

Вклад полиморфных вариантов генов фолатного цикла в цитогенетическую нестабильность клеток крови больных раком легкого

Баканова М.Л.¹, Соболева О.А.¹, Минина В.И.^{1,2}, Савченко Я.А.¹, Рыжкова А.В.¹, Титов Р.А.¹, Титов В.А.³, Боярских У.А.⁴, Воронина Е.Н.⁴, Глушков А.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», mari-bakano@ya.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет»

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Кемеровской области Областной клинический онкологический диспансер

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Объектом исследования являлись 338 жителей Кемеровской области, подобранные по принципу «случай-контроль» с учетом возраста, пола, этнической принадлежности и статуса курения. Были сформированы две группы: 1) 163 чел., первично обратившиеся для диагностики и лечения в Кемеровский областной онкологический диспансер (диагноз рак легкого (РЛ) устанавливался специалистами областного онкологического диспансера после проведенного обследования); 2) 175 чел. — здоровые доноры Кемеровского областного центра крови, которые составили группу сравнения. Все обследованные — русские мужчины старше 40 лет, курильщики. Целью данного исследования стал сравнительный анализ полиморфных вариантов генов фолатного цикла и частоты хромосомных aberrаций у больных РЛ и индивидов, не имеющих онкологических заболеваний, проживающих в той же местности. Исследование осуществляли с использованием 1) стандартного полумикрометода культивирования лимфоцитов крови для получения препаратов хромосом и дальнейшего анализа хромосомных aberrаций, 2) полимеразной цепной реакции синтеза ДНК в режиме реального времени (TaqMan assay) для изучения полиморфных вариантов генов *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* и *MTRR A66G*. Статистическая обработка материала проводилась с использованием методов непараметрической статистики (Mann–Whitney U Test для парных сравнений количественных признаков), логистической регрессии (для выявления ассоциации полиморфных локусов в различных моделях (аддитивной, доминантной, сверхдоминантной, рецессивной, лог-аддитивной) с учетом количественных и бинарных признаков), метода Multifactor Dimensionality Reduction (для исследования межгенных взаимодействий). Установлено, что у больных РЛ статистически значимо чаще, чем в контрольной группе, регистрировались клетки крови с хромосомными aberrациями как хроматидного, так и хромосомного типов. Наиболее высокая частота aberrаций хромосомного типа регистрировалась у больных РЛ — обладателей минорных вариантов гена *MTHFR T/T* и *MTHFR C/T*, кодирующих ферменты со сниженной функциональной активностью. Полученные результаты указывают на возможность влияния нарушений фолатного цикла на структурную целостность хромосом в условиях канцерогенных воздействий среды.

Ключевые слова: рак легкого; гены фолатного цикла; *MTHFR*; *MTR*; *MTRR*; хромосомные aberrации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ: 16-15-00034 «Разработка тест-системы для доклинической диагностики онкологических рисков у рабочих предприятий угольного цикла».

Association of polymorphism of folate metabolism genes and chromosomal aberrations in blood cells of lung cancer patients

Bakanova M.L.¹, Soboleva O.A.¹, Minina V.I.^{1,2}, Savchenko Ya.A.¹, Ryzhkova A.V.¹, Titov R.A.¹, Titov V.A.³, Boyarskih U.A.⁴, Voronina E.N.⁴, Glushkov A.N.¹

¹ Federal State Budget Scientific Institution «The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», mari-bakano@ya.ru

² Kemerovo State University

³ Kemerovo Regional Clinical Oncological Dispensary

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences

In the presented «case-control» study 338 residents of the Kemerovo Region subject to age, sex, ethnicity and smoking status were included. We formed two groups: 1) «Case» — 163 newly diagnosed lung cancer patients undergoing a medical treatment in the Kemerovo Regional Oncology Center (diagnosis «lung cancer» was determined by experienced doctors from the Kemerovo Regional Oncology based on the results of special medical examination); 2) «Control» — 175 healthy donors of the Kemerovo Regional Center of Blood Transfusion. All donors included in the research were smoking Russian men over 40 years old. The aim of this study was the comparative analysis of polymorphic variants of folate metabolism genes and chromosomal aberrations (CAs) in lung cancer patients

