

Влияние мутации гена MTHFR на активность прооксидантных и профибротических агентов и уровень гомоцистеина у больных раком грудной железы

Хурани Ияд Фахид, Чень Ань Жань

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Исследование посвящено изучению роли мутаций гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в активации медиаторов воспаления и профибротических агентов у больных раком грудной железы (РГЖ). Установлено, что распространенность мутации гена С677Т MTHFR у больных РГЖ выше, чем в общей популяции. У больных с гетерозиготной СТ и особенно гомозиготной ТТ аллелей гена MTHFR достоверно увеличивается уровень гомоцистеина, интелейкина-6, трансформирующего фактора роста- β_1 , свободного оксипролина и маркеров оксидативного стресса. Это повышает риск развития фиброза легких после проведения химиолучевой терапии.

Ключевые слова: рак грудной железы, мутации гена MTHFR, гомоцистеин, оксидантный стресс, трансформирующий фактор роста- β_1 .

На сегодняшний день большое внимание исследователей уделяется изучению роли отдельных генов в развитии различных патологических процессов. Патогенез целого ряда заболеваний связан с одновременным воздействием повреждающих факторов внешней среды и нарушений в генах. Такие заболевания составляют 92% всей патологии человека [1, 6].

При лечении рака грудной железы (РГЖ) повреждающее действие химиолучевой терапии распространяется не только на опухоль, но и на ряд органов и тканей. Фиброз легких и печени, мукозиты и сосудистые осложнения химиолучевого лечения можно отнести к мультифакториальным заболеваниям. Разная степень их выраженности при стандартных схемах химиолучевой терапии, очевидно, обусловлена генетическими факторами.

Фибротические изменения в органах в ответ на действие химиолучевой терапии происходят благодаря активации прооксидантных и профибротических факторов, уровень которых в организме генетически детерминирован [7].

Одним из компонентов фиброгенеза является депозиция экстрацеллюлярного матрикса, а именно – нарушение равновесия между синтезом коллагена и его деградацией [14].

Известно, что нарушение обмена сульфгидрильной аминокислоты гомоцистеина – гипергомоцистеинемия (ГГ) – один из факторов печеночного и кардиального фиброгенеза [4]. Есть сообщения и о возможной патогенетической роли гомоцистеина в развитии и прогрессировании РГЖ [12]. ГГ не зависит от гиперлипидемии, которая является фактором риска развития атеросклероза, гипертонической болезни, рака толстой кишки, склероза и фиброза внутренних органов.

Известно, что уровень гомоцистеинемии генетически детерминированный и зависит от полиморфизма С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) – фермента, который регулирует реметилирования гомоцистеина. У лиц гомозиготных по данной мутации (генотип ТТ), особенно

часто развиваются побочные эффекты при химиотерапии злокачественных опухолей. Доказано, что полиморфизм С677Т влияет на эффективность применения противоопухолевых средств фторурацила и метотрексата. Возможно, генотипирование по полиморфизму С677Т позволит выделить различные генотипы по фармакогенетическим эффектам химиолучевой терапии у разных пациентов, что позволит персонализировать фармакотерапию [10, 11].

Наличие ТТ-генотипа у больных РГЖ является фактором, отягчающим заболевание [3]. Нами было установлено, что больные РГЖ – гомозиготы ТТ – имеют повышенную склонность к развитию химио-радиоиндуцированного пневмофиброза. Возможно, этот эффект реализуется через ряд биохимических нарушений (как ГГ, активация процессов перекисного окисления липидов, воспаления и фиброгенеза). Поэтому изучение влияния мутации гена MTHFR на биохимические изменения в сыворотке больных РГЖ поможет более полно раскрыть механизм развития постхимиолучевых осложнений и разработать методы их профилактики.

Цель исследования: изучение влияния мутации С677Т гена MTHFR на уровень гомоцистеина, активность провоспалительных и профибротических факторов в сыворотке крови больных РГЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 72 больных репродуктивного возраста ($47,9 \pm 8,5$ года) с I–II стадией РГЖ, которые получали лечение в Винницком областном клиническом онкологическом диспансере. У всех больных определяли полиморфизм С677Т гена MTHFR. Геном ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», полиморфный участок гена амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров (ЛиТех, Россия). Амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Продукты амплификации выявляли с помощью электрофореза в 3% агарозном геле при напряжении 10–15 В на 1 см геля. Гели окрашивали этидиумом бромидом с последующей визуализацией результатов в УФ-свете.

