

УДК: 618.19-006:[615.8+615.277.3]:616.24.001:615.06+575.224

І.Ф. ХУРАНИ

Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова, кафедра променевої діагностики, променевої терапії та онкології, Вінниця

ВПЛИВ МУТАЦІЙ МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ НА РОЗВИТОК ХІМІО-ПРОМЕНЕВИХ ЛЕГЕНЕВИХ УШКОДЖЕНЬ У ХВОРИХ НА РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Дослідження присвячено вивченню ролі генетичних факторів в розвитку ускладнень хіміо-променевого лікування з боку дихальної системи у хворих на рак грудної залози. За допомогою спіральної комп'ютерної томографії (СКТ) встановлено, що у 36,4% хворих, що отримували хіміо-променево лікування, протягом першого року розвивається фіброз легень. В усіх хворих значно знижуються показники зовнішнього дихання, сатурації кисню, підтримується хронічний запальний процес. Мутація С677Т (гетерозиготний генотип) гена МТНFR сприяє зниженню опірності легеневої тканини хворих до хіміо-променевого впливу і у 100% пацієнтів призводить до розвитку фіброзу легень. У хворих з гомозиготним С/С генотипом пневмофіброз розвивається лише у 8,6% випадків.

Ключові слова: рак грудної залози, хіміо-променево лікування, мутація гена метилентетрагідрофолатредуктази (МТНFR)

Вступ. Метилентетрагідрофолатредуктаза (МТНFR) – фермент, що відіграє важливу роль у метаболізмі фолієвої кислоти, необхідної для утворення метіоніну і S-аденозилметіоніну, який відіграє ключову роль в процесі метилювання ДНК. Дефіцит МТНFR сприяє мутагенному пошкодженню ДНК з інактивацією багатьох клітинних генів, у тому числі – онкогенів. Це одна з причин підвищеної зацікавленості онкологів генетичними варіантами МТНFR. Інша полягає в тому, що порушення ферменту МТНFR призводять до надмірного накопичення гомоцистеїну в плазмі крові, який є проміжним продуктом процесу синтезу метіоніну, а з гіпергомоцистеїнемією (ГГ) пов'язана ціла низка захворювань, в тому числі онкологічних. ГГ є незалежним від гіперліпідемії чинником ризику атеросклерозу, атеротромбозу, гіпертонічної хвороби, цукрового діабету, аденоми і раку товстого кишечника тощо.

Відомо близько двох десятків мутацій гена МТНFR, що порушують функцію ферменту. Найбільш вивченою мутацією є варіант, у якому нуклеотид цитозин (С) у позиції 677 замінений тимідином (Т). Такий поліморфізм МТНFR позначається як мутація С677Т, або С/Т. У осіб, гомозиготних за даною мутацією (генотип Т/Т), відзначається зниження активності ферменту приблизно до 35% від середнього значення. Мутація гена 677Т МТНFR поширена досить широко у представників північноамериканської та європейської раси, у яких генотип С/Т або Т/Т спостерігаються в 62-72% випадків.

Дефекти в даному гені часто призводять до різних захворювань з широким спектром клінічних симптомів: розумове та фізичне відставання в розвитку, кардіоваскулярні та нейродегенеративні захворювання, діабет, рак та інші. Куріння

