УДК 577

**КОРРЕЛЯЦИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С УРОВНЕМ
ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ВИТАМИНА D
ПРИ ПОЛИМОРФИЗМЕ *FOKI* ГЕНА *VDR***

Кравцова Ольга Александровна

к.б.н., доцент

Лангенбах Лиана Агзамовна

аспирант

Казанский федеральный университет (КФУ)

Аннотация: Дефицит витамина D и доброкачественные заболевания молочных желез (ДЗМЖ) считаются независимыми факторами риска рака груди. Было показано, что полиморфизм гена *VDR* связан с дефицитом витамина D (VD) в тканях, но его влияние на уровень циркулирующих форм до сих пор неизвестен. В данной работе мы изучаем связь между полиморфизмом гена *VDR* (rs2228570) и циркулирующими формами VD в крови у здоровых женщин и пациентов с доброкачественными заболеваниями молочных желез. Целью данного исследования является провести анализ ассоциации полиморфизма *FokI* (rs2228570) гена *VDR* с риском развития доброкачественных заболеваний молочной железы и оценить его влияние на уровень циркулирующей формы витамина D при разных клинических формах ДЗМЖ.

Ключевые слова: ген *VDR*, полиморфизм *FokI*, коррекция витамина D, доброкачественные заболевания груди.

**CORRELATION OF THE RISK OF DEVELOPMENT OF BENIGN
BREAST DISEASES WITH A LEVEL OF CIRCULATING VITAMIN D
CONCENTRATION IN FOKI VDR GENE POLYMORPHISM**

Kravtsova Olga Alexandrovna

Langenbach Liana Agzamovna

Abstract: Vitamin D deficiency and breast benign disease (BBD) are considered to be an independent risk factors for the breast cancer. It's been shown

that VDR gene polymorphism associated with deficiency of vitamin D (VD) in tissue but its effect on the level of circulating forms is still unclear. In recent work we study association between VDR gene polymorphism (rs2228570) and circulating forms of VD in the blood in healthy women and patients with benign breast diseases. The purpose of this study is to analyze the association of the FokI (rs2228570) polymorphism of the VDR gene with the risk of developing benign breast diseases and to assess its effect on the level of the circulating form of vitamin D in clinical forms of breast cancer.

Key words: VDR gene, FokI polymorphism, vitamin D correction, breast benign disease

Введение: Доброкачественные заболевания молочных желез (ДЗМЖ) остаются одной из актуальных проблем в современном обществе. Молочные железы, в силу высокой чувствительности паренхимы, являются органами-мишенями для воздействия стероидных гормонов, а также прямого или косвенного влияния пролактина, гонадотропных гормонов, гормонов щитовидной железы, коры надпочечников, инсулина и факторов роста. Гормоны оказывают свое влияние на клеточном уровне, связываясь со специфическими рецепторами в тканях молочных желез. Главными индукторами гормонозависимой пролиферации в органах и тканях женской репродуктивной системы являются метаболиты эстрогенов.[1]. Мультифакториальность данных заболеваний предполагает сочетание ряда неблагоприятных факторов, среди которых особое место отводится дефициту витамина D (VD). [2]

Активной формой витамина D3 является кальцитриол - 1,25-дигидроксивитамин D3 (1,25 (ОН)2D3), и показывает плеiotропный активность в организме человека [1-4]. Биологические эффекты VD, такие как ингибирование, пролиферация путем блокирования элементов клеточного цикла, вмешательство в передачу сигналов факторами роста, индукция апоптоза, стимуляция восстановления повреждений ДНК, предотвращение ангиогенеза опухоли и ингибирование метастазирования, позволяют рассматривать его как один из возможных протекторных факторов в профилактике и лечении доброкачественных заболеваний молочных желез.

Витамин D3 выполняет свои биологические функции через взаимодействие с рецептором витамина D (VDR), а член семейства ядерных

рецепторов, активируемых стероидными гормонами [7–9]. После связывания 1,25 (ОН) $2D_3$, VDR гетеродимеризуется с ретиноевая кислота X рецептор (RXR) и после транслокации в ядро действует как транскрипционный фактор для генов с витамином D элементы реагирования (VDREs). VDR был обнаружен почти во всех тканях человеческого тела [2,3]. ВДР также был обнаружен в опухолевых клетках; однако его экспрессия при этих поражениях часто снижается [10–14]. Кроме того, полиморфизм VDR является ассоциируется с повышенным риском развития различных видов рака типы, включая меланому, рак молочной железы и легких [15–17].