Содержание свободного оксипролина в сыворотке крови определяли по реакции с парадиметиламинобензальдегидом. Содержание С-реактивного протеина (СРП) – иммуноферментным методом с набором «hsCRP ELISA» («DRG», США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Содержание трансформирующего фактора роста- β_1 (ТФР- β_1) по набору «TGF- β_1 » (Biosource, Europe SA). Уровень общего гомоцистеина в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англия) на анализаторе STAT FAX 303/PLUS. Содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) в сыворотке крови опреде-

Содержание гомоцистеина, маркеров воспаления, оксидативного стресса и фиброгенеза у больных с РГЖ в зависимости от генотипа MTHFR (M±m)

Биохимические показатели	MTHFR CC, n=30	MTHFR CT, n=26	MTHFR TT, n=16	Средний, n=72
Гомоцистеин, мкмоль/л	11,1±0,28	12,1±0,36*	14,8±0,34**	12,2±0,25
ИЛ-6, пг/мл	7,17±0,23	10,1±0,28*	12,8±0,56**	9,48±0,32
СРП, мг/л	4,78±0,23	5,53±0,23*	5,91±0,29*	5,30±0,15
МДА, мкмоль/л	6,91±0,15	7,69±0,20*	10,3±0,26**	7,94±0,19
Карбонильные группы, моль/мг белка	0,81±0,02	0,92±0,02*	1,12±0,03**	0,92±0,02
ТФР-β ₁ , пг/мл	130±1,89	137±2,33*	173±3,68**	142±2,43
Оксипролин, мкмоль/л	13,3±0,34	14,0±0,35	16,2±0,24**	14,2±0,24

Примечание: * – показатель является достоверным (p<0,05) по отношению к группе CC; ** – показатель является достоверным (p<0,05) по отношению к группе CT.

Содержание биохимических маркеров в сыворотке крови пациентов с РГЖ (n=72) в зависимости от ранжирования уровня гомоцистеина (M±m)

Показатели	Ранжирование уровня гомоцистеина		Коэффициенты корреляции
	<15 мкмоль/л	>15 мкмоль/л	
ТФР-β ₁ , пг/мл	138±2,40	161±6,25 p<0,01	0,66
Оксипролин, мкмоль/л	13,7±0,22	16,7±0,45 p<0,01	0,54
ИЛ-6, пг/мл	8,93±0,30	12,5±0,82 p<0,01	0,64
СРП, мг/л	5,12±0,16	6,32±0,37 p<0,05	0,44
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	7,57±0,18	10,0±0,38 p<0,001	0,70
Карбонильные группы, нмоль/мг белка	0,88±0,02	1,08±0,03 p<0,001	0,61

Примечание: * – коэффициенты корреляции r≥0,30 достоверны (p<0,05).

ляли иммуноферментным методом с использованием стандартного набора «IL-6 ELISA» фирмы «Diaclone», Франция (в соответствии с инструкцией фирмы-производителя).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частота гомозиготного носительства мутации С677Т в гене MTHFR среди жителей Винницкой области составляет, по данным литературы, около 11,0%. Полученные нами данные свидетельствуют, что среди 72 больных с РГЖ мутации С677Т оказывались в 58,3% пациенток (гетерозигот СТ – 36,1%, гомозигот ТТ – 22,2%), гомозигот СС (дикий тип) – лишь у 41,7%. Итак, среди больных РГЖ значительно преобладают лица с генетически детерминированной предрасположенностью к ГГ.

При проведении биохимического анализа сыворотки крови пациенток с РГЖ средний показатель уровня гомоцистеина составил 12,2±0,25 мкмоль/л (табл. 1). Отмечались значительные колебания уровня гомоцистеина от 7,2 до 16,7 мкмоль/л, причем ГГ (концентрация выше 15 мкмоль/л) оказывалась у 15,3% обследованных больных, что также превышает распространенность ГГ в популяции Подольского региона, которая встречается у 10% здоровых лиц [3].

ГГ у больных с РГЖ ассоциировалась с носительством Т-аллеля: содержание гомоцистеина у гетерозигот СТ и, особенно, у гомозигот ТТ достоверно превышал таковой у гомозигот дикого типа (СС) на 9,0% и 33,3% соответственно. ГГ регистрировалась у 3,3% больных РГЖ с генотипом СС и у 50,0% больных с генотипом ТТ.

В сыворотке крови пациенток РГЖ с разным генотипом MTHFR выявляли существенные различия в концентрации профиброгенных факторов ТФР-β₁ и оксипролина – марке-

ра деструкции коллагеновых белков соединительной ткани (см. табл. 1).