посилює вплив мутації. Гомозиготна мутація 677Т трапляється набагато частіше у пацієнтів з кардіоваскулярними захворюваннями, ніж у здорових донорів. У молодих пацієнтів, що мали ішемію артерій, гомозигота Т/Т трапляється в 1,2 разу частіше. Наявність мутації 677Т у гені МТНFR у хворих з антифосфоліпідним синдромом корелює з рецидивуючим плином тромбозів [7]. Виявлено певний, хоча й складний, взаємозв'язок між варіантами МТНFR і розвитком передракових і ракових станів колоректальної зони. Чоловіки-носії Т/Т генотипу, які палять і вживають багато алкоголю, мають в 3,5 разу вищий ризик цих захворювань [1, 5]. Проте деякі дослідники вважають, що без вживання алкоголю, як одного з чинників ризику, мутація 677Т є захисним фактором [3]. Поліморфізм С677Т гена МТНFR вивчався у великій групі єврейських жінок, хворих на рак молочної залози та яєчника, включаючи і спадкові форми, пов'язані з мутаціями генів BRCA. При такому несприятливому генетичному фоні наявність у хворих Т/Т генотипу виявилось істотним фактором обтяжуючим захворювання. Жінки з гетерозиготним генотипом С/Т мали подвійний онкологічний ризик, а у хворих з гомозиготним генотипом Т/Т ризик був підвищений втричі в порівнянні з контрольною групою [2]. Наявність гомозиготної форми 677Т призводить до значного підвищення ризику ГГ. Причинами важкої ГГ, при якій можливе 40-кратне підвищення рівня гомоцистеїну є Т/Т генотип МТНFR, дефіцит метіонінсинтетази і генетичні порушення метаболізму вітаміну В12. Корекцію ГГ можна провести надходженням необхідних для метаболізму гомоцистеїну фолієвої кислоти, вітамінів В12, В1 і В6 [4] та антиоксидантною терапією [6]. У носіїв двох алелів Т/Т (гомозиготний стан) особливо високий

ризик розвитку побічних ефектів при прийомі лікарських препаратів, що використовуються в хіміотерапії раку.

Мета дослідження. Вивчити вплив мутації MTHFR на розвиток легеневих ускладнень хіміо-променевого лікування хворих на рак грудної залози.

Матеріали та методи. В дослідженні брало участь 33 хворих на рак грудної залози з I-II стадією захворювання, які отримували комбіноване (хіміо-променево) лікування в онкологічній клініці Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова у 2009-2010 рр. Середній вік пацієнтки склав $47,9 \pm 8,5$ року. Хворим проводилась поліхіміотерапія за схемою CMF (cyclophosphamide – 2000 мг, methotrexate – 120 мг, fluorouracil – 2000 мг) та телегаматерапія за радикальною програмою (СОД – 40 Гр.). Спіральна комп'ютерна томографія проводилась на томографі HiSpeed Dual (Китай), функція зовнішнього дихання визначалась за допомогою цифрової спірографії на апараті winspiro PRO (Італія), пульсоксиметрія проводилась на пульсоксиметрії Ютасокси-201 (Україна). Геному ДНК виділяли з лейкоцитів периферійної крові за допомогою реагенту «ДНК-експрес-кровь». Поліморфну ділянку C677T гена метилентетрагідрофолат редуктази ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням аель-специфічних олігонуклеотидних праймерів (ЛиТех, Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» („ДНК-Технологія”, Росія). Продукти ампліфікації виявляли за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі при напрузі 10-15 V на 1 см гелю. Гелі фарбували етидіумом бромідом з наступною візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Результати дослідження та їх обговорення. Більш ніж у половині всіх хворих після проведеного комбінованого лікування розвивались легеневі ускладнення різного ступеня вираженості. Від тимчасових розладів дихання, зумовлених пульмонітом або альвеолітом, до дихальної недостатності, із задишкою, зниженням ЖЕЛ та інших показників зовнішнього дихання, що мали тривалий характер і закінчились формуванням пневмофіброзу.

Основними клінічними проявами легеневих ушкоджень були: задишка, кашель, лихоманка, загальна слабкість. Задишка після закінчення лікування турбувала майже 70% (23 пацієнтки) всіх хворих, через 6 місяців залишалась у 16 пацієнтки (48,5%) і на момент контрольного обстеження, через 1 рік після лікування, залишалась у 12 хворих (36,4 %) хворих. Кашель відзначали 22 пацієнтки (66,6%), через 6 місяців він турбував 16 хворих (48,5%) і через рік залишився у 14 хворих (42,4%). Лихоманка і різка слабкість, які після закінчення лікування були у 72,7% хворих, пов'язані з гострим пневмонітом,

через півроку і через рік хворих не турбували, хоча у 12 хворих (36,4%) залишалась субфібрильна температура, високе ШОЕ і зсув лейкоцитарної формули вліво. Саме у цих хворих визначались на СКТ явища фіброзу легень.

