

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №__ засідання кафедри

від “__” _____ 2026 р.

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ
ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ З ПРОФІЛЕМ ОНКОМАРКЕРІВ ТА
С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та
біохімія

Опрелянського Михайла
Олександровича

Науковий керівник від кафедри
д-р біол. наук, ст. наук. співроб.
Андрійчук Т.Р.

Робота виконана у молекулярно-генетичному відділі ТОВ «Медична
Лабораторія» під керівництвом завідуючої медичної лабораторії, імунолога,
Пархомчук Карини Юріївни.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФП	–	альфа-фетопротеїн;
ГЦК	–	гепатоцелюлярна карцинома;
ГМЛ	–	гостра мієлоїдна лейкемія;
PE	–	рак ендометрія;
CA15-3	–	cancer antigen 15-3 (онкомаркер 15-3);
CA-125	–	cancer antigen 125 (онкомаркер 125);
CA19-9	–	cancer antigen 19-9 (онкомаркер 19-9);
CYFRA 21-1	–	cytokeratin 19 fragment (фрагмент цитокератину 19);
CEA	–	carcinoembryonic antigen (карциноембріональний антиген);
CA-242	–	cancer antigen 242 (онкомаркер 242);
CA 72-4	–	cancer antigen 72-4 (онкомаркер 72-4);
CRP	–	C-reactive protein (С-реактивний білок);
DNMT3A	–	DNA methyltransferase 3 alpha (ДНК метилтрансфераза 3 альфа);
EZH2		enhancer of zeste homolog 2 (гомолог 2 енхансера zeste);
Fas	–	fas receptor (рецептор fas);
FADD	–	fas-associated protein with death domain (апоптотичний білок, асоційований із fas);
HE4	–	human epididymis protein 4 (білок епідидимісу 4);
IL-6	–	interleukin-6 (інтерлейкін-6);
MTHFR	–	methylenetetrahydrofolate reductase (метилентетрагідролатредуктаза);
MTR	–	methionine synthase (метіонінсинтаза);
MTRR	–	methionine synthase reductase (редуктаза метіонінсинтази);
PRC2	–	polycomb repressive complex 2 (полікомб-репресивний комплекс 2);

- TET – ten-eleven translocation proteins (білки транслокації
десять-одинадцять);
- YKL-40 – chitinase-3-like protein 1 (хітиназа-подібний білок 1).

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Сучасні уявлення ролі донорів метильних груп у експресії онкомаркерів.....	8
1.1. Епідермальний білок людини 4	8
1.2. СА-125	9
1.3. СА15-3	11
1.4. СА-19-9.....	12
1.5. СА-242	12
1.6. Молекулярні маркери раку легень	13
1.7. Альфа-фетопротеїн	13
1.8. Маркер СА 72-4.....	15
1.9. С-реактивний білок	15
1.10. Роль фолатів в одноуглецевому метаболізмі.....	17
1.11. Метилування ДНК як етап епігенетичної регуляції.....	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	24
2.1. Етика проведення дослідження	24
2.2. Використані реактиви	24
2.3. Використані матеріали.....	27
2.4. Використане обладнання.....	27
2.5. Методи роботи.....	28
2.5.1. Забір зразків	28
2.5.2. Реєстрація та пробопідготовка зразків крові.....	28
2.5.3. Підготовка приміщення до виділення нуклеїнових кислот.....	29

	5
2.5.4. Екстракція нуклеїнових кислот	29
2.5.5. Приготування ПЛР сумішей «Biosorp»	30
2.5.6. Налаштування порогової лінії ампліфікації	31
2.5.7. Контроль якості	31
2.5.8. Інтерпретація результатів ампліфікації	32
2.5.9. Визначення онкомаркерів методом імунохемілюмінесцентного аналізу.....	32
2.5.10. Калібрування та обчислення аналітичної концентрації.....	33
2.5.11. Визначення концентрації СА15-3.....	33
2.5.12. Визначення концентрації гомоцистеїну, фолату та вітаміну В12.....	34
2.5.13. Визначення концентрації С-реактивного білка	35
2.5.14. Статистична обробка даних	36
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	38
3.1. Кореляції між досліджуваними показниками у жінок 25-44 років.....	39
3.2. Кореляції між досліджуваними показниками у жінок 45 -70 років.....	45
3.3. Кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 25-44 років.....	54
3.4. Кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 45-70 років.....	62
ВИСНОВКИ	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	70

ВСТУП

Онкологічні захворювання залишаються однією з провідних причин захворюваності та смертності у світі, що визначає актуальність пошуку нових підходів до їх ранньої діагностики, прогнозування та профілактики [1]. У сучасних дослідженнях все більше уваги приділяється ролі метаболічних і епігенетичних механізмів у розвитку пухлинного процесу. Зокрема, ключове значення має фолатний цикл — система одноуглецевого метаболізму, яка забезпечує синтез нуклеотидів і метильних груп, необхідних для метилювання ДНК та регуляції експресії генів. Порушення функціонування фолатного обміну, зумовлене як зовнішніми чинниками (дефіцит фолатів, особливості харчування), так і генетичними варіантами ферментів, може призводити до змін рівнів гомоцистеїну, порушення метилювання ДНК та активації патологічних процесів, зокрема канцерогенезу. Особливий інтерес становлять поліморфізми генів фолатного циклу, які можуть впливати на індивідуальні особливості метаболізму та визначати схильність до розвитку захворювань. Водночас важливим компонентом пухлинного мікрооточення є хронічне запалення, яке тісно пов'язане з процесами проліферації, ангіогенезу та метастазування. Зміни метаболічного статусу можуть відобразитися на рівнях як запальних маркерів, так і пухлинних антигенів, що широко використовуються у клінічній практиці для діагностики та моніторингу онкологічних захворювань.

Метою даної роботи є дослідження кореляцій між поліморфізмами генів фолатного циклу, показниками його метаболітів, рівнем С-реактивного білка, як маркера запалення, та панеллю онкомаркерів різних типів раку у розподілі за віком та статтю.

Відповідно до поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити кореляції між досліджуваними показниками у жінок 24-44 років за рівнем С-реактивного білка та генотипами циклу фолієвої кислоти.

2. Встановити кореляції між досліджуваними показниками у жінок 45-70 років за рівнем С-реактивного білка та генотипами циклу фолієвої кислоти
3. Встановити кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 25-44 років за рівнем С-реактивного білка та генотипами циклу фолієвої кислоти
4. Встановити кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 45-70 років за рівнем С-реактивного білка та генотипами циклу фолієвої кислоти.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ РОЛІ ДОНОРІВ МЕТИЛЬНИХ ГРУП У ЕКСПРЕСІЇ ОНКОМАРКЕРІВ

1.1. Епідермальний білок людини 4

Епідермальний білок людини 4 (HE4) — це глікопротеїн, рівень якого часто підвищений у сироватці крові пацієнтів з РЕ, що робить його перспективним кандидатом для діагностичних і прогностичних застосувань. Підвищений рівень HE4 асоціюється з несприятливими прогностичними ознаками, такими як запущена стадія, глибока інвазія міометрія та ураження лімфатичних вузлів. Тому HE4 може допомогти у прийнятті клінічних рішень щодо обсягу хірургічного втручання та необхідності додаткового (ад'ювантного) лікування.

Сироватковий HE4 також продемонстрував потенціал у прогнозуванні ефективності прогестинової терапії у пацієнтів з раком ендометрію на ранній стадії. Все більша увага приділяється прогностичним моделям та алгоритмам, які поєднують HE4 з іншими біомаркерами, а також клінічними та візуалізаційними параметрами, для підвищення точності діагностики та прогнозування. Однак на концентрації HE4 можуть впливати такі фактори, як вік та порушення функції нирок, що слід враховувати при інтерпретації результатів [1].