Так, у пациентов с генотипом СС уровень ТФР-β₁ колебался от 112 до 154 пг/мл и в среднем 130±1,89 пг/мл. В сыворотке крови пациентов с генотипом СТ и ТТ он был на 5,4% и 33,1% выше, чем у гомозигот СС. Уровень свободного оксипролина в сыворотке крови у гомозигот ТТ также существенно превышал таковой у гомозигот дикого типа (СС).

При анализе базальных уровней маркеров воспалительного процесса – ИЛ-6 и СРП в сыворотке крови больных РГЖ в зависимости от генотипа MTHFR были выявлены существенные различия (см. табл. 1). Так, у гомозигот дикого типа (СС) содержание ИЛ-6 в сыворотке крови колебалось от 4,32 до 10,2 пг/мл и в среднем составляло 7,17±0,23 пг/мл. У носителей Т-аллеля регистрировались достоверно более высокие уровни этого провоспалительного и профиброгенного регулятора: у гетерозигот СТ содержание ИЛ-6 превышал у гомозигот СС на 40,9%, а у гомозигот ТТ – на 78,5%. Подобные межгрупповые различия выявляли и по уровню СРП: его содержание у гетерозигот СТ и гомозигот ТТ был выше на 15,7% и 23,6% соответственно, чем у гомозигот дикого типа.

Полиморфизм С677Т гена MTHFR отображался на активности оксидативных процессов у пациентов с РГЖ (см. табл. 1). Так, у гомозиготных носителей мутации (ТТ) содержание маркеров окислительной деструкции липидов и белков – малонового диальдегида и карбонильных групп – в сыворотке крови превышал таковое у гомозигот дикого типа (СС) на 49,0% и 38,3% соответственно. Более высокие уровни малонового диальдегида и карбонильных групп белков (на 11,3% и 13,6%) регистрировали и у гетерозигот СТ.

Ранжирования уровня гомоцистеина показали, что увеличение базальных уровней профиброгенных и провоспалитель-

тельных медиаторов в сыворотке крови пациентов с РГЖ ассоциируется с развитием ГГ (табл. 2).

В частности, содержание ТФР-β₁, ИЛ-6, СРП у пациентов с РГЖ без ГГ был достоверно ниже на 16,6%, 40,0% и 23,4%, чем у пациентов с высоким уровнем гомоцистеина. Соответственно у пациентов с ГГ содержание свободного оксипролина, маркеров пероксидации липидов и белков также был выше, чем у пациентов с нормогомоцистеинемией. Выявленные закономерности подтвердили и результаты корреляционного анализа: тесные связи оказывались между содержанием гомоцистеина, с одной стороны, и уровнем ТФР-β₁, ИЛ-6, маркеров оксидативного стресса – с другой.

Таким образом, распространенность мутации гена C677T MTHFR у пациентов с РГЖ выше, чем в общей популяции. Указанный полиморфизм детерминирует различия не только в базальном уровне гомоцистеина в сыворотке крови, но и в содержании весомых регуляторов фибротических и воспалительных процессов – ТФР-β₁, ИЛ-6.

Вплив мутації гена MTHFR на активність прооксидантних і профібротичних агентів і рівень гомоцистеїну у хворих на рак грудної залози
Хурані Іяд Фахід, Чень Ань Жань

Дослідження присвячене вивченню ролі мутацій гена метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) в активації медиаторів запалення і профібротичних агентів у хворих на рак грудної залози (РГЖ). Встановлено, що поширеність мутації гена C677T MTHFR у хворих на рак молочної залози вище, ніж у загальній популяції. У хворих з гетерозиготною СТ і особливо гомозиготною ТТ алелів гена MTHFR достовірно збільшується рівень гомоцистеїну, інтерлейкіну-6, трансформівного фактора росту-β₁, вільного оксипроліну та маркерів оксидативного стресу. Це підвищує ризик розвитку фіброзу легенів після проведення хіміопроменевої терапії.

Ключові слова: рак грудної залози, мутації гена MTHFR, гомоцистеїн, оксидантний стрес, трансформівний фактор росту-β₁.

Более высокие уровни профиброгенных и провоспалительных медиаторов могут детерминировать повышенную склонность к развитию гиперкоагуляторных, сосудистых и склеротических процессов, особенно после проведения химиолучевой терапии. У таких больных повышенный риск развития тромбозов, кардиосклероз, пневмо- и гепатофиброза.

ВЫВОДЫ

1. Полиморфизм гена C677T MTHFR у больных раком грудной железы (РГЖ) встречается в 5 раз чаще в общей популяции лиц Подольского региона и приводит к накоплению лиц с генетически детерминированной предрасположенностью к ГГ, особенно при гомозиготном ТТ-генотипе.