Биологически активная форма витамина D $_3$ синтезируется путем двухступенчатого гидроксилирования. Первый шаг в этом направлении гидроксилирование в печени катализируется CYP27A1 или CYP2R1, члены семейства цитохромов P450. Вторая реакция такова катализируется 25-гидроксивитамин D $_3$ 1- α -гидроксилазой (CYP27B1) в дистальном извитом канальце, кортикальном и медуллярном часть собирательных протоков и сосочковый эпителий почек [18]. Однако фермент CYP27B1 выражается вездесуще в организме встречается у нескольких нормальных людей ткани, такие как кожа, лимфатические узлы, толстая кишка, плацента, мозг, грудь, плацента и надпочечники [3,4,6,19,20]. CYP27B1 также экспрессируется в злокачественных тканях, включая легкие [21], рак толстой кишки [22] и молочной железы [23], а также дисгерминомы [24]. Он также экспрессируется в иммунных клетках [5]. Внепочечное выражение CYP27B1 может повышать местный уровень биологически активных веществ кальцитриол для регуляции клеточных и тканевых функций на периферии уровни. В физиологических условиях уровни CYP27B1 регулируется кальцитриолом и VDR через отрицательную обратную связь механизм [25]. Однако в патологические состояния эта регуляция может быть нарушена или активизирована, холекальциферол может быть ингибирован, что приводит к снижению местного уровни антиканцерогенного 1,25 (ОН) $2D_3$.

Доброкачественные заболевания молочной железы (ДЗМЖ), такие как фиброзно-кистозная мастопатия (диффузная форма мастопатии, ДФМ) и фиброаденома (ФА), занимают лидирующее место в структуре заболеваний молочных желез. Установлено, что у женщин с ФКМ отмечается повышенный риск развития рака молочной железы (РМЖ), а сочетание мастопатии и рака, по данным гистологических исследований, составляет около 46%.

В течение последних нескольких лет, особое значение в развитии РМЖ уделяется роли витамина D (VD), дефицит которого является доказанным фактором риска для многих злокачественных заболеваний. При этом противораковый эффект VD связывают, в первую очередь, с подавлением пролиферации и дифференцировки опухолевых клеток. Между тем, данные о влиянии дефицита VD на риск развития ДЗМЖ отсутствуют.

Полиморфизм гена *VDR*, кодирующего ядерный рецептор VD, рассматривается как одна из причин тканевого дефицита витамина D, однако не исключается и влияние полиморфизма на уровень циркулирующей формы витамина D.

Материалы и методы: Материалом для генотипирования служили образцы ДНК, полученные из клеток лейкоцитов периферической крови у 216 женщин, не состоящих в биологическом родстве: 81 пациентки с диагнозом ДФМ, 35 - с ФА и 100 женщин из группы сравнения без признаков заболеваний молочной железы. Диагноз устанавливался на основании физикального осмотра, ультразвукового исследования молочных желез и цифровой маммографии, подтверждался данными пункционной биопсии и результатами гистологического исследования тканей, полученных в результате секторальной резекции молочной железы. Генотипирование проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов (ООО «СибДНК», г. Новосибирск). Уровень циркулирующей формы VD в сыворотке крови оценивали методом ИФА (Abbott Laboratories). Обработку полученных результатов проводили в статистической среде R в программе RStudio.

Результаты: Исходное содержания VD (нг/мл) у пациенток с ДЗМЖ оказалось достоверно ниже, чем у здоровых женщин ($20,61 \pm 0,71$ и $29,8 \pm 0,97$ соответственно) вне зависимости от возраста обследуемых. При этом, низкая обеспеченность VD (<20 нг/мл) выявлена для 88% больных с ДЗМЖ и 64% здоровых женщин, однако степень недостаточности в этих группах различна: ДЗМЖ сопровождаются глубоким дефицитом VD, который встречается у каждой второй пациентки.

При анализе ассоциации исследуемого полиморфного локуса с риском развития ДЗМЖ, значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов между исследованными группами обнаружено не было, при этом во всех группах соблюдалось соответствие равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Тем не менее, при анализе ассоциации генотипов исследованного локуса с уровнем VD, показано, что только у пациенток с ДФМ данный полиморфизм оказывает достоверное влияние на обеспеченность VD, а у пациенток с ФА и здоровых женщин полиморфизм *FokI* гена *VDR* не оказывал значимого влияния на уровень циркулирующей формы VD.

Исследуемый полиморфизм характеризуется заменой Т на С в первом кодоне первого экзона, приводящей к замене метионина на треонин (Met1Thr), что, в свою очередь, приводит к созданию альтернативного сайта инициации трансляции. При этом, альтернативный транскрипт с меньшей длиной, образующийся в результате замены Т на С, по данным ряда исследований, обладает более высоким сродством к транскрипционному фактору TFIIВ, что, в свою очередь, оказывает влияние на экспрессию витамин Д-зависимых генов.

Применение теста Тьюки с целью оценки достоверности различий в обследованных группах показало, что гомозиготные по аллелю Т пациентки с ДФМ характеризуются достоверно более низким уровнем VD: медиана 17,2 нг/мл (1st Qu – 13,5 нг/мл, 3rd Qu – 18,8 нг/мл, $p=0.04$) по сравнению с генотипом СС (медиана 20,1 нг/мл, 1st Qu – 16,5 нг/мл, 3rd Qu – 25,2 нг/мл). При этом, средняя величина отличий составила -3,64 нг/мл (95% ДИ для уровня различий -7,24 – -0,04 нг/мл). Пациентки с гетерозиготным генотипом СТ характеризуются тенденцией к более низкому уровню VD по сравнению с гомозиготами СС (медиана 17,6 нг/мл, 1st Qu – 13,1 нг/мл, 3rd Qu – 20,1 нг/мл, $p=0,069$).

