

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ РАЗВИТИЯ АГРЕССИВНЫХ ЛИМФОМ

О.В. Березина¹, Т.И. Поспелова¹, М.Л. Филипенко², Е.Н. Воропаева³, В.С. Овчинников¹

¹ ФГБОУ ВО "Новосибирский государственный медицинский университет" Минздрава России

² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³ ФГБНУ "НИИ терапии и профилактической медицины", Новосибирск

E-mail: ovb-mail@ya.ru

SEARCHING FOR MOLECULAR-GENETIC PREDICTORS OF AGGRESSIVE LYMPHOMAS

O.V. Berezina¹, T.I. Pospelova¹, M.L. Filipenko², E.N. Voropaeva³, V.S. Ovchinnikov¹

¹Novosibirsk State Medical University

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS, Novosibirsk

³Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk

Изучены полиморфные локусы генов фолатного обмена: С677Т и А1298С *MTHFR*, А2756G *MTR*, А66G *MTRR*, G1958A *MTHFD1* и 844ins68 *CBS* у больных агрессивными неходжкинскими злокачественными лимфомами. Обнаружена ассоциация редкого аллеля 1958А гена *MTHFD1* со снижением риска развития диффузной В-крупноклеточной лимфомы (OR=0,429; С.І. [0,279–0,659], p<0,0008). Влияния других полиморфных локусов на предрасположенность к развитию лимфом не обнаружено.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, SNP, фолаты, лимфома, предрасположенность.

Polymorphic loci of genes of folate metabolism C677T and A1298C *MTHFR*, A2756G *MTR*, A66G *MTRR*, G1958A *MTHFD1* and 844ins68 *CBS* have been studied in patients with aggressive malignant Non Hodgkin lymphomas. The association of a rare allele 1958A *MTHFD1* with a reduced risk of enlargement of diffuse large B-cell lymphoma (OR=0.429; C.I. [0.279–0.659], p<0.0008) is found. Impact of other polymorphic loci on susceptibility to enlargement of lymphomas has not been detected yet.

Key words: genetic polymorphism, the SNP, folates, lymphoma, susceptibility.

Введение

Выявление молекулярно-генетических маркеров развития и прогноза для опухолевых заболеваний крови составляет суть предиктивной онкогематологии, основной задачей которой является поиск доказательств диагностической ценности тех или иных генных полиморфизмов [3]. В качестве потенциальных маркеров исследуются гены различных систем клетки: метаболизма ксенобиотиков, апоптоза, цитокинов и др. Среди них большой интерес представляют гены фолатного обмена – важной биохимической системы клетки, влияющей на регуляцию экспрессии генов путем эпигенетической модификации ДНК (рис. 1). Метилирование CpG-островков в промоторе гена является нормальным процессом регуляции степени экспрессии генов в клетках. Гиперметилирование промоторов генов, которое связано с подавлением транскрипции, так же как и мутации, является механизмом инактивации классических генов-супрессоров опухолевого роста [12]. Аномальное метилирование генов-супрессоров опухолей встречается на ранних стадиях онкогенеза и прогрессивно увеличивается, что в конечном итоге приводит к злокачественной трансформации. Аберрантное метилирование ДНК и, как следствие, измененная экспрессия генов описаны при В-клеточных неходжкинских злокачественных лимфомах (НХЗЛ) [10]. Полимор-

фные варианты генов фолатного цикла, которые влияют на метилирование ДНК, могут способствовать возникновению неходжкинских злокачественных лимфом, вызывая гипо- или гиперметилирование протоонкогенов и генов супрессоров опухолевого роста соответственно [11].

В связи с тем, что отмечается увеличение частоты агрессивных НХЗЛ в г. Новосибирске [5] актуально исследование однонуклеотидных замен (SNPs) в генах фолатного цикла как потенциальных молекулярно-генетических маркеров развития лимфоидных неоплазий.

