутамилцистеин
Сыворотка					
1-2,25 PMЖ (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					
1,25-2,25 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 $p=0,20$

Примечание: выделены статистически значимые связи.

В ходе MDR-анализа четырех полиморфных вариантов генов метаболизма фолатов обнаружено восемь двух-, трех- и четырёхлокусных комбинаций, ассоциированных с высокой концентрацией гомоцистеина как в сыворотке крови, так и в опухолевой ткани МЖ у пациенток с ПЗМЖ. У больных PMЖ с сочетаниями генотипов – *MTR2756AGxMTRR66AG* ($p=0,03$) и *MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG* ($p<0,05$) концентрация гомоцистеина в сыворотке превышала в 1,2 раза, а в опухолевой ткани МЖ 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, $p<0,05$) (табл. 8).

Влияние комплексного наследования предикторных генотипов на концентрацию гомоцистеина у больных ПЗМЖ, Me [P25; P75]

Комплексное носительство	Гомоцистеин
ДОМЖ, нмоль/мг	
<i>MTHFR1298ACxMTR2756AA</i>	7,5 [6,0;12,6]
<i>MTHFR1298AAxMTR2756AG</i>	22,2 [10,4;51,1] *
РМЖ, мкмоль/л	
<i>MTR2756AAxMTRR66AA</i>	9,2 [8,4;10,1]
<i>MTR2756AGxMTRR66AG</i>	10,0 [9,5;11,4] *
РМЖ, мкмоль/л	
<i>MTHFR677CCxMTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66GG</i>	8,9 [7,7;9,9]
<i>MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG</i>	10,6 [9,9;17,2] *
РМЖ, нмоль/мг	
<i>MTHFR1298ACxMTR2756AA</i>	5,2 [2,2;14,5]
<i>MTHFR1298AAxMTR2756AG/GG</i>	7,9 [5,6;29,6] *
РМЖ, нмоль/мг	
<i>MTHFR677CCxMTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66GG</i>	4,7 [2,1;12,3]
<i>MTHFR677CTxMTHFR1298AAxMTR2756AGxMTRR66AG</i>	14,7 [6,1;39,9] *

Примечание: (u-тест) * - $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем внутри группы.

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*, *MTHFR677CCxMTHFR1298ACxMTR2756AAxMTRR66AG*, 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. Проллиферативные, 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: *MTHFR*1298AC*xMTR*2756AA, *MTHFR*1298AC*xMTR*2756AA*xMTRR*66AG, *MTHFR*1298AC*xMTR*2756AA*xMTRR*66GG, *MTHFR*677CC*xMTHFR*1298AC*xMTR*2756AA*xMTRR*66AG у пациенток с ДОМЖ и *MTHFR*677CC*xMTHFR*1298CC*xMTRR*66AA-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Марковский А.В. Полиморфизм генов белков фолатного обмена и рак молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский, Н.Н. Страбмовская // Врач-аспирант. – 2015. – Т. 70, № 3.2. – С. 230-234.
2. 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. Страбмовская // Врач-аспирант. – 2016. – Т. 79, № 6.1. – С. 178-184.
3. Марковский А.В. Молекулярно-генетические и сывороточные маркеры нарушений фолатного обмена у больных пролиферативными заболеваниями и раком молочной железы / А.В. Марковский, Н.Н. Страбмовская, П.П. Терешков // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 50-55.
4. Марковский А.В. Полиморфизм генов фолатного обмена и злокачественные новообразования // Забайкальский медицинский вестник: электронный журнал. – 2018. – №1. – С. 164-171. – URL: <https://zabmedvestnik.ru/journal/2018/1/20.pdf> (дата обращения: 17.01.2020).
5. Марковский А.В. Роль полиморфизма генов фолатного метаболизма и сывороточных аминотиолов в формировании различных гистологических типов рака молочной железы // Забайкальский медицинский вестник: электронный журнал. – 2019. – №2. – С. 40-47. – URL: <https://zabmedvestnik.ru/journal/2019/2/5.pdf> (дата обращения: 17.01.2020).

Прочие:

6. Марковский А.В. Полиморфизм генов белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский // Медицина завтрашнего дня : материалы XIII конференции, посвященной 60-летию СНО Читинской государственной медицинской академии, часть II, Чита, 22-25 апреля 2014 г. – Чита, 2014. – С. 68.
7. Марковский А.В. Частота и взаимосвязь полиморфизма генов *BRCA1/2* и белков фолатного цикла у больных раком молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский // Материалы V (XII итоговой) конференции, посвященной 70-летию ЮУГМУ, г. Челябинск, 2 октября 2014 г. – Челябинск : Издательство Южно-Уральского государственного медицинского университета, 2014. – С. 85-87. – ISBN 978-5-94507-196-4.
8. Марковский А.В. Уровень гомоцистеина в сыворотке крови у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков // Медицина завтрашнего дня: материалы XV конференции, Чита, 19-22 апреля 2016 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2016. – С. 203-204.
9. Марковский А.В. Уровень глутатиона и цистеина в сыворотке крови у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы в Забайкалье / А.В. Марковский, Н.Н. Страмбовская, П.П. Терешков // Медицина завтрашнего дня : материалы XV научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Чита, 19-22 апреля 2016 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2016. – С. 204-205.
10. Марковский А.В. Аддитивный эффект полиморфизма генов белков фолатного обмена и уровень сывороточного гомоцистеина у больных пролиферативными заболеваниями и раком молочной железы / А.В. Марковский // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины : материалы XVIII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Владивосток, 19 апреля 2017 г. – Владивосток : Медицина ДВ, 2017. – С. 223-225. – ISBN 978-5-98301-112-0.
11. Марковский А.В. Генетический полиморфизм генов фолатного обмена при основных гистотипах рака молочной железы / А.В. Марковский // VIII международный молодежный медицинский конгресс. Санкт-Петербургские научные чтения-2019, Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 210-211.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ДОМЖ	доброкачественные образования молочных желез
ИГХ	иммуногистохимическое исследование
КГ	контрольная группа
МЖ	молочная железа
ПЗМЖ	пролиферативные заболевания молочных желез
РМЖ	рак молочной железы
IGI	индивидуальный генетический индекс
MDR	многофакторный анализ размерности
MTHFR	метилентетрагидрофолатредуктаза
MTR	метионинсинтаза
MTRR	редуктаза метионинсинтазы
SNP	однонуклеотидный полиморфизм