2. ГГ тесно коррелирует с маркерами воспаления, фиброгенеза и оксидативного стресса (ТФР-β₁, r=0,66; ИЛ-6 r=0,64; оксипролина r=0,54; МДА r=0,70; карбонильных групп белков r=0,61), что может быть прогностически неблагоприятным фактором в лечении больных РГЖ.

MTHFR gene mutations effect on the activity of prooxidant and profibrotic agents and homocysteine levels in patients with breast cancer
Hourani Iyad Fahid, Chen An Jn

This thesis is devoted to the studying of the gene methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in inflammation mediators activation, prooxidant and profibrotic agents in patients with breast cancer. It was found that the prevalence of C677T MTHFR mutations in patients with BC is higher than in the general population. In patients with heterozygous CT and homozygous TT allele of MTHFR gene significantly increases homocysteine level, interleykin-6, SRP, TGF-β₁, free oxyproline and markers of oxidative stress. This increases the risk of pulmonary fibrosis, especially after chemotherapy.

Key words: breast cancer, MTHFR gene mutations, homocysteine, oxidative stress, markers of inflammation, TGF-β₁.

Сведения об авторах

Хурані Іяд Фахід – Винницький національний медичинський університет ім. Н.І. Пирогова, 21018, г. Винниця, ул. Пирогова, 56. E-mail: drhourani@yahoo.com
Чень Ань Жань – Винницький національний медичинський університет ім. Н.І. Пирогова, 21018, г. Винниця, ул. Пирогова, 56

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дидковский Н.А. Наследственные факторы при болезнях органов дыхания / Н.А. Дидковский, М.А. Жарова // Пульмонологии. – 2005. – № 4. – С. 53–60.
2. Куликова Н.А. Медицинская генетика / Куликова Н.А., Л.Е. Ковальчук. – К.: Укрмедкнига, 2004. – 188 с.
3. Патогенетические аспекты гипергомоцистеинемии и перспективы создания лекарственных средств для лечения патологии, ассоциированной с нарушениями обмена гомоцистеина / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, Н.В. Заичко и др. // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2008. – № 10. – С. 297–303.
4. Пентюк Н.А. Метаболические предикторы фиброза печени у больных хроническими гепатитами / Пентюк Н.А. // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2011. – № 1. – С. 134–138.
5. Полиморфизм C677T гена MTHFR у больных псориазом / О.М. Федота, П.П. Рижко, Л.В. Рощенко и др. // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. – 2010. – № 920. – С. 37–41.
6. Путинцева Г.И. Медицинская генетика. – М.: Медицина, 2008. – 392 с.
7. Хурані І.Ф. Влияние кверцетина и тиотриазолина на химиолучевое повреждение легких у крыс разных генетических линий / И.Ф. Хурані // Фармакология и лекарственная токсикология. – 2011. – № 3. – С. 57–63.
8. Черняев А.Л., Самсонова М.В. Воспаление при хронической обструктивной болезни легких // CONSILIUM MEDICUM UKRAINE. – Т. 5, № 1. – 2011. – С. 9–14.
9. Association of a functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-12 promoter region with systemic sclerosis in an Italian population / M. Manetti, L. Ibba-Manneschi, C. Fatini et al. // J rheumatol. – 2010. – V. 37 (9). – P. 1852–1857.
10. Association of polymorphisms MTHFR C677T and A1298C with risk of colorectal cancer, genetic and epigenetic characteristic of tumors, and response to chemotherapy / Fernández-Peralta AM, Daimiel L., Nejdá N. et al. // Int. j. colorectal dis. – 2010. – № 25 (2). – P. 141–151.
11. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C -> T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients / G. Toffoli, A. Russo, F. Innocenti et al. // Int. j. cancer. – 2003. – № 103 (3). – P. 294–299.
12. Lu M. Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects / M. Lu, F. Wang, J. Qiu // Breast Cancer Res Treat. – 2010. – V. 123 (1). – P. 213–217.
13. Mac Dougall J.R. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis / JR Mac Dougall, L.M. Matrisian // Cancer metastasis rev. – 1995. – V. 14 (4). – P. 351–362.
14. Muscle protein turnover in the adult fowl, 3: collagen content and turnover in cardiac and skeletal muscles in the adult fowl (Gallus domesticus) and the changes during stretch-induced growth / Laurent GL, Bates P.C. Sparrow M.C., Milward D.J. // Biochem j. – 1978. – V. 176. – P. 419–427.

Статья поступила в редакцию 24.12.2014