

**А. В. Кононов<sup>1</sup>, М. Л. Филипенко<sup>2</sup>,  
Д. Г. Новиков<sup>1</sup>, У. А. Боярских<sup>2</sup>, Д. В. Петров<sup>1</sup>, С. Б. Глатко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Омская государственная медицинская академия  
ул. Партизанская, 20, Омск, 644099, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>3</sup> Клинический онкологический диспансер  
ул. Партизанская, 20, Омск, 644099, Россия  
E-mail: acarina@yandex.ru

## **КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА**

Изменение активности ферментов фолатного цикла, обусловленное полиморфизмом их генов, нарушает процессы метилирования и репарации ДНК и повышает риск развития онкологических заболеваний. Цель исследования: определить влияние полиморфных аллелей генов, кодирующих метилентетрагидрофолатредуктазу (MTHFR), метионинсинтазу (MTR) и метионинсинтазы редуктазу (MTRR) на риск развития аденокарциномы толстой кишки. Объект исследования: образцы венозной крови 101 пациента с аденокарциномой толстой кишки (собраны за период с 09.01.2007 по 13.03.2007). Группа контроля: венозная кровь 157 лиц без онкологических заболеваний в анамнезе. При помощи ПЦР определялись полиморфные аллели генов MTHFR A1298C и C677T; MTR A2756G; MTRR A66G. Для оценки риска развития заболевания использовалось отношение шансов с 95 % доверительным интервалом. Результаты: аллель 2756G и генотипы 2756A/G и G/G гена MTR, а также аллель 66G и генотипы 66A/G и G/G гена MTRR не ассоциированы с риском развития рака толстой кишки.

*Ключевые слова:* толстая кишка, аденокарцинома, полиморфизм генов, фолатный цикл.

В качестве одного из основных факторов, предрасполагающих к развитию колоректального рака, рассматривается недостаточное поступление фолатов с пищей. Данные эпидемиологических исследований указывают на обратную зависимость между уровнем потребления фолатов и риском возникновения колоректального рака [1]. Основными источниками фолатов являются зеленые листовые растения: капуста, шпинат, а также бобы, печень и дрожжи, содержащие восстановленные полиглутаматы. Они должны быть гидролизованы с помощью фермента птероилполиглутаматгидролазы до моноглутамата, так чтобы они могли быть абсорбированы в проксимальном отделе тонкой кишки. Фолаты, поступая с пищей, через ряд промежуточных стадий метаболизируются в тетрагидрофолат, необходимый для синтеза пуринов, а затем 5,10-метилентетрагидрофолат [2]. Последний используется для синтеза тимидина, а также при участии метилентетрагидрофолатре-

дуктазы (MTHFR) превращается в 5-метилтетрагидрофолат, который необходим для образования метионина из гомоцистеина. Эта реакция катализируется ферментом метионинсинтазой (MTR). Для восстановления его ко-фактора – витамина B<sub>12</sub> – используется метионинсинтазы редуктаза (MTRR). Метионин, метаболизируясь в S-аденозилметионин (SAM), в дальнейшем принимает участие в процессе метилирования ДНК и других молекул.

Таким образом, имеется два ключевых направления метаболизма фолатов: с одной стороны, это непосредственно синтез нуклеотидов, с другой – участие в метилировании ДНК, белков и других метаболитов. Дивергенция этих путей происходит на уровне 5,10-метилентетрагидрофолата. Недостаточное поступление фолатов способно привести к нарушению стабильности ДНК, гипометилированию промоторов потенциальных онкогенов (например, c-myc и c-jun), вызывает нарушение хромосомной сегрега-

ции, аномальную генную экспрессию и приводит к селективному росту и трансформации клеток [3], т. е. через клональную альтерацию гена – к канцерогенезу.

Недавние когортные исследования указывают на отсутствие снижения риска колоректальных раков при приеме фолатов [4]. Возможно, в развитии неоплазий имеют место иные нарушения фолатного цикла, выражающиеся не в алиментарной недостаточности фолатов, а связанные с его фазами, направленными на метилирование. В качестве молекулярного механизма этих нарушений может быть полиморфизм генов MTHFR, MTR и MTRR.

**Цель** исследования: определить влияние полиморфных аллелей генов, кодирующих MTHFR, MTR и MTRR на риск развития аденокарциномы толстой кишки.