Цель работы: изучить роль полиморфных локусов С677Т и А1298С гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), А2756G гена метионинсинтазы (*MTR*), А66G гена метионинсинтазыредуктазы (*MTRR*), G1958A гена метилентетрагидрофолатдегидрогеназы (*MTHFD1*) и 844ins68 гена цистатион-β-синтазы (*CBS*) в формировании предрасположенности к развитию агрессивных НХЗЛ.

Материал и методы

Выборки. Группу обследованных составили 89 пациентов (46 мужчин и 43 женщины; средний возраст 49,4±14,2 года) Городского гематологического центра города Новосибирска с диагнозом агрессивной неходжкинской лимфомы. Диагностика и лечение НХЗЛ прово-

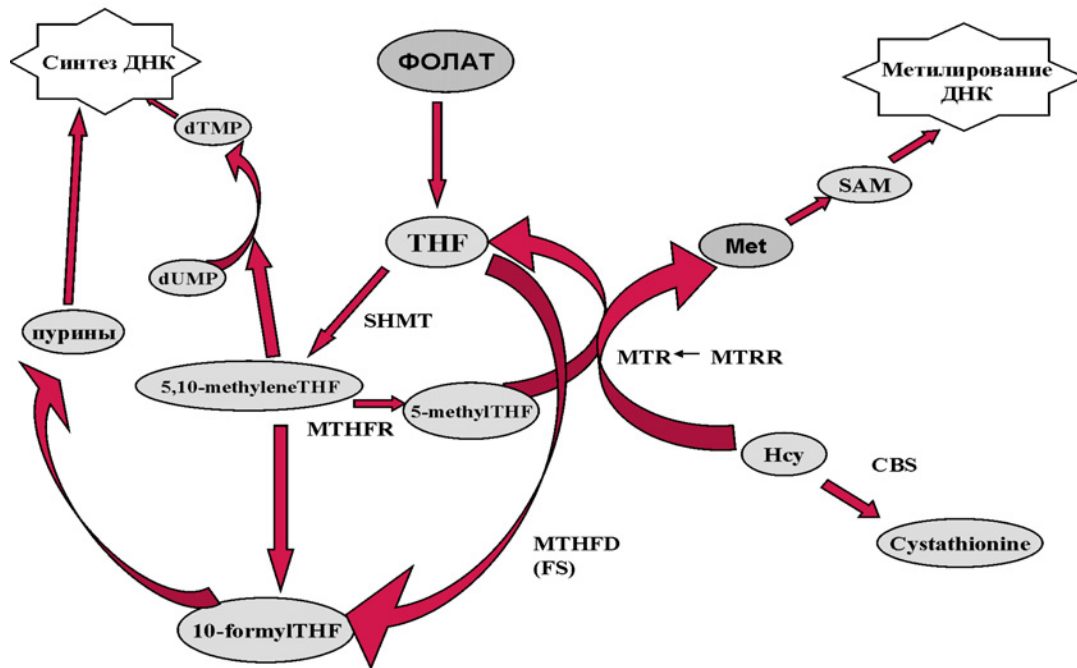


Рис. 1. (адаптировано из [15]) Фолатный цикл: dTMP – тимидин; dUMP – уридин; THF – тетрагидрофолат; 5,10-methyleneTHF – 5,10-метилтетрагидрофолат; 5-methylTHF – 5-метилтетрагидрофолат; 10-formylTHF – 10-формилтетрагидрофолат; Met – метионин; Hcy – гомоцистеин; SAM – S-аденозилметионин; MTHFR – метилтетрагидрофолатредуктаза; SHMT – серилгидрокси-метилтрансфераза; MTHFD – метилтетрагидрофолатдегидрогеназа; MTR – метионинсинтаза; MTRR – редуктаза метионинсинтазы; SHMT – серингидрокси-метилтрансфераза; CBS – цистатионин-β-синтаза; Cystathionine – цистатионин