and healthy donors resident in the same territory. The following methods were used in our investigation: 1) the routine method of lymphocytes cultivation and chromosomal aberration analysis; 2) the real-time polymerase chain reaction using TaqMan assay for a study of the *MTHFR* gene C677T polymorphism, the *MTR* gene A2756G polymorphism and the *MTRR* gene A66G polymorphism. Statistical analysis were performed using nonparametric statistics (Mann-Whitney U Test for paired comparison of quantitative characteristics), logistic regression (for determination of association of polymorphism in additive, dominant, overdominant, recessive and log-additive models subject to quantitative and binary characteristics), Multifactor Dimensionality Reduction method (for investigation of gene-gene interactions). It was determined that the CAs frequency (both chromatid- and chromosome-type aberrations) was significant increased in lung cancer patients compared to control group. The greatest frequency of chromosome-type aberrations was determined in lung cancer patients with the minor allelic variant (T/T and C/T) on the *MTHFR* gene. Carriers of such genotype are characterized by decreased functional activity of enzymes. Obtained results suggest the possible effect of failure in folate cycle to the chromosomal instability in conditions of cancerogenic load of environment.

Key words: lung cancer; folate metabolism genes; *MTHFR*; *MTR*; *MTRR*; chromosomal aberrations.

Введение

Рак легкого (РЛ) — одна из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний во всем мире. В России РЛ лидирует в структуре заболеваемости и смертности мужчин от злокачественных новообразований. Среди известных причин, вызывающих развитие РЛ, первое место занимает курение [1]. Табачный дым на сегодня является самым распространенным из доказанных для человека канцерогенов. Однако негативные эффекты курения характеризуются гетерогенностью, связанной с особенностями индивидуальной чувствительности к действию мутагенов и канцерогенов табачного дыма.

Изучение наследственной предрасположенности к формированию РЛ стало в последние годы предметом широкомасштабных исследований во всем мире. Секвенирование (next generation sequencing), выявление драйверных мутаций (в генах *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2* и других), поиск специфических хромосомных перестроек (fusion of *ALK*, *C-ROS1*, *RET*, *NTRK1*), изучение профиля метилирования ДНК опухолевых клеток, анализ полиморфных вариантов генов-кандидатов (контролирующих ключевые компоненты репарации ДНК, биотрансформации ксено- и эндобиотиков, антиоксидантной защиты, контроля клеточного цикла, апоптоза, метаболизма фолатов) позволили выявить достаточно большое количество маркеров, ассоциированных с формированием РЛ в различных популяциях мира [2–5]. Однако получаемые результаты требуют верификации. Низкая воспроизводимость результатов в области молекулярно-генетических исследований рака [6] может быть связана с чрезвычайной вариабельностью раковых опухолей, многообразием действующих факторов среды, расовыми и этническими особенностями, с генетической гетерогенностью популяций, с особенностями ген-генных и ген-средовых взаимодействий.

Установлено, что значимую роль в наследственной предрасположенности к формированию геномной нестабильности и раку способны играть гены, контролирующие метаболизм фолатов. Механизмы работы ферментов фолатного цикла и функциональные эффекты замен в генах на настоящий момент достаточно подро-

но описаны. Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) — ключевой фермент фолатного цикла, который катализирует превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат. Метильная группа 5-метилтетрагидрофолата — донор для реметилирования гомоцистеина в метионин [7]. Этот процесс катализируется ферментом метионинсинтазой (*MTR*). В восстановлении *MTR* принимает участие метионин-синтаза-редуктаза (*MTRR*) [8]. В литературе имеются данные о значимой роли полиморфных вариантов генов *MTR A2756G (rs1805087)*, *MTRR A66G (rs1801394)*, *MTHFR C677T (rs1801133)* в процессах метилирования ДНК и регулирования концентрации гомоцистеина в крови [8, 9]. Установлено, что недостаточная активность ферментов может привести к снижению уровня S-аденозилметионина (*SAM*), вызывая гипометилирование ДНК и активацию протоонкогенов [10]. Кроме того, снижение активности фермента *MTHFR* приводит к избыточному накоплению токсичного гомоцистеина, что способно вызывать повреждение ДНК. Ряд работ посвящен исследованию полиморфных вариантов генов фолатного цикла в связи с риском развития онкопатологии [3–5] и формированием хромосомных нарушений, связанных с врожденными пороками и потерями плода [11, 12]. В то же время совсем мало известно об их влиянии на геномную нестабильность у онкобольных.

Одна из наиболее часто изучаемых форм цитогенетических аномалий, вызванных воздействием мутагенов — увеличение уровня хромосомных aberrаций (*ХА*) в лимфоцитах периферической крови человека. Анализ уровня хромосомных нарушений в клетках крови получил широкое распространение не только в области эколого-генетических исследований (как биомаркер эффекта действия генотоксикантов), но и при изучении индивидуальной предрасположенности к онкологическим заболеваниям (как биомаркер индивидуальной чувствительности). Цитогенетический анализ клеток крови стал активно применяться при исследовании больных с солидными опухолями в связи с развитием методов жидкостной биопсии, а также с изучением нетрансформированных клеток онкобольных [13, 14].