Людський епідидимальний білок 4 (HE4) належить до родини кислих білків сироватки і був вперше виявлений в епітеліальних клітинах дистального епідидиму. Він кодується геном *WFDC2*, розташованим на хромосомі 20q12–13.1. Структурно HE4 містить чотиридисульфідний основний домен типу WAP, який має схожість із позаклітинними інгібіторами протеази. Хоча HE4 був вперше виявлений у чоловічій репродуктивній тканині, він також

експресується в епітелії декількох інших тканин, включаючи тканини жіночої репродуктивної системи, і помітно надекспресується в багатьох типах раку [2].

Точна біологічна роль HE4 досі до кінця не з'ясована, проте останні дані свідчать про те, що він сприяє проліферації, інвазії та росту пухлин при раку ендометрія (PE). Клінічно, сироватковий HE4 вже затверджений для використання в діагностиці та спостереженні за рецидивами раку яєчників. Інтерес до його застосування при ЕК значно зріс, оскільки більше 90% випадків раку ендометрія супроводжуються підвищеною експресією HE4. У порівнянні з широко використовуваним пухлинним маркером СА125, HE4 демонструє вищу чутливість і специфічність для виявлення ЕК. Крім того, було показано, що його рівні корелюють з гістопатологічними показниками агресивності пухлини, виживаності пацієнтів та ризику рецидиву, що підкреслює його потенціал як цінного неінвазивного біомаркера [3].

Епідимальний білок людини 4 (HE4), білок оротової кислоти, вперше виявлений у дистальних епітеліальних клітинах епідиміуса. HE4 широко експресується в трахеї, слинній залозі, тканині легенів тощо, а також має високу експресію при раку яєчників, раку ендометрія та раку легенів. Водночас вік і менопаузальний статус також є важливими факторами, що впливають на рівні HE4. Наразі сироватковий HE4 в основному використовується для діагностики та моніторингу рецидивів раку яєчників із чутливістю 67%. HE4 також використовується для оцінки ефективності лікування раку яєчників. Крім того, HE4 також надмірно експресується в інших негінекологічних злоякісних новоутвореннях, включаючи НДРК, рак підшлункової залози та перехідноклітинну карциному [4, 5].

1.2. СА-125

СА125 — це сильно глікозильований муцин, який був вперше ідентифікований під час скринінгу за допомогою моноклонального антитіла

OC125 проти клітинної лінії раку яєчників OVCA433. З моменту свого відкриття CA125 став одним з основних біомаркерів, що використовуються для моніторингу епітеліального раку яєчників, з діагностичною чутливістю приблизно 70 % у цій ситуації. Його важливість у прогнозуванні результатів для пацієнтів з раком яєчників також добре встановлена [6].

Гінекологічна онкологічна інтергрупа (GCIG – the gynecologic cancer intergroup) продемонструвала, що рівні CA125 в сироватці крові відображають прогресування та рецидив раку яєчників. Згідно з критеріями GCIG, пацієнтки, у яких концентрація CA125 після операції або хіміотерапії повертається до нормального референтного діапазону (<35 Од/мл), вважаються такими, що досягли повної ремісії. І навпаки, підвищення рівня CA125 щонайменше вдвічі від найнижчого зареєстрованого значення (≥ 70 Од/мл) вважається ознакою прогресування або рецидиву захворювання [7].

Крім раку яєчників CA125 також слугує діагностичним і прогностичним маркером у ряді інших злоякісних новоутворень, включаючи рак шийки матки, рак ендометрія та рак шлунка. Однак підвищений рівень CA125 не є специфічним для злоякісних новоутворень: приблизно 1% здорових осіб і близько 5% пацієнтів із захворюваннями, пов'язаними з менструацією, або доброякісними захворюваннями, такими як ендометріоз або ішемічна хвороба серця, також можуть мати підвищену концентрацію в сироватці крові [8].

Останні дослідження вказують на зростаючу увагу до розуміння ролі цього біомаркера у постійному моніторингу та довгостроковому спостереженні за пацієнтами з раком молочної залози. Проте результати досліджень щодо користі CA-125 у скринінгу та діагностиці раку молочної залози були суперечливими, що підкреслює необхідність ретельної оцінки його потенційної прогностичної цінності та пошуку кореляцій з іншими показниками [9, 10].

1.3. CA15-3

Раковий антиген 15-3 (CA15-3) — це маркер пухлин, котрий визначають на основі аналізу сироватки крові, тож широко використовується в клінічному діагностуванні раку молочної залози. Це неінвазивний, легкодоступний і відносно недорогий тест, який допомагає в діагностиці, постійному моніторингу та ранньому виявленні рецидиву захворювання [11].

CA 15-3, який ідентифікує циркулюючі форми білка MUC-1 (mucin-1), застосовується в першу чергу для моніторингу реакції на лікування у осіб з метастатичним захворюванням. У цьому контексті не слід покладатися на CA 15-3 як на самостійний тест; його слід інтерпретувати разом з результатами візуалізації, клінічною історією та фізичним обстеженням. Він особливо корисний у випадках, коли пухлинне навантаження не може бути адекватно оцінено за допомогою стандартних радіологічних методів [12].

CA 15-3 також може використовуватися для післяопераційного спостереження за безсимптомними жінками, які лікуються від інвазивного раку молочної залози. Регулярне вимірювання може виявити рецидив або метастатичне захворювання приблизно на 5–6 місяців раніше, ніж клінічне або радіологічне підтвердження. Однак залишається невизначеним, чи призводить початок системної терапії, заснованої виключно на цьому ранньому виявленні, до поліпшення виживаності або загальних результатів. Як результат, професійні рекомендації щодо рутинного використання CA 15-3 для спостереження за безсимптомними пацієнтками після початкового лікування різняться [13].

Істотним недоліком CA 15-3 є його обмежена чутливість на ранніх стадіях або при локалізованому раку молочної залози, оскільки в цих випадках концентрація в сироватці крові рідко підвищується, тож потребується додаткові дослідження з метою підвищення точності діагностики [13].

1.4. CA-19-9

Вуглеводний антиген 19-9 (CA19-9) — це глікопротеїн муцинового типу, що належить до родини антигенів групи крові Льюїса. Його утворення є біохімічно складним процесом, що передбачає поетапне приєднання вуглеводних залишків до ланцюга-попередника типу 1 на білках. Ключовим етапом цього процесу є додавання фукози до залишку N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) у положенні 1,4, що залежить від активності ферменту антигену Льюїса $\alpha(1,3/4)$ -фукозилтрансферази (FUT3 – fucosyltransferase 3) [14].

У клінічній практиці CA19-9 широко застосовується як пухлинний маркер і продемонстрував діагностичну корисність при раку підшлункової залози, товстої кишки та інших видах раку шлунково-кишкового тракту. Підвищений рівень в сироватці крові також спостерігався у пацієнтів з раком яєчників, молочної залози, шийки матки, сечового міхура та носоглотки, а також у осіб з цукровим діабетом 2 типу. Проте CA19-9 найчастіше визнається традиційним біомаркером раку підшлункової залози в сироватці крові і широко використовується в його діагностиці та моніторингу [15].