дилось согласно Российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний [1]. Вариант НХЗЛ оценивался согласно классификации лимфоидных неоплазий ВОЗ 2008 года. В-клеточные лимфомы имели 79 (88,8%) человек. Диффузная В-крупноклеточная лимфома диагностирована у 56 (71%) пациентов, анапластическая и мантийноклеточная – у 8 (10,1%) человек каждая, лимфобластная и фолликулярная 3-го цитологического типа – у 3 (3,8%) человек каждая, беркиттоподобная у 1 (1,2%) пациента. Т-клеточные лимфомы диагностированы у 10 (11,2%) больных.

Контрольную группу составили 549 доноров Новосибирского центра крови, средний возраст обследованных 33,0 ± 11,01 лет.

Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с требованиями этического комитета.

Генотипирование. ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом; а также из буккального эпителия с использованием стандартной методики выделения ДНК на силике.

Определение генотипов полиморфных локусов G1958A гена *MTHFD1* и 844ins68 гена *CBS* проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа. Определение полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и *SHMT1* проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементар-

ных полиморфной последовательности ДНК. Генотипирование осуществлялось по методике, описанной в [16].

Статистическая обработка данных. Частоты встречаемости аллелей и генотипов однонуклеотидных замен в генах фолатного цикла в выборке больных НХЗЛ сравнивали с таковыми в контрольной группе. Значимость различий оценивалась с помощью критерия χ^2 , статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Соответствие контрольной выборки равновесию Харди-Вайнберга также проверяли с помощью критерия χ^2 . Для оценки величины относительного риска использовали отношение шансов (OR) с его доверительным интервалом (С.И.) при уровне доверия 95%. Вычисления производились с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://www.helmholtz-muenchen.de/ihg/index.html>). При оценке количественных признаков использовали вычисление средней арифметической (M) и ее ошибки (m).

Результаты

Исследованные SNPs имеют доказанное функциональное значение, т.е. изменяют активность, стабильность или количество соответствующих ферментов, что может привести к нарушению баланса между важнейшими метаболическими путями цикла фолиевой кислоты – синтезом dTMP и пуриновых нуклеотидов и метилированием ДНК, приводить к повреждению ДНК и, как следствие, инициировать онкогенез и обуславливать опухолевую прогрессию.

Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов полиморфного локуса G1958A гена *MTHFD1* в группе пациентов с агрессивными лимфомами

Аллели Генотипы	Контроль 1		Больные ДВККЛ 2		OR С.І. Р ДВККЛ	Больные ККЛ 3	
	Абс.	%	Абс.	%		Абс.	%
	n=539		n=54			n=27	
G	544	50,5	76	70 $p_{1-2} < 0,0008$ $p_{2-3} < 0,001$	2,331 1,517–3,584 0,0008	24	44 $p_{1-3} > 0,05$
A	534	49,5	32	30 $p_{1-2} < 0,0008$ $p_{2-3} < 0,001$	0,429 0,279–0,659 0,0008	30	56 $p_{1-3} > 0,05$
G/G	141	26	27	50 $p_{1-2} < 0,003$ $p_{2-3} < 0,002$	5,209 1,949–13,918 0,003	3	11 $p_{1-3} > 0,05$
G/A	262	49	22	41 $p_{1-2} < 0,006$	0,439 0,241–0,798 0,006	18	67 $p_{1-3} > 0,05$
A/A	136	25	5	9 $p_{1-2} < 0,003$ $p_{2-3} < 0,002$	0,192 0,072–0,513 0,003	6	22 $p_{1-3} > 0,05$

При анализе частот аллелей исследуемых полиморфных локусов в общей группе агрессивных лимфом отмечено увеличение частоты дикого 1958G-аллеля гена *MTHFD1* (64%) по сравнению с контролем (50,5%, $p < 0,001$), тогда как редкий 1958A-аллель в группе агрессивных НХЗЛ встречался реже: 36% против 49,5% ($p < 0,001$).