Рентгенологічна картина пневмофіброзу характеризувалась наявністю перібронхіальних і переваскулярних лінійних тяжів, направлених до кореня легені, деформацією і зміщенням кореню, зближенням елементів легеневого малюнку і зменшенням об'єму уражених ділянок легень. Спостерігалась зміна плеври у вигляді плевродіафрагмальних і плевроперикардіальних зрощень. Клінічні симптоми пневмофіброзу, як правило, обмежувались проявами періодичного кашлю з виділенням харкотиння, задишкою при фізичному навантаженні, підвищенням температури тіла до субфібрильної і незначною загальною слабкістю.

В експериментальних дослідженнях на щурах різних генетичних ліній нами раніше було показано, що стійкість легеневої тканини до хіміо-променевої травми генетично обумовлена (І.Ф.Хурані і співавт, 2011). Тому ми вирішили виявити залежність дихальних ускладнень хіміо-променевої терапії у хворих від виду мутації MTHFR.

При проведенні генетичного аналізу мутації гена MTHFR по типу С/Т (гетерозиготний варіант генотипу) траплявся у 10 хворих (30,3%). У всіх цих хворих розвинулись явища фіброзу легень, що підтверджувались клінічно, даними цифрової спірографії та СКТ. У хворих з генотипом С/С (гомозиготним варіантом) порушення дихання були незначними, або зовсім відсутні і лише у двох хворих на СКТ виявлялись явища пневмофіброзу.

Показники зовнішнього дихання у хворих з мутацією С/Т (гетерозиготний генотип) суттєво відрізнялись від таких у хворих з гомозиготним генотипом і були значно нижчими (табл.1). Так форсована життєва ємність легень (FVC) була в цій групі вірогідно на 17,2% нижчою від норми, максимальна вентиляція легень (MVV) – на 50,3 %, пікова об'ємна швидкість видиху (PEF) – на 43,7 %. Тоді як у хворих з гомозиготним генотипом С/С показники зовнішнього дихання значно менше відрізнялись від норми. Так, FVC в цій групі була нижчою від норми лише на 9,2%, MVV – на 15,3% і PEF – на 14,4% (див. табл.1).

У хворих з мутацією С/Т суттєво знизилась показники середньої об'ємної швидкості (FEF2575) та миттєвої об'ємної швидкості (FEF 25, 50, 75 л/с.), які також були значно нижчими показників хворих гомозиготним генотипом.

Частота дихання у спокої у хворих з гомозиготним генотипом складала $18,43 \pm 0,9$, а у хворих з С/Т мутацією $20,7 \pm 4,6$ за хвилину.

Залежність показників зовнішнього дихання у хворих на рак грудної залози від поліморфізму гена MTHFR. (12 міс. після хіміо-променевого лікування)

Показники зовнішнього дихання	Мутація С/С (гомозиготний генотип)		Мутація С/Т (гетерозиготний генотип)	
	Фактичний показник	% від норми	Фактичний показник	% від норми
FVC л.	2,72±0,28	90,8±6,5	2,3±0,57	72,8±20,7
MVV л/м.	78,47±11,08	84,78±10,48	48,41±23,57	49,7±24,06
PEF л/с.	5,07±0,73	85,65±8,6	3,42±1,34	56,30±22,25
FEF2575 л/с.	2,55±0,39	86,48±6,35	2,01±0,55	65,70±20,13
FEF25 л/с.	4,46±0,48	81,83±7,01	3,95±1,79	60,40±18,76
FEF50 л/с.	2,8±0,21	79,3±3,45	2,1±0,62	58,9±18,28
FEF75 л/с.	1,1±0,12	78,4±4,19	0,808±0,29	58,3±18,55

При проведенні пульксиметрії ефективним діагностичним параметром, що визначався у наших хворих, була сатурація кисню. Так сатурація кисню у хворих з генотипом С/С складала 94,9% від норми, тоді як у хворих з мутацією С/Т тільки 87,0 %.

Висновки.