### Материал и методы

Объектом исследования были образцы периферической венозной крови 101 пациента Омского областного клинического онкологического диспансера с морфологически верифицированным диагнозом аденокарциномы толстой кишки. Образцы крови получены в период с 09.01.2007 по 13.03.2007. В исследуемую группу вошли образцы крови, полученные от всех пациентов, подвергшихся за этот период оперативному лечению. В контрольную группу вошли образцы венозной крови 157 доноров, мужчин и женщин в возрасте 45–75 лет без онкологических заболеваний в анамнезе, проживающих на территории Омской области, не состоящих в родстве с больными исследуемой группы. У всех пациентов бы-

ло получено информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями исключения были рецидив опухоли, другие гистологические варианты опухолей толстой кишки.

Выделение ДНК из отмытых лейкоцитов периферической венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводилось разработанным в процессе исследования методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфному участку ДНК.

Каждый образец амплифицировался с использованием пары праймеров и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце и разные флуоресцентные красители (FAM либо R6G) на 5'-конце. Структуры 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 dNTP, амплификационный буфер – термостабильную Taq-полимеразу 0,5 ед. акт./реакц.

Статистически проводилась оценка соответствия исследуемых и контрольных групп распределению Харди – Вайнберга. Достоверность различий частот аллелей определяли при помощи  $\chi^2$  (уровень значимости был принят за 5 %). Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (odds ratio, OR). Вычисление данных показателей проводили при помощи он-лайн калькулятора (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Таблица 1. Структура TaqMan-зондов и олигонуклеотидных праймеров

| Полиморфный локус | Структура TaqMan-зондов               |                                     |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
|                   | A1298C гена MTHFR                     | 5'-FAM-CCAGTGAAGAAAGTGTCTTTG-BHQ-3' |
| C677T гена MTHFR  | 5'-R6G-CTGCGGGAGCCGATTTTC-BHQ-3'      | 5'-FAM-CTGCGGGAGTCCGATTTTCAT-BHQ-3' |
| A66G гена MTRR    | 5'-FAM-CTTGCTCACATATTTCTTCT-BHQ-3'    | 5'-R6G-CTTGCTCACACATTTCTTCT-BHQ-3'  |
| A2756G гена MTR   | 5'-FAM-CTCATAATGGTCCCTGTCTAA-BHQ-3'   | 5'-R6G-CTCATAATGGCCCTGTCTAA-BHQ-3'  |
| Полиморфный локус | Структура олигонуклеотидных праймеров |                                     |
|                   | Прямой праймер                        | Обратный праймер                    |
| A1298C гена MTHFR | cttctacctgaagagcaagtcc                | atcactcactttgtgaccattc              |
| C677T гена MTHFR  | gttaccccaagggccacc                    | ggaagaatgtgtcagcctcgaag             |
| A66G гена MTRR    | tgaagtgatgaggaggtttctg                | cctatcggattcactaatacagtg            |
| A2756G гена MTR   | ctatcttgcattttcagtgtcc                | atctgtttctaccactaccttgag            |

## Результаты исследования и обсуждение

Полученные результаты распределения частот аллелей в исследуемой и контрольной группах представлены в табл. 2. В исследуемой и контрольной группах полиморфных аллелей MTHFR C677T, MTRR A66G и в исследуемой группе аллеля MTHFR A1298C достоверно чаще встречались лица с гетерозиготным генотипом. В исследуемой и контрольной группах полиморфного аллеля MTRR A2756G преобладали лица с гомозиготным генотипом. Среди больных раком толстой кишки не обнаружено носителей генотипа MTHFR 677T/T, что может быть объяснено недостаточным количеством наблюдений.

Анализ литературы, посвященной ассоциации полиморфизма C677T гена MTHFR с риском развития колоректального рака, показал, что имеющиеся сведения противоречивы. Существуют работы, указывающие на сниженный риск развития аденокарциномы толстой кишки у носителей генотипа MTHFR 677T/T [5], однако данные мета-анализа указывают на недостоверность данных ассоциаций [6].