Из группы агрессивных НХЗЛ, с учетом наибольшей представленности, были выделены пациенты с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ, $n=56$). Отдельному анализу также подверглись больные с другими вариантами агрессивных лимфом (Т- и В-анпластической, Т и В-лимфобластной, беркиттоподобной, мантийноклеточной, фолликулярной 3-го цитологического типа, плеоморфной, $n=33$), преимущественно крупноклеточными (ККЛ).

Дикий 1958G-аллель *MTHFD1* в группе больных ДВККЛ встречался чаще как по сравнению с группой контроля: 70% против 50,5% ($p < 0,0008$), так и с группой больных ККЛ, в которой частота 1958G-аллеля составила 44% ($p < 0,001$). В свою очередь, частота редкого 1958A-аллеля *MTHFD1* в группе больных ДВККЛ составила лишь 30%, тогда как в группе пациентов с ККЛ – 56%, а в популяции г. Новосибирска – 49,5% (табл. 1).

Учитывая различия в распределении аллелей и генотипов в группе ДВККЛ, была проведена оценка риска развития данной группы неоплазий.

Для полиморфного локуса G1958A гена *MTHFD1* выявлена сильная ассоциация редкого 1958A-аллеля со сниженным риском развития ДВККЛ (OR=0,429 С.І. [0,279–0,659], $p < 0,0008$, табл. 1), в то время как связи данной однонуклеотидной замены с другими вариантами агрессивных лимфом не обнаружено.

Объяснением полученным данным может служить то,

что однонуклеотидная замена G1958A приводит к замене Arg653Gln в формилтетрагидрофолатсинтезном домене фермента *MTHFD* и уменьшает его термостабильность и метаболическую активность [7]. Поскольку субстратом данного фермента является тетрагидрофолат, потенциально его накопление способствует повышению концентрации 5,10-метилентетрагидрофолата, что, в свою очередь, может увеличивать эффективность синтеза тимидилата и метилирования ДНК, тем самым препятствуя злокачественной трансформации (рис. 1). Подтверждением этому служит ряд исследований, указывающих на протективный эффект фолата (предшественника тетрагидрофолата) в отношении НХЗЛ [6, 9].

Подобная ассоциация была отмечена при раке легкого в китайской популяции [8]. В то время как в работе Wang et al. была обнаружена ассоциация генотипа 1958A/A с увеличением риска возникновения рака желудка [14]. В целом исследований, посвященных роли полиморфного локуса G1958A *MTHFD1* в развитии онкологической патологии, очень мало, что свидетельствует о необходимости изучения данного полиморфного локуса и его влияния на биохимические процессы в клетке.

Анализ остальных исследуемых локусов системы фолатного цикла ассоциации с агрессивными НХЗЛ в выборке жителей г. Новосибирска не выявил.

Заключение

Проведенное исследование выявило ассоциацию полиморфного локуса G1958A гена *MTHFD1* с предрасположенностью к развитию диффузной-В-крупноклеточной лимфомы, что позволяет рассматривать данный локус как потенциальный маркер для включения в панель