1. Застосування у хворих на рак грудної залози хіміо-променевого лікування викликає розвиток пневмофіброзу у 36,4% хворих, що супроводжується значним зниженням показників зовнішнього дихання (форсованої ємності на 17,2%, максимальної вентиляції легень на 50,3%, пікової об'ємної швидкості видиху на 43,7 %, сатурації кисню на 13%.

2. Резистентність легеневої тканини хворих на рак грудної залози до хіміо-променевого впливу генетично детермінована і залежить від мутації гену MTHFR. Мутація С677Т (гетерозиготний генотип) у 100% випадків призводить до розвитку

фіброзу легень. У хворих з гомозиготним С/С генотипом пневмофіброз розвивається лише у 8,6% випадків.

При лікувальних заходах суб'єктивне покращення настає досить швидко, проте покращення за рентгенографічними даними виникає значно повільніше, тому легше попередити розвиток пневмофіброзу ніж його лікувати.

На сьогоднішній день генетичні дослідження є досить дорогим методом, але вони дозволяють з найбільшою вірогідністю виявити хворих зі схильністю до хіміо-променевої пошкодження дихальної системи. Метод дозволить виявляти хворих з високим ступенем ризику ще до початку лікування і запровадити до них систему превентивних заходів, таких як спеціальне харчування, вітамінотерапія, використання сучасних антиоксидантних препаратів. Все це може стати перспективою для подальших досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Association between MTHFR polymorphism (C677T) with nonfamilial colorectal cancer / M. Haghghi, R. Radpour, T. Mahmoudi [et al.] // *Oncol Res.* — 2009. — Vol.18, №2-3. — P. 57—63.
2. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women / R. Gershoni-Baruch, E. Dagan, D. Israeli [et al.] // *Eur J Cancer.* — 2000. — Vol.36, №18. — P. 2313—2316.
3. Lack of Influence of the ADH1B Arg47His Genetic Polymorphism on Risk of Colorectal Adenoma in Middle-aged Japanese Men / G. Yin, N. Hamajima, M. Morita [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2011. — Vol.12, №1. — P. 297—302.
4. Methylene tetrahydrofolate reductase mutation and stroke in a monozygotic twin / J. Eikelboom, I. Saharay, R. Baker [et al.] // *Aust N Z J Med.* — 1998. — Vol.28, №6. — P. 849—850.
5. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism (677 C>T) predicts long time to progression in metastatic colon cancer treated with 5-fluorouracil and folic acid / O. Castillo-Fernández, M. Santibáñez, A. Bauza [et al.] // *Arch Med Res.* — 2010. — Vol.41, №6. — P. 430—435.
6. Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1 / C. Lemarié, L. Shbat, C. Marchesi [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* — 2011. — Vol.300, №3. — P. 745—753.
7. Treatment of erectile dysfunction due to C677T mutation of the MTHFR gene with vitamin B6 and folic acid in patients non responders to PDE5i / F. Lombardo, P. Tsamatopoulos, E. Piroli [et al.] // *J Sex Med.* — 2011. — Vol.1, №1. — P. 216—223.

I.F. CHYRANY

Vinnitsia National Medical University, Department of radiation diagnosis, radiotherapy and oncology; Vinnitsia

METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE MUTATION EFFECTS ON DEVELOPMENT OF CHEMORADIATION PULMONARY INJURIES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Research is dedicated to study of the genetic factors role in the development of complications of chemoradiotherapy on the side of the respiratory system in breast cancer patients. With the help of SKT it was found that pulmonary fibrosis developed in 36.4% patients, receiving chemoradiotherapy during the first year. In all patients the indices of external respiration and oxygen saturation reduce significantly, the chronic inflammatory process is maintained. S677T mutation (heterozygous genotype) of the MTHFR gene reduces the resistance of the patients lung tissue with chemoradio influence and in 100% of patients it leads to pulmonary fibrosis. In homozygous C/C genotype patients pulmonary fibrosis develops only in 8.6% cases.

Key words: breast cancer, chemoradiotherapy, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene mutation

Стаття надійшла до редакції: 2.06.2011 р.