Целью данного исследования стал анализ полиморфных маркеров *rs1801133* (ген *MTHFR*), *rs1805087* (ген *MTR*), *rs1801394* (ген *MTRR*) и цитогенетической нестабильности (хромосомных aberrаций) в клетках крови больных РЛ, проживающих в Российской Федерации.

Материалы и методы

Было обследовано 338 жителей Кемеровской области. *Критерии включения:* мужчины, курильщики (стаж курения более 10 лет), жители г. Кемерово в возрасте 40 и более лет, русской национальности. *Критерии исключения:* психические, наследственные, инфекционные, аллергические, аутоиммунные, другие онкологические заболевания (помимо РЛ), наличие родственников с онкологическими заболеваниями (семейные случаи), рентгенологическое облучение и прием лекарственных препаратов до забора крови для анализа.

Дизайн исследования подразумевал проведение сравнительного анализа двух групп. В группу больных РЛ («case») включили 163 чел., первично обратившихся для диагностики и лечения в Кемеровский областной онкологический диспансер (все курильщики, средний возраст на момент обследования 59 лет; индекс курения у 52,8% больных РЛ составил ≥ 40). После проведения обследования специалистами онкологического диспансера у всех обследованных была выявлена немелкоклеточная форма РЛ. У 90 пациентов диагностирована I—II стадия, у 73 чел. — III—IV стадия развития заболевания. У 101 обследованного были выявлены метастазы в лимфоузлы или отдаленные органы. Группу сравнения («control») составили 175 чел. — доноры Кемеровского областного центра крови, близкого возраста (старше 40 лет, средний возраст 50 лет), пола (мужчины), национальности (только русские), статуса курения (все курильщики, индекс курения у 13,3% ≥ 40 , а у 86,7% < 40). Все представители группы сравнения не имели признаков онкопатологии в анамнезе и не имели близких родственников (I, II степень родства) с онкозаболеваниями.

Все обследованные доноры заполняли подробную анкету, а также подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании. Проведенные исследо-

вания соответствовали этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Института экологии человека Сибирского отделения Российской академии наук (Протокол № 16 от «11» сентября 2012).

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях в системы «Вакутейнер» с антикоагулянтом 0,25 мМ ЭДТА-Na (для молекулярно-генетических исследований) и с гепарином (для цитогенетических исследований). Культивирование клеток крови для цитогенетического анализа осуществляли с использованием стандартного полумикрометода. Отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [15]. У каждого индивида анализировали по 200—1000 метафаз. Учитывали частоту клеток, несущих ХА (%), частоту aberrаций хроматидного типа и частоту aberrаций хромосомного типа (рассчитывались как отношение числа aberrаций определенного типа к числу проанализированных метафаз).

Для изучения полиморфных вариантов генов фолатного цикла *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* и *MTRR A66G* из лейкоцитов периферической крови выделяли ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, анализировали при помощи полимеразной цепной реакции синтеза ДНК в режиме реального времени (TaqMan assay, наборы ООО «СибДНК», г. Новосибирск). Полиморфные маркеры, их локализация, структура праймеров и зондов приведены в табл. 1. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала 40—100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100—200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — 0,5 ед. акт./реакц. Амплификацию проводили с использованием амплификатора iCycler iQ 5, Bio-Rad CFX (Bio-Rad, США).

Таблица 1

Характеристика полиморфных маркеров, праймеров и зондов, использованных для типирования методом real-time PCR

Ген/ RefSNP/ полиморфный локус	Локализация	Последовательность праймеров	Последовательность зондов	Ta, °C
<i>MTHFR</i> <i>rs1801133677C>T</i>	1p36.3	5'-ctgaagcactgaaggag-3', 5'-tcacaagcggagaagt-3'	5 -r6g- ctgctgggagccgatttc bhq- 3', 5'- fam -ctgctgggagctcgatttcat bhq-3'	62
<i>MTR</i> <i>rs18050872756A>G</i>	1q43	5'- ctatctgtcattttcagtggtcc -3' 5'- atctgtttctaccacttaccttgag -3'	5'-fam-ctcataatggctcgtgctaa-bhq-3', 5'-r6g -ctcataatggccctgtgctaa- bhq-3'	58
<i>MTRR</i> <i>rs180139466A>G</i>	5p15.31	5'- tgaagtgatgaggaggtttctg-3' 5'- ccttatcggattcactaatacagtg-3'	5 -fam-cttgctcacatattttct-bhq-3 5 -r6g-cttgctcacatattttct-bhq-3	60

Примечание. Та — температура отжига праймеров

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ: «MedCalc Statistical Software version 14.8.1 (MedCalc Software, Belgium), SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>), «Statistica 10.0» (StatSoft, Inc., USA), MDR (<http://www.multifactor dimensionalityreduction.org>). Индекс курения (пачка/год), рассчитывали с помощью онлайн-ресурса: <http://smoking-packyears.com>.