Важливо, що приблизно 5–10 % осіб не мають антигену Льюїса (Льюїс-негативний фенотип), що означає, що вони виробляють мало або взагалі не виробляють CA19-9. З цієї причини тестування на CA19-9 не рекомендується як діагностичний інструмент у пацієнтів з Льюїс-негативним раком підшлункової залози. Тому для підвищення точності діагностики необхідні додаткові біомаркери в поєднанні з CA19-9 [16].

1.5. CA-242

Раковий антиген CA-242 є вуглеводним антигеном, що містить сіалову кислоту та може бути присутнім на поверхні клітин у вигляді глікопротеїну або гліколіпиду, або циркулювати в сироватці крові як глікопротеїн

муцинового типу з О-зв'язками. Підвищені рівні СА-242 вже давно використовуються як серологічні маркери шлунково-кишкових захворювань, зокрема раку підшлункової залози. Однак, оскільки підвищена експресія СА-242 також спостерігалася у кількох гінекологічних пухлинах, все більше доказів свідчить про те, що цей маркер може мати потенційну цінність у скринінгу раку серед жінок [17].

1.6. Молекулярні маркери раку легень

Карциноембріональний антиген (СЕА) є одним із перших виявлених онкофетальних антигенів і належить до великого сімейства глікопротеїнів клітинної поверхні з молекулярною масою приблизно 150–300 кДа. Він розташований на плазматичній мембрані пухлинних клітин і може потрапляти в кровотік. Хоча СЕА спочатку був виявлений при колоректальному раку, його діагностичне та клінічне значення також широко досліджувалося при раку легень. Іншим важливим біомаркером є CYFRA 21-1, поліпептид, який виявляє розчинні фрагменти цитокератину 19. Цитокератин 19 є ацидним цитокератином типу I, присутній як у нормальних епітеліальних тканинах, так і в злоякісних клітинах, зокрема в ракових пухлинах легень. Завдяки цьому CYFRA 21-1 вважається добре відомим біомаркером і широко використовується в діагностиці та моніторингу раку легень [18].

1.7. Альфа-фетопроутейн

Альфа-фетопроутейн (АФП) — це основний онкофетальний білок у ссавців, який інтенсивно синтезується під час внутрішньоутробного розвитку, але присутній у тканинах дорослих лише в дуже малих кількостях. Він належить до родини генів альбуміну, до якої також входять сироватковий

альбумін, білок, що зв'язує вітамін D, та афамін. Завдяки специфічним взаємодіям із рецепторами та здатності зв'язувати ліганди АФП виконує різноманітні фізіологічні функції. Він здатний зв'язуватися з понад 50 різними молекулами, включаючи білірубін, жирні кислоти, естрогеноподібні сполуки, такі як флавоноїди, а також синтетичні стероїди, барвники, токсини, ретиноїди та гормони щитовидної залози [19].

Під час внутрішньоутробного розвитку АФП в основному виробляється жовтковим мішком та печінкою плода. Він бере участь у важливих процесах розвитку, зокрема у утворенні еритроцитів, розвитку тканин та органів, а також у дозріванні імунної системи. Рівень АФП значно варіюється у плода, вагітних жінок та в післяпологовий період. У випадках прееклампсії концентрація АФП у матері часто вища, ніж при нормальному перебігу вагітності, що, ймовірно, свідчить про дисфункцію плаценти та підвищену проникність плодово-материнського бар'єру [20].

Хоча рівень АФП у сироватці крові широко визнається важливим прогностичним маркером у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою (ГЦК), останні дослідження свідчать про те, що цитоплазматичний АФП також відіграє значну роль у біології пухлини. Внутрішньоклітинний АФП може активувати сигнальний шлях PI3K/Akt/mTOR, який пригнічує аутофагію та сприяє виживанню клітин, проліферації та прогресуванню пухлини. АФП також взаємодіє з рецепторами ретиноєвої кислоти, запобігаючи їх транслокації в ядро та підвищуючи експресію антиапоптотичного білка Bcl-2 (B-cell lymphoma 2).

Крім того, АФП інгібує апоптоз шляхом пригнічення опосередкованого NuR (human antigen R) шляху Fas/FADD та підвищення експресії сигнальних молекул, таких як KRAS, циклічний АМФ та протеїнкіназа А, одночасно підвищуючи рівні цитозольного Ca^{2+} . Він також захищає клітини ГЦК від індукованої TNF (tumor necrosis factor) клітинної смерті та зменшує імуноопосередковану цитотоксичність. Важливо, що АФП може безпосередньо зв'язуватися з каспазою-3, блокуючи апоптотичний каскад. У

сукупності ці механізми свідчать про те, що сигнальні шляхи, пов'язані з АФП, можуть бути потенційними терапевтичними мішенями при ГЦК [21].

1.8. Маркер СА 72-4

СА72-4 є глікопротеїном, який виявляється на поверхні багатьох клітин злоякісних карцином, зокрема при раку товстої кишки, раку яєчників, раку шлунка та раку підшлункової залози. У кількох опублікованих дослідженнях оцінювалася діагностична ефективність сироваткового СА72-4 як біомаркера для діагностики раку товстої кишки [22]. Незважаючи на те, що СА72-4 використовується в клінічній практиці вже протягом десятиліть, його помірні показники позитивних результатів, чутливості та специфічності не відповідали високим вимогам клінічного застосування. Проте з роками було досягнуто певного прогресу у функціях СА72-4, що свідчить про те, що СА72-4 все ще можна вважати перспективним маркером в онкології. Як біомаркер, СА72-4 може досягти покращеної чутливості та специфічності при поєднанні з іншими біомаркерами, виборі відповідних референтних значень, вдосконаленні методів виявлення та визначенні порогу ризику [23].

1.9. С-реактивний білок

Запалення визнається однією з основних характеристик раку, оскільки воно значно сприяє виникненню та прогресуванню пухлин. Компоненти мікросередовища пухлини, зокрема стромальні клітини, динамічно взаємодіють із злоякісними клітинами і можуть впливати на ріст пухлини та поширення метастазів. Наприклад, фібробласти, пов'язані з раком, реконструюють позаклітинний матрикс і посилюють міграцію клітин, інвазію та ангиогенез. Останні дані систематичних оглядів та метааналізів підкреслили

зв'язок між хронічним запаленням, що відображається в циркулюючих маркерах запалення, таких як С-реактивний білок (CRP) та інтерлейкін-6 (ІЛ-6), та підвищеним ризиком розвитку раку [24].

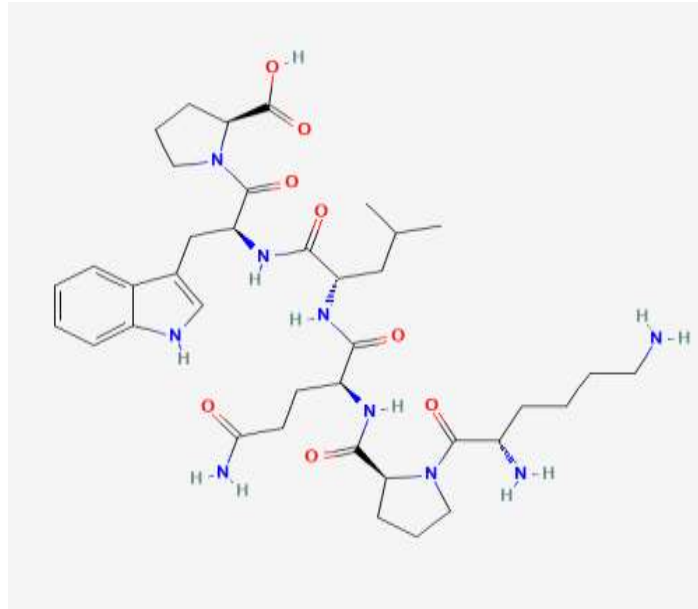


Рис 1.1. 2D візуалізація структури С-реактивного білка [24]