Предполагается, что, несмотря на гипометилирование ДНК, связанное с пониженной активностью MTHFR, сниженный риск развития аденокарциномы толстой кишки у носителей мутантного аллеля обусловлен избыточным накоплением 5,10-метилентетрагидрофолата и, как следствие, повышенным синтезом тимидина. Это, в свою очередь, уменьшает соотношение dUMP / dTMP и снижает вероятность ошибочной встройки dUMP при синтезе ДНК, которая может приводить к одно- и двучепочным разрывам, возникающим при устранении dUMP ДНК-гликозилазой. Таким образом, повышенный синтез тимидина обуславливает высокую эффективность репарации ДНК, что препятствует развитию быстро пролиферирующих неоплазий, таких как колоректальный рак [7].

Результаты исследования другого полиморфного аллеля MTHFR A1298C, выполненного G. Yin и соавт. [5], указывают на повышение риска развития рака толстой кишки у носителей гомозиготного по мутации генотипа. Однако они противоречат

данным мета-анализа, выполненного Y. Huang и соавт. [8], показавшим сниженный риск развития колоректальных раков у носителей этого аллеля. Кроме того, исследования функциональной роли транзиции MTHFR A1298C указывают на отсутствие различий в активности нормальной и мутантной форм [7], что не согласуется с выводами, сделанными авторами предыдущих исследований.

К сожалению, полученные нами результаты при исследовании полиморфных локусов C677T и A1298C гена MTHFR не могут быть рассмотрены как репрезентативные, ввиду несоответствия исследуемых групп распределению Харди – Вайнберга (C677T – отклонение наблюдается в исследуемой и контрольной группах; A1298C – отклонение в исследуемой группе;  $p < 0,05$ ). Этот факт, по-видимому, связан с небольшим числом наблюдений и требует дальнейшего изучения с увеличением объема выборки.

Исследование полиморфизма гена MTR, выполненное K. Chen и соавт. [9], показало, что носительство мутантного аллеля 2756G и генотипов 2756A/G и 2756G/G повышает риск развития колоректального рака. Однако имеются данные, свидетельствующие о снижении риска развития рака прямой и сигмовидной кишки у носителей генотипа MTR 2756G/G [10] и отсутствии ассоциации с риском развития данной патологии кишечника [11]. Полученные нами значения OR для полиморфного аллеля MTR 2756G и генотипов 2756A/G и 2756G/G являлись статистически незначимыми на уровне значимости 5 %, так как единица во всех случаях входила в 95 % CI (табл. 3).

Таким образом, результаты нашего исследования также свидетельствуют об отсутствии ассоциации мутантного аллеля MTR 2756G и генотипов 2756A/G и 2756G/G с риском развития рака толстой кишки. Однако исследования *in vitro* указывают на то, что полиморфный аллель MTR 2756G связан со сниженной активностью кодируемого им фермента [7]. Это должно приводить к накоплению 5-метилтетрагидрофолата. В свою очередь, при моделировании кинетики фолатного цикла было показано, что накопление 5-метилтетрагидрофолата приводит к снижению содержания других форм фолатов [12], а следовательно,

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей исследуемых генов

| Генотипы и аллели | MTHFR A1298C |                   | Генотипы и аллели | MTHFR C677T |                  |
|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------|------------------|
|                   | АК, n = 80   | Контроль, n = 156 |                   | АК, n = 101 | Контроль, n = 96 |
| A/A               | 0,275 (22)   | 0,474 (74)        | C/C               | 0,287 (29)  | 0,063 (6)        |
| A/C               | 0,675 (54)   | 0,442 (69)        | C/T               | 0,713(72)   | 0,906(87)        |
| C/C               | 0,050 (4)    | 0,083 (13)        | T/T               | 0 (0)       | 0,031 (3)        |
| A                 | 0,613        | 0,696             | C                 | 0,644       | 0,516            |
| C                 | 0,388        | 0,304             | T                 | 0,356       | 0,484            |

  

| Генотипы и аллели | MTR A2756G |                   | Генотипы и аллели | MTRR A66G  |                   |
|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|
|                   | АК, n = 81 | Контроль, n = 142 |                   | АК, n = 82 | Контроль, n = 157 |
| A/A               | 0,679 (55) | 0,627 (89)        | A/A               | 0,134 (11) | 0,197 (31)        |
| A/G               | 0,296 (24) | 0,324 (46)        | A/G               | 0,561 (46) | 0,535 (84)        |
| G/G               | 0,025 (2)  | 0,049 (7)         | G/G               | 0,305 (25) | 0,268 (42)        |
| A                 | 0,827      | 0,789             | A                 | 0,415      | 0,465             |
| G                 | 0,173      | 0,211             | G                 | 0,585      | 0,535             |

Примечание: АК – аденокарцинома толстой кишки.