Для цитогенетических показателей рассчитывали медианы (Me), размах (min-max), выборочное стандартное отклонение (STD), средние значения (M), их стандартные ошибки (m). Распределение значений всех изученных количественных показателей сравнивалось с нормальным методом Колмогорова—Смирнова. По результатам анализа установлено, что распределение значений частоты ХА отличалось от нормального. На основании этого в дальнейшем для попарного сравнения использовали ранговый U-тест Манна—Уитни.

Сравнение частот генотипов и аллелей проводили с использованием четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при p (достигнутый уровень значимости) $\leq 0,05$. Для минимизации статистической ошибки первого типа применяли поправку Бонферрони (p_{cor}). Логистический регрессионный анализ использовали для выявления ассоциации полиморфных локусов и хромосомных аберраций в различных моделях (аддитивной, доминантной, сверхдоминантной, рецессивной, лог-аддитивной) с учетом количественных и бинарных признаков. Для выбора лучшей модели использовали информационный критерий Акайке (AIC). Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR_{adj}), которую высчитывали по модифицированной формуле для малых выборок с коррекцией на возраст и индекс курения. Для OR_{adj} рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95% уровне значимости.

Анализ межгенных взаимодействий проводился методом Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) (<http://www.multifactor dimensionalityreduction.org/>).

Результаты

Частоты генотипов и аллелей исследованных полиморфных маркеров представлены в табл. 2. Анализ распределения полиморфных вариантов генов фолатного цикла *MTHFR C677T*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G* показал соответствие равновесию Харди—Вайнберга всех изученных локусов как в группе больных РЛ, так и в группе сравнения. Установлено, что у русских жителей Кемеровской области распределение частот генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов не отличалось от других европеоидных популяций (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Статистически значимых различий частоты встречаемости генотипов и аллелей между группами больных и здоровых выявлено не было (табл. 3). Так, для гена *MTHFR* частота аллеля С составила 71,5% у больных РЛ и 67,1% в группе сравнения. Частота аллеля Т — 28,5% у больных РЛ, 32,9% у доноров из группы сравнения. Для гена *MTR* были получены следующие частоты: 71,5% против 78,6% для аллеля А, и 28,5% против 21,4% для аллеля G. Анализ распределения аллелей гена *MTRR* установил частоту аллеля А — 42,6% против 46,6%, частоту аллеля G — 57,4% против 53,4%. Таким образом, ассоциации между вариантами изученных генов фолатного цикла и риском развития РЛ в данной выборке выявлено не было, что согласуется с выводами других авторов о том, что подобная взаимосвязь в большей степени характерна для азиатских популяций и крайне редко встречается среди европеоидов [4, 5]. В то же время известно, что сниженный уровень функциональной активности ферментов фолатного цикла способен приво-

Таблица 2

Распределение частот генотипов *MTHFR C677T*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G* в группах больных РЛ и здоровых жителей Кемеровской области

Полиморфизм	Генотип	Больные РЛ, % (n)	p exact*	Группа сравнения, % (n)	p exact*	p^{**}
<i>MTHFR</i> <i>rs1801133</i> (677C>T)	C/C	48,5 (79)	0,1259	44,0 (77)	0,6083	0,4753
	C/T	46,0 (75)		46,3 (81)		0,9531
	T/T	5,5 (9)		9,7 (17)		0,2145
<i>MTR</i> <i>rs1805087</i> (2756 A>G)	A/A	50,3 (82)	0,7041	60,6 (106)	0,5002	0,0737
	A/G	42,3 (69)		36,0 (63)		0,2799
	G/G	7,4 (12)		3,4 (6)		0,1717
<i>MTRR</i> <i>rs1801394</i> (66A>G)	A/A	15,3 (25)	0,1714	18,9 (33)	0,1537	0,4757
	A/G	54,6 (89)		55,4 (97)		0,9654
	G/G	30,1 (49)		25,7 (45)		0,4414

Примечание. n — число индивидов; % — частота встречаемости данного генотипа; p exact* — значимость отличий распределения частот генотипов от равновесия Харди—Вайнберга; p^{**} — значимость отличий частоты встречаемости генотипа в сравниваемых группах, критерий χ^2 с поправкой Йетса

доть к инкорпорации урацила в ДНК, снижению эффективности репарации ДНК, возрастанию частоты аберраций хромосом [16].