С-реактивний білок є гексапептидом з послідовністю Н-Lys-Pro-Gln-Leu-Trp-Pro-ОН (рис. 1.1.) [25]. Є найпоширенішим маркером запалення в крові, хоча він синтезується переважно гепатоцитами, а не самими запальними клітинами. На відміну від цього, інші медіатори запалення, такі як ІЛ-6 та YKL-40 (chitinase-3-like protein 1), продукуються імунними клітинами, компонентами стромі і навіть раковими клітинами. ІЛ-6 відіграє багато ролей у біології пухлин: він індукує вироблення CRP, сприяє стромальній десмоплазії, підтримує імуносупресію та ангіогенез, спричинені пухлиною, пригнічує апоптоз, стимулює проліферацію ракових клітин та сприяє метастазуванню, включаючи створення прометастатичного середовища в печінці. Підвищений рівень циркулюючого ІЛ-6 пов'язують зі зменшенням загальної виживаності пацієнтів із запальними захворюваннями, а також із різними типами раку [26].

1.10. Роль фолатів в одноуглецевому метаболізмі

Фолати відіграють центральну роль в одноуглецевому метаболізмі, біохімічній мережі, відповідальній за постачання метильних груп, необхідних для метилювання ДНК. Доступність біологічно активних метильних груп залежить не тільки від споживання фолатів з їжею та засвоєння фолієвої кислоти, але й від інших ключових компонентів одноуглецевого метаболізму, включаючи холін та метіонін. Дефіцит фолатів пов'язують з гіпометилюванням ДНК, тоді як підвищений рівень фолатів може потенційно сприяти гіперметилюванню, хоча докази в цьому спрямуванні залишаються обмеженими. Якщо збагачення фолієвою кислотою впливає на патерни метилювання ДНК, теоретично це може впливати на виникнення або прогресування захворювань. Тому розуміння впливу споживання фолієвої кислоти на метилювання ДНК має велике значення [27].

Вважається, що фолати впливають на ризик розвитку різних видів раку епітеліальних клітин, включаючи злоякісні новоутворення молочної залози, яєчників, підшлункової залози, мозку, легенів, простати та шийки матки; проте результати різних досліджень залишаються суперечливими. Хоча порушення рівня фолатів пов'язують із канцерогенезом на патофізіологічному рівні, епідеміологічні дані щодо прийому добавок фолатів є суперечливими. Дані ретроспективних, контрольних, проспективних досліджень та метааналізів показують неоднозначні результати: деякі дослідження вказують на захисний ефект, інші не демонструють чіткого зв'язку, а деякі навіть вказують на потенційне підвищення ризику раку. Аналогічні суперечливі дані також були отримані щодо рівнів гомоцистеїну та вітаміну В6 [28].

5,10-метилентетрагідрофолатредуктаза (MTHFR) є ключовим регуляторним ферментом в одноуглецевому метаболізмі, необхідним для перетворення фолатів у їх біологічно активні форми і, таким чином, для підтримки біодоступності фолатів. Поширений поліморфізм *MTHFR C677T* пов'язаний зі зниженою ферментативною активністю, що призводить до

зниження концентрації фолатів у крові і, як наслідок, до підвищення потреби у фолатах у носіїв цього поліморфізму. Крім того, генотип *MTHFR* модулює взаємозв'язок між рівнем фолатів і критичними клітинними процесами, включаючи реплікацію ДНК, необхідну для поділу і виживання клітин, та метилювання ДНК, яке є фундаментальним для регуляції генів [29].

Ген *MTR* кодує 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн-метилтрансферазу, котра також відома як кобаламінзалежна метіонінсинтаза, каталізує останній етап біосинтезу метіоніну. Мутації в *MTR* були ідентифіковані як основна причина дефіциту метилкобаламіну групи комплементатії G. Для цього гена були виявлені альтернативні варіанти транскрипції, що кодують різні ізоформи [30].

Вітамін B12 — це загальний термін для позначення групи кобальтовмісних сполук, відомих як кобаламіни, які є необхідними для численних фізіологічних функцій. Нові дані свідчать про те, що вітамін B12 бере участь у різних патологічних механізмах, включаючи зміни в метилюванні ДНК, аномальні посттрансляційні модифікації білків, зміни в складі мікрофлори кишечника, зміни в ризику розвитку раку та регуляцію запальних реакцій. Ці процеси, пов'язані з вітаміном B12, можуть впливати на біологічне старіння, сприяючи клітинному старінню та хронічному запаленню. Окрім своєї встановленої ролі у зниженні ризику вікових захворювань, таких як когнітивні порушення, серцево-судинні захворювання, остеопороз та окислювальний стрес, завдяки адекватному прийому добавок, вітамін B12 також може впливати на розвиток прозапального секреторного фенотипу, пов'язаного зі старінням. Це може відбуватися через механізми, що включають модуляцію мікробіоти кишечника, мітохондріальну дисфункцію, аномальну транскрипцію генів та запалення, стійке слабке запалення, що спостерігається у літніх людей [31].

Структурно кобаламіни побудовані навколо майже плоского коринного кільця, яке координує центральний атом кобальту. Два ліганди перпендикулярно відходять від цього коріноподібного ядра: нижній (альфа)

ліганд — 5',6'-диметилбензімідазол, тоді як верхній (бета) ліганд варіюється у різних формах кобаламіну, визначаючи їхні специфічні хімічні властивості. У природі лише деякі прокаріоти, включаючи деяких представників мікробіоти кишечника людини, здатні синтезувати кобаламіни. Люди не мають здатності виробляти вітамін B12 *de novo* і повинні отримувати його з продуктів тваринного походження. Ціанокобаламін, стабільна синтетична форма, що утворюється в результаті бактеріальної ферментації і модифікована ціанідною групою для підвищення стабільності, є метаболічно неактивною, поки не перетворюється в організмі. Біологічно активними формами у ссавців є метилкобаламін і 5-дезоксиаденозилкобаламін (також відомий як аденозилкобаламін) [32].

Ген *MTRR*, розташований на короткому плечі хромосоми 5 (5p15.2–15.3), кодує метіонінсинтеазредуктазу, фермент, що бере участь у клітинних сигнальних процесах, які підтримують вироблення метіоніну. Зокрема, метіонінсинтеаза-редуктаза відновлює активність метіонінсинтеази, ферменту, відповідального за перетворення гомоцистеїну в метіонін у кобаламінзалежній реакції, пов'язаній з метаболізмом фолатів. Підтримуючи функцію метіонінсинтеази, *MTRR* сприяє підтримці достатньої доступності метильних груп в одновуглецевому циклі, підкреслюючи свою важливість у реакціях метилювання та загальних фолатзалежних метаболічних процесах [33].

Гомоцистеїн — це сірковмісна амінокислота, яка не входить до складу білків, але виконує важливу проміжну функцію в метаболічному шляху, що зв'язує метіонін і цистеїн. Хоча метіонін і цистеїн самі по собі не використовуються безпосередньо як структурні компоненти в цьому контексті, вони є важливими учасниками клітинних реакцій метилювання. Гомоцистеїн відіграє центральну роль у метаболізмі метіоніну, допомагаючи підтримувати достатню кількість метіоніну, необхідного для таких процесів, як вироблення білків і репарація ДНК. Залежно від потреб клітин, гомоцистеїн може або реметилюватися назад у метіонін, або вступати в шлях

транссульфурації з утворенням цистеїну — реакції, які вимагають специфічних вітамінів групи В як кофакторів [34].