SNPs, вклад которых в развитие и прогноз неходжкинских злокачественных лимфом у жителей Западно-Сибирского региона был показан ранее [2, 4, 13]. Рискометрия НХЗЛ – это первый этап работы, направленный на выявление молекулярно-генетических предикторов, которые могут использоваться в рутинной диагностике лимфоидных неоплазий. В дальнейшем необходимо продолжить исследование на большем объеме выборки с изучением биохимических механизмов, определяющих действие полиморфных локусов генов фолатного обмена на лимфоогенез.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Аль-Ради Л.С., Барях Е.А., Белоусова И.Э. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопрлиферативных заболеваний // Современная онкология. – 2014. – №8. – С. 6–126.
2. Березина О.В., Поспелова Т.И., Овчинников В.С. и др. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз m1 и t1 (GSTM1 и GSTT1) у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами // Сибирский научный медицинский журнал. – 2013. – Т. 33. – №1. – С. 40–46.
3. Воропаева Е.Н., Березина О.В., Овчинников В.С. и др. Прогностическое значение тестирования полиморфного локуса Arg72Pro 4 экзона антионкогена TP53 у пациентов с неходжкинскими лимфомами // Сибирский научный медицинский журнал. – 2013. – Т. 33, № 1. – С. 28–33.
4. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК XRCC1 с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58, № 1. – С. 10–14.
5. Ковынев И.Б., Поспелова Т.И., Агеева Т.А. и др. Частота и структура неходжкинских злокачественных лимфом в Новосибирске, НСО и городах Сибирского федерального округа // Сибирский научный медицинский журнал. – 2006. – Т. 26, № 4. – С. 175–181.
6. Christensen K.E., Rohlicek C.V., Andelfinger G.U. et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects // Human Mutation. – 2009. – Vol. 30, No. 2. – P. 212–220.
7. Koutros S., Zhang Y., Zhu Y. et al. Nutrients contributing to one-carbon metabolism and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes // American Journal of Epidemiology. – 2008. – Vol. 167, No. 3. – P. 287–294.
8. Liu H., Jin G., Wang H. et al. Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes and lung cancer risk: a case-control study in Chinese population // Lung Cancer. – 2008. – Vol. 61, No. 1. – P. 21–29.
9. Polesel J., Dal Maso L., La Vecchia C. et al. Dietary folate, alcohol consumption and risk of non-Hodgkin lymphoma // Nutrition and Cancer. – 2007. – Vol. 57, No. 2. – P. 146–150.
10. Shaknovich R., Melnick A. Epigenetics and B-cell lymphoma // Curr. Opin. Hematol. – 2011. – Vol. 18, No. 4. – P. 293–299.
11. Skibola C.F., Curry J.D., Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma // Haematologica. – 2007. – Vol. 92, No. 7. – P. 960–969.
12. Tsou J.A., Hagen J.A. et al. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis // Oncogene. – 2002. – Vol. 21, No. 35. – P. 5450–5461.
13. Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Maksimov V.N. et al. Prognostic impact of the tp53 rs1625895 polymorphism in dlblcl patients // British Journal of Haematology. – 2015. – Vol. 169, No. 1. – P. 32–35.
14. Wang L., Ke Q., Chen W. et al. Polymorphisms of MTHFD, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13, No. 8. – P. 2526–2532.
15. Weiner A.S., Gordeeva L.A., Voronina E.N. et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of having an offspring with congenital anomalies in the West Siberian region of Russia: a case-control study // Prenat. Diagn. – 2012. – Vol. 32, No. 11. – P. 1041–1048.
16. Weiner A.S., Voronina E.N., Boyarskih U.A. et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of non-hodgkin's lymphoma // Leukemia Research. – 2011. – Vol. 35, No. 4. – P. 508–515.

Поступила 17.10.2016

Сведения об авторах

Березина Ольга Валерьевна, канд. мед. наук, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный медицинский университет” Минздрава России. Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, 52. E-mail: ovb-mail@ya.ru.

Поспелова Татьяна Ивановна, докт. мед. наук, проректор по научной работе, заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный медицинский университет” Минздрава России, заслуженный врач РФ. Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, 52. E-mail: post_gem@mail.ru.

Филипенко Максим Леонидович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8. E-mail: max@niboch.nsc.ru.

Воропаева Елена Николаевна, докт. мед. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов исследования терапевтических заболеваний ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, Новосибирск. Адрес: 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1. E-mail: vena.81@mail.ru.

Овчинников Виктор Сергеевич, аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный медицинский университет” Минздрава России. Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, 52. E-mail: black_wizard@mail.ru.