Результаты изучения хромосомных нарушений в клетках крови обследованных жителей Кемеровской области представлены в табл. 3.

Установлено, что у больных РЛ были статистически значимо выше, чем в группе сравнения все основные цитогенетические показатели: частота клеток с ХА, частота аберраций хроматидного и хромосомного типа. При этом зафиксировано превышение частоты ХА (по сравнению с группой сравнения) у больных РЛ как с I—II (1,73 ± 0,12%; Ме: 1,00 против 3,21 ± 0,21%; Ме: 3,00; p = 0,000001), так и III—IV стадиями РЛ (1,73 ± 0,12%; Ме 1,00 против 2,90 ± 0,21%; Ме: 3,00; p = 0,000001). Частота ХА у пациентов, имеющих метастазы, (3,11 ± 0,19%; Ме: 3,00) и у больных без них (3,00 ± 0,25%; Ме: 3,00) также статистически значимо отличалась от здоровых (p = 0,000001 в обоих случаях). Внутри группы больных РЛ с разными стадиями и метастазами статистически значимые отличия по уровню ХА найдены не были.

Далее уровень ХА изучался у индивидов с различными полиморфными вариантами генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR*. В группе здоровых доноров никаких ассоциаций

между изученными генотипами и ХА выявлено не было. В группе больных РЛ (табл. 4) установлено, что у обладателей генотипа *MTHFR T/T* или *MTHFR C/T* была статистически значимо выше (с учетом поправки Бонферрони) частота встречаемости аберраций хромосомного типа, чем у пациентов с мажорным вариантом данного гена (*MTHFR C/C*). Ассоциация вариантов гена *MTHFR* с наличием аберраций хромосомного типа наиболее значимо проявлялась в лог-аддитивной модели наследования. В лог-регрессионном анализе отношение шансов, скорректированное на возраст и индекс курения составило: $OR_{adj} = 2,46$; 95% CI = 1,40—4,30; $p_{adj} = 0,001$.

Статистически значимые отличия частоты аберраций хромосомного типа наблюдались при сравнении больных РЛ *T/T* против *C/C*, имеющих III—IV стадии заболевания (1,58 ± 0,50%; Ме 1,00 против 0,32 ± 0,10%; Ме 0,00; p = 0,002708; $OR_{adj} = 2,11$; 95% CI = 1,61—2,60; $p_{adj} = 0,03014$) и у больных РЛ с метастазами (1,58 ± 0,50% Ме 1,00 против 0,42 ± 0,10% Ме 0,00; p = 0,006; $OR_{adj} = 1,84$; 95% CI = 1,38—2,29; $p_{adj} = 0,008$).

С помощью MDR-анализа были определены комбинации генных локусов, значимых при формировании хромосомных аберраций у больных РЛ и в группе сравнения. Была выявлена трехлокусная модель:

Таблица 3

Частота встречаемости отдельных типов хромосомных нарушений (%) в сравниваемых группах

Типы хромосомных нарушений	Больные РЛ				Группа сравнения				p
	Ме	Min-max	STD	M ± m	Ме	Min-max	STD	M ± m	
Частота клеток с ХА	3,00	0,00-10,00	1,91	3,07 ± 0,15	1,00	0,00-8,00	1,55	1,73 ± 0,12	0,000001
Аберраций хроматидного типа	2,00	0,00-8,00	1,55	2,29 ± 0,12	1,00	0,00-6,00	1,29	1,31 ± 0,10	0,000001
Аберраций хромосомного типа	0,50	0,00-9,00	1,18	0,81 ± 0,09	0,00	0,00-3,50	0,69	0,44 ± 0,05	0,003765

Примечание. ХА — хромосомные аберрации, Ме — медиана, STD — выборочное стандартное отклонение, M ± m — выборочное среднее и ошибка среднего, p — уровень значимости

Таблица 4

Цитогенетические показатели у больных РЛ с различными вариантами локуса *MTHFR C677T*