1.11. Метилювання ДНК як етап епігенетичної регуляції

Епігенетична регуляція відіграє вирішальну роль у контролі експресії генів шляхом модифікації клітинних процесів без зміни самої послідовності ДНК. У цій регуляції беруть участь кілька основних механізмів, включаючи ремоделювання хроматину, хімічні модифікації гістонових білків та оборотні процеси метилювання та деметилювання ДНК. Разом ці механізми визначають, наскільки доступними є конкретні ділянки ДНК для проходження транскрипції, тим самим впливаючи на активацію або пригнічення певних генів [35].

Порушення нормальної епігенетичної регуляції все частіше визнаються важливими факторами розвитку та прогресування захворювань, особливо раку. Аномальні епігенетичні патерни пов'язані з ключовими клінічними результатами, такими як утворення пухлин, метастатичне поширення та рецидив захворювання. Тому дослідження того, як ці епігенетичні зміни впливають на експресію генів, може надати важливу інформацію про біологію раку. Більше того, розуміння цих процесів може сприяти розробці більш точних діагностичних підходів та цільових терапевтичних стратегій. Складний взаємозв'язок між епігенетичними модифікаціями та регуляцією генів підкреслює необхідність продовження досліджень, спрямованих на вивчення того, як епігенетичні втручання можуть поліпшити клінічні результати для пацієнтів [36].

ДНК-метилтрансфераза 3А (DNMT3A) є висококонсервативним ферментом з молекулярною масою приблизно 130 кДа, який відповідає за формування нових патернів метилювання ДНК шляхом каталізації метилювання залишків цитозину. Мутації в гені DNMT3A виявляються

приблизно у 20–25 % пацієнтів з новодіагностованою гострою мієлоїдною лейкемією (ГМЛ) і були вперше описані в 2010 році. Ці мутації часто виникають разом із змінами в інших генах, зокрема мутаціями *NPM1* (nucleophosmin 1) та *FLT3-ITD* (fms-like tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication), і, як правило, пов'язані з несприятливим клінічним прогнозом. Хоча мутації *DNMT3A* можуть проявлятися в декількох функціональних ділянках білка, майже 60 % уражених пацієнтів мають гетерозиготну заміну аргініну 882 у каталітичному домені. Ця специфічна мутація значно знижує метилтрансферазну активність ферменту та погіршує його здатність зв'язуватися з ДНК *in vitro*. У пацієнтів з ГМЛ мутація R882 пов'язана з поширеною гіпометилуванням ДНК, особливо в островах CpG, берегах CpG та промоторних ділянках, хоча в деяких дослідженнях також повідомлялося про локалізоване гіперметилування промотора. Мутантні білки *DNMT3A*, особливо ті, що несуть заміну R882, можуть взаємодіяти з нормальними молекулами *DNMT3A* та *DNMT3B* у доміантно-негативному режимі, тим самим пригнічуючи метилтрансферазну активність функціонального тетрамерного ферментного комплексу [37].

DNMT3A також відіграє важливу роль у регуляції гемопоетичних стовбурових клітин. У дорослих мишей цей фермент необхідний для підтримання нормальної здатності гемопоетичних стовбурових клітин до самовідновлення, зберігаючи при цьому їхню здатність до диференціації під час послідовної трансплантації. Експериментальне видалення *DNMT3A* в гемопоетичних стовбурових клітин мишей призводить до посиленого самовідновлення та порушення диференціації, що в кінцевому підсумку призводить до аномального накопичення стовбурових клітин у кістковому мозку [38].

Сімейство ферментів Ten–Eleven Translocation (TET) відіграє важливу роль у регулюванні метилування ДНК. Ці ферменти каталізують перетворення 5-метилцитозину у 5-гідроксиметилцитозин за допомогою реакції, яка вимагає α -кетоглутарату та Fe(II) як кофакторів. Серед них TET2

часто мутує при гематологічних злоякісних новоутвореннях. У більшості випадків мутації TET2 є гетерозиготними, що означає, що один нормальний алель залишається експресованим. Такі мутації виявляються приблизно у 7–23 % пацієнтів з гострою мієлоїдною лейкемією (ГМЛ), залежно від досліджуваної популяції, і пов'язані з несприятливим прогнозом при цитогенетично нормальній ГМЛ [39].

Епігенетична модифікація 5-гідроксиметилцитозин вважається ключовим проміжним етапом у процесі деметилювання ДНК, хоча також вважається, що вона сприяє більш широкій регуляції епігенетичних станів і транскрипції генів. Біохімічні дослідження продемонстрували, що мутації в TET2 призводять до зниження рівнів 5-гідроксиметилцитозин, що супроводжується підвищенням метилювання ДНК у всьому геномі, включаючи промоторні ділянки та тіла генів. Експериментальні дослідження з використанням мишачих моделей та людських клітин додатково показали, що втрата функції TET2 посилює здатність до самовідновлення гемопоетичних стовбурових клітин, сприяє розширенню популяцій стовбурових та прогеніторних клітин і зміщує диференціацію в бік мієломонаоцитарних та гранулоцитарних ліній [39, 40].

PRC2 – це комплекс гістонметилтрансферази, каталітична активність якого залежить від чотирьох основних субодиниць. Його функція суворо регулюється через взаємодію з кофакторами та ДНК. Було ідентифіковано два основних підтипи PRC2: PRC2.1, який містить полікомб-подібні білки, що допомагають залучати комплекс до CpG-островів, та PRC2.2, який включає консервативні білки JARID2 (jumonji at rich interactive domain 2) та AEBP2 (adipocyte enhancer-binding protein 2), що взаємодіють з убіквітинуваними гістонами [41].

Каталітична субодиниця EZH2 опосередковує триметилювання гістону H3 на залишку лізину 27 (H3K27me3), що є ключовою міткою у репресії активності генів. Інші компоненти PRC2 сприяють стабільності, залученню та активації комплексу. Втрата або інгібування EZH2 призводить до значного

зменшення міток H3K27me_{2/3}. EZH2 в основному експресується в проліферуючих клітинах і відіграє важливу роль у регулюванні таких процесів, як ангиогенез пухлин, апоптоз, епітеліально-мезенхімальний перехід, міграція та інвазія клітин [41, 42].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Етика проведення дослідження

У цій роботі було проведено генотипування на поліморфізми генів фолатного циклу, вимірювання рівнів панелі онкомаркерів та С-реактивного білка у зразках венозної крові жінок та чоловіків. Дослідження проведено відповідно до етичних принципів Гельсінкської декларації 1964 р. («Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження»), її перегляду 1975, 2008 рр. та стандартами ТОВ «Медична лабораторія». Усі зразки взяті з добровільної згоди пацієнтів.

2.2. Використані реактиви

1. Розчин етилового спирту 70 % (Житомирська ФФ ООО, Україна);
2. B-Prep-100 (ТОВ «Replicon» Варшава, Польща);
3. MBU (Розчин магнітних часток);
4. Lysis Buffer B, LBB (Буфер для лізису);
5. Wash Buffer 1B, WB1B (Буфер для промивання 1);
6. Wash Buffer 2B, WB2B (Буфер для промивання 2);
7. Elution Buffer B, EBB (Буфер для елюції).