Таблица 3. Значения соотношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) для генотипов и аллелей исследуемых генов

| Аллель риска | Названия генов (полиморфизм) |                      |                     |
|--------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
|              | Генотип / аллель             | MTR A2756G           | MTRR A66G           |
| G            | [A] ↔ [G]                    | 0,780 [0,475–1,282]  | 1,227 [0,838–1,797] |
|              | [AA] ↔ [AG]                  | 0,844 [0,465–1,534]  | 1,543 [0,710–3,354] |
|              | [AA] ↔ [GG]                  | 0,462 [0,093–2,306]  | 1,677 [0,719–3,915] |
| A            | [G] ↔ [A]                    | 1,282 [0,780–2,107]  | 0,815 [0,556–1,194] |
|              | [GG] ↔ [AG]                  | 1,826 [0,352–9,481]  | 0,920 [0,499–1,696] |
|              | [GG] ↔ [AA]                  | 2,163 [0,434–10,789] | 0,596 [0,255–1,391] |

и к снижению синтеза тимидина и пуринов. Вероятно, имеет место незначительное снижение активности фермента, кодируемого полиморфным аллелем, что не приводит к выраженным нарушениям фолатного цикла. С другой стороны, накопление 5-метилентетрагидрофолата аллостерическим путем ингибирует активность глицин-N-метилтрансферазы, препятствуя «утечке» SAM из процессов метилирования. Однако при нормальном поступлении метионина это взаимодействие оказывает слабое влияние на процессы метилирования [2], чем также может быть объяснено отсутствие связи между носительством мутантного аллеля MTR 2756G и генотипов с этим аллелем и риском развития колоректального рака.

При исследовании полиморфного аллеля MTRR 66G и генотипов с этим аллелем,

были выявлены статистически незначимые значения OR (см. табл. 3).

Таким образом, не наблюдается ассоциации генотипов MTRR 66A/G и 66G/G и аллеля 66G с риском развития рака толстой кишки. Аналогичные данные были получены Т. Otani и соавт. [13]. Это противоречит данным других исследователей, сообщавших о повышенном риске развития колоректального рака у лиц, гомозиготных по мутантному аллелю [14]. Кроме того, генотип MTRR 66G/G связан с четырехкратным падением активности фермента при реактивации MTR *in vivo* [15]. Однако такое снижение темпов реактивации MTR, как мы предположили выше, по-видимому, не оказывает выраженного влияния на кинетику фолатного и метионинового циклов.

### Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии ассоциации генотипов MTR 2756A/G, 2756G/G и аллеля 2756G с риском развития рака толстой кишки в исследуемой выборке. Полиморфный аллель 66G гена MTRR и генотипы 66A/G и 66G/G также не были связаны с риском развития колоректальных раков. По-видимому, полиморфизм данных генов оказывает слабое влияние на активность экспрессируемых ими ферментов *in vivo*. Таким образом, выявление полиморфных аллелей MTR 2756G и MTRR 66G и генотипов с этими аллелями в исследуемой популяции с целью определения риска развития неопластического процесса в толстой кишке представляется нецелесообразным.