Типы хромосомных нарушений	Больные РЛ								
	C/C (n = 79)			C/T (n = 75)			T/T (n = 9)		
	Ме	M ± m	STD	Ме	M ± m	STD	Ме	M ± m	STD
Частота метафаз с ХА	3,00	2,85 ± 0,22	1,99	3,00	3,27 ± 0,21	1,84	3,00	3,29 ± 0,57	1,71
Всего аберраций хроматидного типа	2,00	2,32 ± 0,18	1,62	2,00	2,25 ± 0,14	1,36	2,00	2,28 ± 0,81	2,44
Всего аберраций хромосомного типа	0,00	0,50 ± 0,09	0,80	1,00	1,08 ± 0,17**	1,45	1,00	1,20 ± 0,27*	0,80

Примечание. * — p = 0,0035 — статистически значимое отличие частоты аберраций хромосомного типа у больных РЛ, имеющих генотип T/T, от больных, имеющих генотип C/C (p_{cor} = 0,011); ** — p = 0,0033 статистически значимое отличие частоты аберраций хромосомного типа у больных РЛ, имеющих генотип C/T, от больных, имеющих генотип C/C (p_{cor} = 0,009)

MTR(2756A>G) x MTRR(66A>G) x MTHFR(677C>T), статистически значимо связанная с формированием aberrаций хромосомного типа у больных РЛ (воспроизводимость модели (CVC) -10/10; точность (Pre) = 0,6714; $p = 0,0002$). Модель представлена двумя кластерами генов с дублирующими эффектами (рис. 1). Наибольший вклад в модель вносил локус *MTHFR(677C>T)* (энтропия $H = 5,09\%$). Анализ данной модели в таблицах сопряженности, представляющей собой комбинации всех возможных вариантов трехлокусной модели, выявил несколько протективных и рискованных комбинаций (рис. 2).

В группе здоровых индивидов модели взаимодействия генов при формировании ХА не показали высокой значимости и точности.

Обсуждение

Установлено, что ХА регистрируются у больных РЛ статистически значимо чаще, чем у здоровых. Эти результаты хорошо согласуются результатами цитогенетических исследований больных РЛ, проводившихся нами ранее [17] и с данными литературы относительно темпов хромосомного мутагенеза в клетках крови онкологиче-

ских больных с солидными опухолями. Так, например, у онкобольных жителей Чешской Республики (рак легкого, желудка, молочной железы, простаты, головы и шеи, кожи) было отмечено, что частота ХА составляет $2,53 \pm 1,69\%$, что значимо выше, чем в группе сравнения $1,94 \pm 1,47\%$ [13]. Отмечено статистически значимое повышение частоты стабильных ХА, выявляемых методом FISH в лимфоцитах крови больных РЛ (европеоиды США) [14].

Исследование уровня ХА в связи с полиморфными вариантами генов фолатного цикла *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* и *MTRR A66G* установило значимую ассоциацию генотипа *T/T* и *C/T* гена *MTHFR* с повышенным уровнем aberrаций хромосомного типа у больных РЛ. Известно, что генотипы *C/T* и *T/T* проявляют, сниженную до 60% от среднего, активность фермента [7] и рассматриваются как возможный фактор риска РЛ во многих исследованиях. Так, в японской популяции у больных РЛ OR составил 2,27; 95%CI = 1,42—3,62, $p < 0,01$ для носителей генотипа *T/T* [3]. Arslan с соавт. выявили положительную ассоциацию варианта *T/T* с немелкоклеточным РЛ у жителей Турции (OR = 3,00; 95%CI = 0,31—70,96; $\chi^2 = 4,001$) [4]. Метаанализ, включивший 26 исследова-



Рис. 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий у больных РЛ. Короткие линии указывают на сильное взаимодействие генных локусов; длинные — на слабую связь; синим — дублирование эффектов между локусами.