Набір "Biosorp" для визначення поліморфізмів циклу фолієвої кислоти методом ПЛР у реальному часі (ТОВ «Biosorp» Київ, Україна):

Ампліфікаційна суміш	2 x 1000 мкл
Суміш праймерів	4 x 500 мкл
TE буфер	2 x 1000 мкл
Позитивний контроль (РС)	100 мкл

Набори "Mindray" для вимірювання рівнів онкомаркерів CA-125, HE-4, CA-72-4, CA-242 та CYFRA 21-1 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Шеньчжень, Китай), в які входили:

1. Калібратори, 1×1.2мл для калібратора C0, 1×1.0мл для кожного з калібраторів C1 та C2;
2. мультиконтролі (L), 3×2.0мл;
3. мультиконтролі (H), 3×2.0мл;
4. мультиконтролі (L), 6×2.0мл;
5. мультиконтролі (H), 6×2.0мл;
6. промивні буфери, 1×10л;
7. субстратні розчини, 4×115мл;
8. субстратні розчини, 4×75мл.

Набір "SIEMENS" для вимірювання рівня CA15-3 (Siemens Healthineers, Велика Британія):

1. Набір мікросфер BR-MA (L2BR12);
2. реагентний клин BR-MA (L2BRA2);
3. мічені лігандом анти-CA15-3 мишачі моноклональні антитіла у буфері на основі сироватки, з консервантом;
4. лужна фосфатаза у кон'югаті з мишачими моноклональними антитілами проти CA15-3 у буфері, з консервантом;
5. калібратори BR-MA (LBRL, LBRH);
6. мультирозчинник 1
7. мультирозчинник 2
8. хемілюмінесцентний субстрат;
9. промивка зонда;
10. набір для очищення зонда;
11. деіонізована вода;
12. контролю.

Набори "SIEMENS" для вимірювання концентрацій гомоцистеїну, фолату та вітаміну B12 та CRP (Siemens Healthineers, Велика Британія):

1. Упаковка кульок для тесту на гомоцистеїн (L2HO12)
2. Клини із реагентами для тесту на гомоцистеїн (L2HOA2)
3. Один клин, що містить 3 реагенти: 15,5 мл бичої S-аденозил-L-гомоцистеїн, гідролази в буфері, з консервантом, 18,5 мл дитіотреїтолу (ДТТ) у буфері. 11,5 мл лужної фосфатази (кишечник теляти), кон'югованої з мишачими моноклональними антитілами проти S-аденозингомоцистеїну (SAH) у буфері.
4. Калібратори гомоцистеїну (LHOL, LHOH)
5. Розчинник для зразків гомоцистеїну (L2HOZ)
6. Набір мікросфер з фолієвою кислотою (L2FO12)
7. Клин з реагентом «А» для фолієвої кислоти (L2FOA2)
Клини містять 15 мл дитіотреїтолу (ДТТ) у буфері, 18,1 мл фолієвої кислоти, міченої лігандом, у буфері та 15 мл NaOH/KCN (NH₄CN) у буфері, з консервантом.
8. Калібратори фолієвої кислоти (LFOL, LFOH)
9. Набір мікросфер з вітаміном B12 (L2VB12)
10. Калібратори вітаміну B12 (LVBL, LVBH)
11. Набір мікросфер CRP (L2CR12)
12. Клин з реагентом CRP (L2CRA2)
13. Калібратори CRP (LCRL, LCRH)
14. Хемілюмінесцентний субстрат
15. Засіб для промивання зонда
16. Набір для очищення зонда
17. деіонізована вода
18. контролю

2.3. Використані матеріали

- Пробірки 1,5 мл стерильні (Hangzhou Rollmed Co, Китай);
- стріпи з пробірками, 0,2 мл (AHN myTUBE, Китай);
- кришки для стріпів з пробірками 0,2 мл (AHN myTUBE, Китай);
- наконечники для автоматичного дозатора з аерозольним фільтром, вільні від ДНКаз та РНКаз 200 мкл (Hangzhou Rollmed Co, Китай);
- наконечники для автоматичного дозатора з аерозольним фільтром, вільні від ДНКаз та РНКаз 1000 мкл (Hangzhou Rollmed Co, Китай);
- наконечники для автоматичного дозатора без фільтра, вільні від ДНКаз та РНКаз 200 мкл (Hangzhou Rollmed Co, Китай);
- штативи для пробірок;
- холодильні штативи для мікропробірок;
- реакційна кювета;
- реакційні пробірки (одноразові);
- пробірок із розчинником для зразків (16 × 100 мм);
- ковпачків для пробірок із розчинником для зразків.

2.4. Використане обладнання

- Автоматичні дозатори об'ємом 100-1000 мл, 20-200 мл, 5-50 мл (Eppendorf, Німеччина);
- термостат Bio TDB-100 (Biosan, Латвія);
- центрифуга 5424 (Eppendorf, Німеччина);
- центрифуга CM-6M (ELMI, Латвія)
- центрифуга-змішувач FV-2400 (Biosan, Латвія);
- центрифуга-змішувач для мікропробірок MSC-300 (Biosan, Латвія);
- ампліфікатор для ПЛР в реальному часі BioRad CFX96 (BioRad, США);
- холодильник LCexv 4010 (Liebherr, Німеччина);

- морозильна камера LCexv 4010 (Liebherr, Німеччина);
- центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина);
- ламінарний бокс II класу захисту (Lamsystem, Росія);
- бокс для ПЛР типу БСП (Техноген, Україна).
- хемілюмінесцентний імуноферментний аналізатор Mindray CL – серії
- імунохемілюмінесцентний аналізатор IMMULITE 2000 (Siemens Healthineers, Велика Британія)

2.5. Методи роботи

2.5.1. Забір зразків

Зразок крові відбирали у маніпуляційній кімнаті за допомогою пробірок-вакутайнерів із напиленим антикоагулянтом для генотипування та із напиленим активатором згортання крові на дослідження рівнів онкомаркерів та біохімічних показників. Процедура здійснюється медичним персоналом відповідної кваліфікації. Пробірки із отриманими зразками перемішували та лишали на 15 хв відповідно до інструкції виробника вакутайнерів. Пробірку зі скеруванням на дослідження поміщали у холодильний контейнер та передавали до молекулярно-генетичної лабораторії.

2.5.2. Реєстрація та пробопідготовка зразків крові

Перед використанням біологічного матеріалу (БМ) ми провели ретельну перевірку, щоб забезпечити його відповідність усім вимогам, включаючи колір зразка, кількість та маркування. Невідповідність цим критеріям може

поставити під сумнів достовірність результатів, отриманих з матеріалу. Додатково, оглядали контейнер на наявність будь-яких ознак пошкодження.

Нарешті, зареєстрований матеріал зберігали в холодильнику при температурі +4 °С для збереження його цілісності до моменту виділення ДНК, натомість пробірки із активатором згортання крові центрифугували у центрифугі СМ-6М (ELMI, Латвія) 10 хв за 1500 g відповідно до інструкції виробника вакуутайнерів, після одразу проводилося дослідження рівнів досліджуваних онкомаркерів та біохімічних показників.

2.5.3. Підготовка приміщення до виділення нуклеїнових кислот

Всі робочі поверхні та обладнання оброблялося 70 % етиловим спиртом (Житомирська ФФ ООО, Україна). Після завершення обробки стерилізаційними розчинами усіх поверхонь та обладнання, проводилося опромінення ультрафіолетом боксу для роботи з нуклеїновими кислотами та всієї кімнати протягом 30 хв.