Выводы: Полиморфизм *FokI* гена *VDR* оказывает влияние на уровень циркулирующей формы витамина D у пациенток с ДФМ и может являться одним из звеньев патогенеза, повышающим индивидуальный риск развития рака молочной железы.

Однако, отсутствие различий в уровне циркулирующей формы VD у пациенток с фиброаденомами в зависимости от генотипов исследованного полиморфизма позволяет предполагать иные механизмы развития дефицита витамина Д у таких пациентов, что требует дальнейшего исследования.

Список литературы

1. Bikle D: Nonclassic actions of vitamin D. J Clin Endocrinol Metab. 94:26–34. 2009. View Article : Google Scholar
2. Holick MF: Vitamin D: Its role in cancer prevention and treatment. Prog Biophys Mol Biol. 92:49–59. 2006. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
3. Holick MF: Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 357:266–281. 2007. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
4. Plum LA and DeLuca HF: Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 9:941–955. 2010. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
5. Hewison M: Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinol Metab Clin North Am. 39:365–379. 2010. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
6. Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, St-Arnaud R and Mehta RG: 25-Hydroxyvitamin D3 is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture. Breast Cancer Res Treat. 113:31–41. 2009. View Article : Google Scholar
7. Bikle DD: Vitamin D: an ancient hormone. Exp Dermatol. 20:7–13. 2011. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
8. Bikle DD: Vitamin D and the skin: physiology and pathophysiology. Rev Endocr Metab Disord. 13:3–19. 2012. View Article : Google Scholar
9. Thorne J and Campbell MJ: The vitamin D receptor in cancer. Proc Nutr Soc. 67:115–127. 2008. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
10. Brożyna AA, Jozwicki W, Janjetovic Z and Slominski AT: Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. Hum Pathol. 42:618–631. 2011. View Article : Google Scholar
11. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE and Wu-Wong JR: Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 57:234–240. 2006. View Article : Google Scholar
12. Brożyna AA, Jóźwicki W and Slominski AT: Decreased VDR expression in cutaneous melanomas as marker of tumor progression: new data and analyses. Anticancer Res. 34:2735–2744. 2014
13. Brożyna AA, Jóźwicki W and Slominski AT: Decreased VDR expression in cutaneous melanomas as marker of tumor progression: new data and analyses. Anticancer Res. 34:2735–2744. 2014

14. Matusiak D, Murillo G, Carroll RE, Mehta RG and Benya RV: Expression of vitamin D receptor and 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in normal and malignant human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:2370–2376. 2005. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
15. Menezes RJ, Cheney RT, Husain A, et al: Vitamin D receptor expression in normal, premalignant, and malignant human lung tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17:1104–1110. 2008. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
16. Fu Y, Li J and Zhang Y: Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the lung cancer risk. *Tumour Biol.* 35:1323–1330. 2014. View Article : Google Scholar
17. Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, et al: Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. *Eur J Cancer.* 45:3271–3281. 2009. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
18. Shan JL, Dai N, Yang XQ, et al: FokI polymorphism in vitamin D receptor gene and risk of breast cancer among Caucasian women. *Tumour Biol.* 35:3503–3508. 2014. View Article : Google Scholar
19. Zehnder D, Bland R, Walker EA, et al: Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 10:2465–2473. 1999. PubMed/NCBI
20. Slominski AT, Kim TK, Shehabi HZ, et al: In vivo evidence for a novel pathway of vitamin D3 metabolism initiated by P450scc and modified by CYP27B1. *FASEB J.* 26:3901–3915. 2012. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
21. Slominski AT, Kim TK, Shehabi HZ, et al: In vivo production of novel vitamin D2 hydroxy-derivatives by human placentas, epidermal keratinocytes, Caco-2 colon cells and the adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol.* 383:181–192. 2014. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
22. Radermacher J, Diesel B, Seifert M, et al: Expression analysis of CYP27B1 in tumor biopsies and cell cultures. *Anticancer Res.* 26:2683–2686. 2006. PubMed/NCBI
23. Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, et al: 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet.* 357:1673–1674. 2001. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI

24. Lopes N, Sousa B, Martins D, et al: Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. BMC Cancer. 10:4832010. View Article : Google Scholar

25. Evans KN, Taylor H, Zehnder D, et al: Increased expression of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in dysgerminomas: a novel form of humoral hypercalcemia of malignancy. Am J Pathol. 165:807–813. 2004. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI

26. Takeyama K and Kato S: The vitamin D3 1 α -hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D3. Biosci Biotechnol Biochem. 75:208–213. 2011. View Article : Google Scholar

© О.А. Кравцова, Л.А. Лангенбах, 2020