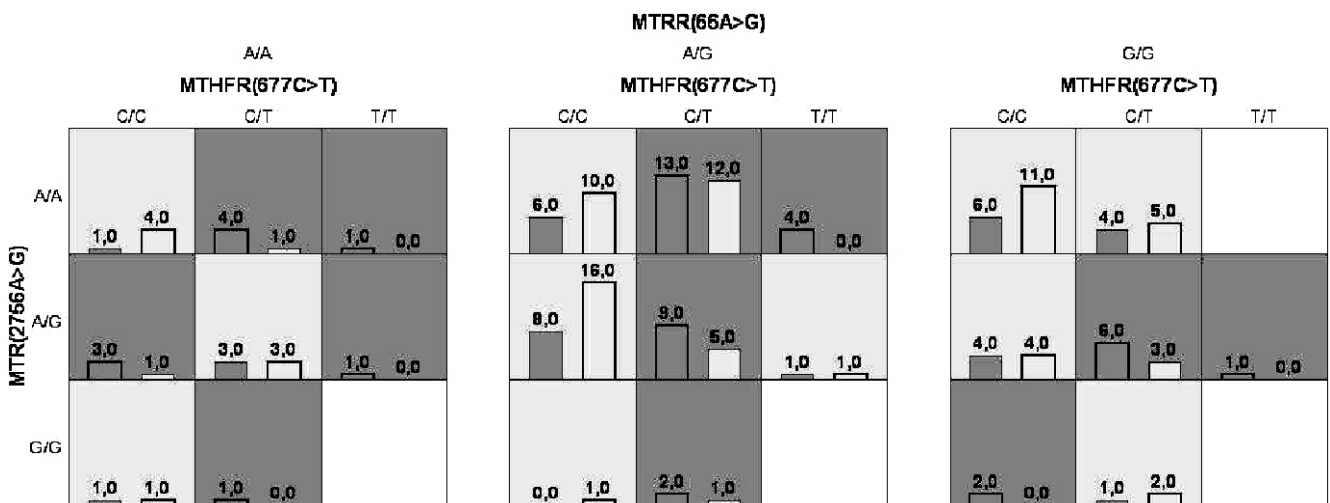


Рис. 2. Комбинации генотипов трехлокусной модели *MTR(2756A>G)*, *MTRR(66A>G)*, *MTHFR(677C>T)*, предрасполагающей к формированию aberrаций хромосомного типа у больных РЛ. Темно-серые ячейки — генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки — генотипы пониженного риска, белые ячейки — отсутствуют сочетания генотипов (левые столбики в ячейках — больные с высокой частотой aberrаций хромосомного типа, правые — больные с низкой частотой aberrаций хромосомного типа).

ний *MTHFR C677T* (12 324 больных РЛ и 12 532 здоровых) показал значимые показатели ORs при сравнении гомозигот (ТТ versus СС: OR = 1,518, 95%CI = 1,220–1,890), и гетерозигот СТ versus СС (OR = 1,053, 95%CI = 0,940–1,179), в доминантной модели (СТ + ТТ versus СС: OR = 1,143, 95%CI = 1,013–1,291), рецессивной модели (ТТ versus СТ + СС: OR = 1,435, 95%CI = 1,190–1,730), и аддитивной модели (Т versus С: OR = 1,176, 95%CI = 1,066–1,298) [18].

В данном исследовании не было выявлено ассоциации вариантов гена *MTHFR C677T* и риска развития РЛ у жителей Кемеровской области. Однако выявлен высокий уровень аберраций хромосомного типа у онкобольных носителей Т-аллеля гена *MTHFR*. С одной стороны, это можно объяснить тем, что у обладателей Т-аллеля гена *MTHFR* дефицит фолатов в пище, приводит к значимому возрастанию уровня гомоцистеина в крови и росту повреждаемости хромосом. С другой стороны, известно, что образование аберраций хромосомного типа может, происходит под действием радиационных факторов и химических веществ, повышающих радиочувствительность [19]. Известно, что Кемеровская область по своим геофизическим особенностям относится к территориям, неблагоприятным по уровню радона, что является мощным индуктором повреждений ДНК и фактором риска рака [17]. Судя по спектру повреждений хромосом, у больных РЛ, проживающих в Кемеровской области, имел место тесный контакт с мутагенами как лучевой (вероятнее всего, радон, так как другие радиологические показатели в области в пределах нормы), так и химической природы (мутагены табачного дыма). При этом наиболее чувствительными к такому сочетанному воздействию оказались обладатели минорных вариантов гена *MTHFR (rs1801133)*, что проявилось в накоплении двунитевых разрывов ДНК и высоком уровне ХА хромосомного типа.

Ранее было показано, что минорные варианты генов *MTHFR* и *MTRR* связаны с ошибками расхождения хромосом и увеличивают риск рождения детей с трисомией хромосомы 21 или другими анеуплоидиям [11]. James S.G. с соавт. полагали, что наблюдаемые эффекты могут быть связаны с изменениями уровня метилирования ДНК, которые приводят к возрастанию мейотического нерасхождения хромосом [12]. Ассоциации между полиморфными вариантами генов фолатного цикла и структурными нестабильными хромосомными аберрациями в лимфоцитах крови отмечались также у здоровых жителей Норвегии. У обладателей минорного аллеля гена *MTHFR* наблюдалось повышенное значение частоты хроматидных пробелов у курильщиков, а у индивидов с вариантным аллелем *MTR* (кодон 919) — высокое значение аберраций хроматидного типа у курильщиков старше 40 лет [16]. Изучение больных лейкемией показало, что в группах пациентов с аномальным кариотипом (что является довольно частым событием при лей-

козе) частота Т-аллеля гена *MTHFR* ниже, чем у больных лейкозом с нормальным кариотипом [20]. При этом авторы указывают, что эффекты вариантов гена могут существенно модифицироваться этническим бэкграундом, ген-генными и ген-средовыми взаимодействиями. В нашем исследовании ассоциации между вариантами гена *MTHFR* и структурными ХА впервые были обнаружены у больных с солидной опухолью (РЛ) и не выявлены у здоровых индивидов. Вполне вероятно, это значимая роль гена *MTHFR* проявляется лишь на фоне высокой канцерогенной нагрузки на организм.