2.5.4. Екстракція нуклеїнових кислот

Для ручного методу роботи спочатку готували суміш лізуючого буфера Lysis Buffer В та магнітного сорбенту MBW. На один зразок вносили 450 мкл лізуючого буфера та 15 мкл розчину магнітних часток у мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл. Отриману суміш ретельно перемішували на вортексі, після чого в кожну пробірку вносили 100 мкл зразка. Для негативного контролю екстракції замість зразка додавали 100 мкл буфера для елюції. Вміст пробірок перемішували та інкубували при 65°С протягом 5 хв, періодично вортексуючи кожні 2 хв. Після інкубації пробірки знову перемішували на вортексі протягом 5 с.

Далі проводили центрифугування протягом 30 с за 10000 g у центрифугі MiniSpin (Eppendorf, Німеччина). Супернатант обережно видаляли, не торкаючись магнітного сорбенту. До пробірок додавали 450 мкл буфера для промивання 1 (Wash Buffer 1B), перемішували на вортексі 5 с, знову осаджували магнітні частинки протягом 30 с за 10000 g за допомогою центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Німеччина). Після цього надосадову рідину обережно видаляли. Процедуру повторювали із 450 мкл буфера для промивання 2 (Wash Buffer 2B), аналогічно перемішуючи, осаджуючи та видаляючи рідину.

Потім у кожену пробірку додавали 100 мкл буфера для елюції (Elution Buffer B), перемішували на вортексі 5 с і інкубували при 65°C протягом 5 хв, періодично вортексуючи кожні 2 хв. Після завершення інкубації пробірки ще раз перемішували на вортексі 5 с та осаджували центрифугуванням 30 секунд за 10000 g за допомогою центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Німеччина). Після цього обережно відбирали елюат та переносили його у нові пробірки. Отриманий елюат містить виділену ДНК, готову до подальших досліджень.

Очищені нуклеїнові кислоти можна зберігати 24 години при температурі +4°C...+8°C, 1 рік при -24°C...-18°C, або довготривало при -80°C.

2.5.5. Приготування ПЛР сумішей «Bioscorp»

Спершу розморожували усі компоненти набору, перемішували їх кількаразовим перевертанням пробірок та осаджували краплі за допомогою короткочасного центрифугування на центрифугі-змішувач FV-2400 (Biosan, Латвія). У пробірці об'ємом 1,5 мл готували майстер суміш із розрахунку 15 мкл майстер мікс на один зразок. Для уникнення похибки під час розрахунку кількості зразків, окрім досліджуваних і контрольних зразків, додавали ще один. Перемішували майстер суміші шляхом кількаразового перевертання пробірки, далі осаджували краплі короткочасним центрифугуванням та

вносили по 20 мкл у стріпи з пробірками 0,2 мл (AHN myTUBE, Китай) для проведення ПЛР. До кожної постановки ПЛР, окрім досліджуваних зразків, входили 3 контрольні зразки: негативний контрольний зразок ПЛР (НКЗ, NC), позитивний контрольний зразок (ПКЗ, PC), негативний контроль екстракції (НКЕ, NEC –100 мкл буфера для елюції з набору B-Prep, що пройшов процедуру виділення паралельно з дослідними зразками). До 15 мкл майстер мікса додавали 5 мкл виділеної ДНК та ставили на програму ампліфікації відповідно до інструкції виробника.

2.5.6. Налаштування порогової лінії ампліфікації

Використовувався автоматичний поріг, встановлений програмним забезпеченням. За необхідності можна вручну встановити порогове значення, для цього поле перед «Автоматичним пороговим значенням» має бути непозначеним, а потім вручну перетягнути лінію порогового значення, щоб трохи перевищити найвищу точку кривої випадкового шуму кожного каналу відносно негативного контролю від виробника. Поріг кожного каналу потрібно встановити окремо: спочатку обираємо канал, який потрібно встановити, а потім встановлюємо лінію порогу.

2.5.7. Контроль якості

Валідність результатів перевірялася аналізом негативного контролю, чий $C_t=0$ у каналах FAM, CY5, ROX і VIC/HEX, а позитивний контроль мав очевидні S-подібні криві ампліфікації в каналах FAM, CY5, ROX і VIC/HEX і $C_t \leq 35$. Окрім того, мають бути по 2 чіткі криві в усіх лунках (табл. 2.1) інакше результати вважаються недійсними.

Схема інтерпретації результатів ампліфікації

Суміш праймерів	Мутація	Канал FAM	Канал HEX
1	MTHFR 677 C>T	C	T
2	MTHFR 1298 A>C	A	C
3	MTR 2756 A>G	A	G
4	MTRR 66 A>G	A	G

2.5.8. Інтерпретація результатів ампліфікації

За наявності очевидних кривих ампліфікації в каналах FAM, VIC/HEX алель 1 відповідає за нормальний алель, а алель 2 – мутантний. Якщо різниця C_t між кривими однієї мутації становить більше 3 циклів, але не більше 5, тоді це свідчить про гетерозиготність за даним алелем. Якщо різниця між значеннями C_t менше за 3 цикли, однак спершу вийшла крива по FAM, тоді це свідчить про гомозиготність за нормальним алелем, а якщо спершу вийшла крива за HEX, тоді це означає гомозиготність за мутантним алелем.

2.5.9. Визначення онкомаркерів методом імунохемілюмінесцентного аналізу

Визначення концентрацій онкомаркерів СА-125, HE-4, СА-72-4, СА-242 та CYFRA 21-1 проводили методом двосайтового імунохемілюмінесцентного аналізу типу «сендвіч» відповідно до інструкцій виробника тест-системи.

Перед першим завантаженням наборів реагентів у аналізатор флакони обережно перевертали не менше 30 разів для ресуспендування парамагнітних мікрочастинок, які могли осісти під час транспортування або зберігання. Після цього візуально перевіряли однорідність реагенту.

Для проведення аналізу до реакційної кювети вносили досліджуваний зразок, парамагнітні мікрочастинки з іммобілізованими моноклональними антитілами до відповідного онкомаркера та антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою. Після інкубації утворювався імунний комплекс типу «сендвіч». Далі проводили магнітне відділення мікрочастинок із подальшим видаленням незв'язаних компонентів шляхом промивання. Після цього додавали субстратний буферний розчин для ініціації хемілюмінесцентної реакції.

Для кожного визначення використовували 10 мкл досліджуваного зразка та 500 мкл мертвого об'єму відповідно до інструкції виробника.

2.5.10. Калібрування та обчислення аналітичної концентрації

Стандартизація еталонної калібрувальної кривої онкомаркерів CA-125, HE-4, CA-72-4 та CYFRA 21-1 для конкретної партії реагентів була закодована у двовимірному штрих-кодi, нанесеному на упаковку реагенту. Перед проведенням аналізу штрих-код сканували для внесення даних калібрування до системи, після чого виконували калібрування з використанням трьох рівнів калібраторів для кожного з онкомаркерів.

Концентрацію онкомаркерів у зразках аналізатор Mindray (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Шеньчжень, Китай) розраховував автоматично за допомогою еталонної калібрувальної кривої з використанням чотиріпараметричної логістичної моделі (4PL). Інтенсивність сигналу реєстрували у відносних світлових одиницях (RLU), а результати вимірювань надавали у нг/мл.

2.5.11. Визначення концентрації CA15-3

Визначення концентрації CA15-3, PEA та АФП у сироватці крові

проводили на автоматичному аналізаторі IMMULITE 2000 (Siemens Healthineers, Велика Британія) методом двостадійного послідовного хемілюмінесцентного імунометричного аналізу. Метод базується на специфічній взаємодії антигену CA15-3 із моноклональними антитілами з подальшою реєстрацією інтенсивності хемілюмінесцентного сигналу.