### Список литературы

1. Hubner R. A., Houlston R. S. Folate and colorectal cancer prevention // *Br. J. Cancer*. 2009. Vol. 100, № 2. P. 233–239.
2. Nijhout H. F., Reed M. C., Anderson D. F., Mattingly J. C., James S. J., Ulrich C. M. Long-range allosteric interactions between the folate and methionine cycles stabilize DNA methylation reaction rate // *Epigenetics*. 2006. Vol. 1, № 2. P. 81–87.
3. Lu R., Wang X., Sun D. F., Tian X. Q., Zhao S. L., Chen Y. X., Fang J. Y. Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer // *Epigenetics*. 2008. Vol. 3, № 6. P. 330–335.
4. Vogel S. de, Dindore V., Engeland M. van, Goldbohm R. A., Brandt P. A. van den, Weijenberg M. P. Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B<sub>6</sub> and risk of sporadic colorectal cancer // *J. Nutr.* 2008. Vol. 138, № 12. P. 2372–2378.
5. Yin G., Kono S., Toyomura K., Hagiwara T., Nagano J., Mizoue T., Mibu R., Tanaka M., Kakeji Y., Maehara Y., Okamura T., Ikejiri K., Futami K., Yasunami Y., Maekawa T., Takenaka K., Ichimiya H., Imaizumi N. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study // *Cancer Sci.* 2004. Vol. 95, № 11. P. 908–913.
6. Hubner R. A., Houlston R. S. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations // *Int. J. Cancer*. 2007. Vol. 120, № 5. P. 1027–1035.
7. Назаренко М. С., Пузырев В. П., Беляева А. Ю., Лебедев И. Н. Система метаболизма фолата: генетические и эпигенетические аспекты ассоциации с онкологической патологией // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. 2007. № 11. С. 61–74.
8. Huang Y., Han S., Li Y., Mao Y., Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis // *J. Hum. Genet.* 2007. Vol. 52, № 1/P. 73–85.
9. Chen K., Song L., Jin M. J., Fan C. H., Jiang Q. T., Yu W. P. Association between genetic polymorphisms in folate metabolic enzyme genes and colorectal cancer: a nested case-control study // *Zhonghua. Zhong. Liu. Za. Zhi.* 2006. Vol. 28, № 6. P. 429–432.
10. Ulvik A., Vollset S. E., Hansen S., Gislefoss R., Jellum E., Ueland P. M. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T and methionine synthase 2756A → G polymorphisms: a study of 2 168 case-control pairs from the JANUS cohort // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2004. Vol. 13, № 12. P. 2175–2180.
11. Ulrich C. M., Curtin K., Potter J. D., Bigler J., Caan B., Slattery M. L. Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2005. Vol. 14, № 11, pt. 1. P. 2509–2516.
12. Nijhout H. F., Reed M. C., Ulrich C. M. Mathematical models of folate-mediated one-carbon metabolism // *Vitam. Horm.* 2008. Vol. 79. P. 45–82.
13. Otani T., Iwasaki M., Hanaoka T., Kobayashi M., Ishihara J., Natsukawa S., Shaura K., Koizumi Y., Kasuga Y., Yoshimura K., Yoshida T., Tsugane S. Folate, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, and vitamin B<sub>2</sub> intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan // *Nutr. Cancer*. 2005. Vol. 53, № 1. P. 42–50.
14. Matsuo K., Hamajima N., Hirai T., Kato T., Inoue M., Takezaki T., Tajima K. Methionine synthase reductase gene A66G polymorphism is associated with risk of colorectal cancer.

Asian Pac. J. Cancer Prev. 2002. Vol. 3, № 4. P. 353–359.

15. Olteanu H., Munson T., Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous

electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase // Biochemistry. 2002. Vol. 41, № 45. P. 13378–133785.

*Материал поступил в редколлегию 05.06.2009*

**A. V. Kononov, M. L. Filipenko, D. G. Novikov, U. A. Boyarskikh, D. V. Petrov, S. B. Glatko**

#### **Colorectal Cancer and Polymorphisms of Key Enzymes Genes of Folate Cycle**

Changes of folate cycle enzymes activity due to polymorphisms of genes disrupt the methylation and DNA repair and increase the risk of cancer development. The aim of the study is to determine the effect of polymorphic alleles of genes coding for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) in the risk of colon adenocarcinoma. The study subjects were venous blood samples of 101 patients with colon adenocarcinoma (collected from 09.01.2007 at 13.03.2007). Venous blood of 157 individuals without cancer history were the controls. Using PCR MTHFR A1298C and C677T; MTR A2756G; MTRR A66G polymorphisms were determined. We were using Odds ratio with 95 % confidence interval to evaluated risk of colon cancer. Results. MTR 2756G allele and 2756 A/G; G/G genotypes and MTRR 66G allele and 66 A/G; G/G genotypes were not associated with colon cancer risk.

*Keywords:* colon, adenocarcinoma, gene polymorphism, folate cycle.