Проведенный анализ межгенных взаимодействий выявил сложный характер взаимодействия между генами фолатного цикла при формировании хромосомных нарушений у больных РЛ. Установлено, что эффект локуса *MTHFR* дублировался эффектами генов *MTR* и *MTRR*. Таким образом, не только низкий уровень 5-метилтетрагидрофолата, связанный с аллелем Т гена *MTHFR*, оказался связан с повышением уровня цитогенетической нестабильности в клетках крови обследованных пациентов. Можно предположить, что наследственно обусловленная низкая активность фермента *MTRR* не позволяет поддерживать на высоком уровне активность метионин-синтазы *MTR* и также способна приводить к гипергомоцистеинемии и повышению уровня повреждений хромосом. Безусловно, данная гипотеза требует проверки на большой по объему выборке в зависимости от генетического окружения и факторов внешней и внутренней среды. Особое внимание при этом следует уделить типу питания, витаминнообеспеченности, индивидуальным особенностям ферментных систем репарации ДНК.

Заключение

В заключение следует отметить, что полученные данные подтверждают предположение о существенной роли генов фолатного цикла в формировании цитогенетической нестабильности у больных РЛ, что в случае подтверждения результатов на независимой выборке позволит приблизиться к пониманию их роли в мутагенезе и канцерогенезе.

Список литературы

1. Zhang H, Cai B. The impact of tobacco on lung health in China. *Respirology*. 2003; 8: 17-21.
2. Weissfeld JL, Lin Y, Lin HM et al. Lung Cancer Risk Prediction Using Common SNPs Located in GWAS-Identified Susceptibility Regions. *J Thorac Oncol*. 2015; 10(11):1538-1545.
3. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population. *BMC Cancer*. 2011; 11:459-469.
4. Arslan S, Karadayi S, Yildirim ME et al. The association between methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism and lung cancer risk. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(2): 991-996.

5. Wang X, Yue K, Hao L. Meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and lung cancer risk in Chinese. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 15; 8(1):1521-1525.
6. Алексеевко ИВ, Плешкан ВВ, Монастырская ГС и др. Принципиально низкая воспроизводимость молекулярно-генетических исследований рака. *Генетика*. 2016; 52(7): 745-760.
7. Cui LH, Shin MH, Kim HN et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with lung cancer in a Korean population. *BMC Med Genet*. 2011; 12:28.
8. Laraqui A, Allami A, Carrie A et al. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol*. 2006; 61:51-61.
9. Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, Mishukova MF. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene*. 2014; 533: 168-172.
10. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J. Nutr*. 2000; 130: 129-132.
11. Guo Q, Wang H, Yang K et al. Association of MTHFR and MTRR genes polymorphisms with non-disjunctions of chromosomes 18 and 21. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2015; 32(3):395-399.
12. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70: 495-501.
13. Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S et al. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 1238-1241.
14. Harms C, Salama SA, Sierra-Torres CH et al. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol. Mutagen*. 2004; 44 (1): 74-82.
15. Bucton KE, Evans HJ. *Methods for the analysis of human chromosome aberrations*. Geneva: WHO; 1993. 66 p.
16. Skjelbred CF, Svendsen M, Haugan V et al. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1, NAT2, EPHX1, MTR and MTHFR polymorphism on chromosomal aberration frequencies in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 2011; 32(3):399-405.
17. Minina VI, Sinitsky MYu, Druzhinin VG et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to rad on and air pollution. *Eur. J. Cancer Prevention*. 2016; 25(4): 70-77.
18. Yang Y, Yang LJ, Deng MZ et al. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of lung cancer: a comprehensive evaluation. *Genet Mol Res*. 2016; 15(2), doi: 10.4238/gmr.15027615.
19. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. 2000; 15: 289-302.
20. Sinthuwiwat T, Poowasanpetch P, Wongngamrunroj A et al. Association of MTHFR polymorphisms and chromosomal abnormalities in leukemia. *Dis Markers*. 2012; 32(2):115-121.