Під час аналізу зразок сироватки інкубували з полістироловою частинкою, на поверхні якої іммобілізовані антитіла до CA15-3. У результаті відбувається зв'язування антигену з антитілами твердої фази. Далі до реакційної системи додається друге антитіло до CA15-3, кон'юговане з лужною фосфатазою, яке формує імунний комплекс типу «антиген–антитіло».

Після завершення інкубації незв'язані компоненти видаляються шляхом промивання. Додавання хемілюмінесцентного субстрату призводить до ферментативної реакції за участю лужної фосфатази, внаслідок чого виникає світловий сигнал. Інтенсивність випромінювання пропорційна концентрації CA15-3 у досліджуваному зразку та визначається автоматичною системою детекції аналізатора.

Загальна тривалість аналізу включає два інкубаційні цикли по 30 хвилин. Для проведення дослідження використовують приблизно 5 мкл сироватки крові.

2.5.12. Визначення концентрації гомоцистеїну, фолату та вітаміну B12

Концентрації гомоцистеїну, фолату, вітаміну B12 визначали методом конкурентного хемілюмінесцентного імуноаналізу на аналізаторі IMMULITE 2000 (Siemens Healthineers, Велика Британія) відповідно до інструкцій виробника. Концентрацію досліджуваних речовин визначали за калібрувальною кривою відповідно до стандартів відвиробника для кожної партії реактивів.

Попередня обробка зразків відрізнялася залежно від аналіту. Для

визначення фолату та вітаміну В12 проводили лужну денатурацію ендogenous білків-переносників із використанням дитіотрейтолу (DTT) та розчину NaOH/KCN, що забезпечувало вивільнення цих сполук.

При визначенні гомоцистеїну застосовували ферментативну обробку із використанням S-аденозил-L-гомоцистеїн-гідролази та DTT, у результаті чого гомоцистеїн перетворювався на S-аденозилгомоцистеїн (SAH), який надалі визначався в імуноаналізі.

2.5.13. Визначення концентрації С-реактивного білка

Визначення концентрації С-реактивного білка (CRP) проводили за допомогою автоматичного імунохемілюмінесцентного аналізатора IMMULITE 2000 (Siemens Healthineers, Велика Британія). Метод ґрунтується на твердофазному імунометричному аналізі з використанням хемілюмінесцентної детекції.

Для проведення дослідження використовували зразки сироватки або плазми крові пацієнтів. Необхідний об'єм зразка становив 5 мкл. Перед початком аналізу проводили підготовку реагентів та завантаження їх у відповідні позиції аналізатора згідно з інструкцією виробника.

У ході аналізу зразок інкубувався разом із реакційними компонентами у реакційній кюветі, що містила тверду фазу з іммобілізованими антитілами до CRP. У процесі інкубації молекули С-реактивного білка зі зразка зв'язувалися зі специфічними антитілами, формуючи імунний комплекс.

Після інкубації проводили автоматичне промивання для видалення незв'язаних компонентів. Далі до реакційної суміші додавали хемілюмінесцентний субстрат, який вступає у реакцію з ферментною міткою імунного комплексу. Інтенсивність утвореного світлового сигналу реєструвалася фотоелектронним детектором аналізатора.

Отриманий сигнал був пропорційний концентрації CRP у зразку.

Кількісне визначення проводили шляхом порівняння отриманих значень із калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартних розчинів.

2.5.14. Статистична обробка даних

Для дослідження було обрано пацієнтів, котрі не палять цигарки та без супутніх інфекційних захворювань. Було обрано 48 чоловіків віком від 25 до 44 років та 49 чоловіків 45-70 років, а також 50 та 52 жінки відповідних вікових проміжків. Опрацювання отриманих даних проводилося методом дисперсійного аналізу у програмі Microsoft Office Excel 2007, котрий включав наведені нижче формули для розрахунків.

1. Знаходження середнього значення в кожній групі за формулою:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (2.1)$$

2. Розрахунок загального середнього значення для досліджуваних груп.

$$\bar{x}_{grand} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{n} \quad (2.2)$$

3. Подальший розрахунок міжгрупової та внутрішньогрупової варіацій за формулою:

$$SS_{between} = \sum n_i (\bar{x} - \bar{x}_{grand})^2 \quad (2.3)$$

4. Далі проводився розрахунок ступенів свободи міжгрупової варіації за формулою:

$$df_{between} = k - 1 \quad (2.4)$$

де k – кількість досліджуваних груп.

5. Водночас ступінь свободи внутрішньогрупової варіації розраховувався за формулою:

$$df_{within} = N - k \quad (2.5)$$

де N – кількість всіх значень групи.

6. Надалі проводився розрахунок середніх квадратичних відхилень за формулою (2.6) між групами:

$$MS_{between} = \frac{SS_{between}}{df_{between}} \quad (2.6)$$

Всередині груп за формулою (2.7):

$$MS_{within} = \frac{SS_{within}}{df_{within}} \quad (2.7)$$

7. В подальшому проводився обрахунок різниці між групами та випадкових розкидів всередині груп за формулою:

$$F = \frac{MS_{between}}{MS_{within}} \quad (2.8)$$

де $MS_{between}$ – різниця між групами;

MS_{within} – випадковий розкид в групах.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У цій роботі ми визначали рівні гомоцистеїну, фолату та вітаміну В12 та панелі онкомаркерів з подальшим співвідношенням відповідно до рівня системного запалення, маркером якого виступає С-реактивний білок, та у різних генотипах поліморфізмів генів циклу фолієвої кислоти. Досліджувані генотипи представлені у табл. 3.1. Одиниці вимірів представлені у МО/мл для СА-125, СА-72-4, СА-242, СА-19-9, СА-15-3, АФП. У нг/мл представлені значення фолату, CYFRA 21-1 та СЕА. НЕ-4 представлений у пмоль/л, CRP у мг/дл, а гомоцистеїн у мкмоль/л. Вітамін В12 представлений у пг/мл.

Таблиця 3.1

Досліджувані генотипи поліморфізмів циклу фолієвої кислоти

Номер	677 (MTHFR)	1298 (MTHFR)	2756 (MTR)	66(MTRR)
1	C/T	AA	AG	GG
2	C/T	AA	AA	GG
3	T/T	AA	AA	AG
4	C/T	AC	AA	GG
5	C/C	AC	AA	AA
6	C/C	AC	AA	GG
7	C/C	AA	AA	AG
8	C/C	CC	AA	GG
9	C/C	AA	AA	AA
10	C/T	AA	AA	AA
11	C/C	AA	AG	AA
12	C/C	CC	AA	AA

Під час побудови діаграми (рис. 3.1.) було згруповано результати метаболічних показників та панелі досліджуваних онкомаркерів жінок 25-44 років на три групи відповідно рівнів CRP.

3.1. Кореляції між досліджуваними показниками у жінок 25-44 років

На діаграмі (рис.3.1.) першочергово привертає увагу характерна зміна показників метаболізму одноуглецевих сполук. Так, рівень концентрації гомоцистеїну становив 11,39 у групі до 0,1, знижувався до 9,46 у групі 0,1–0,499 та підвищувався до 13,11 при значеннях понад 0,5. Натомість концентрація фолату демонструвала протилежну тенденцію: 9,19 у першій групі, максимальне значення 14,32 у середній групі та різке зниження до 2,98 у третій групі. Така динаміка може свідчити про наявність оберненого взаємозв'язку між рівнями концентрацій фолату та гомоцистеїну, що узгоджується з відомими біохімічними механізмами функціонування фолатного циклу, де дефіцит фолатів може призводити до накопичення гомоцистеїну.

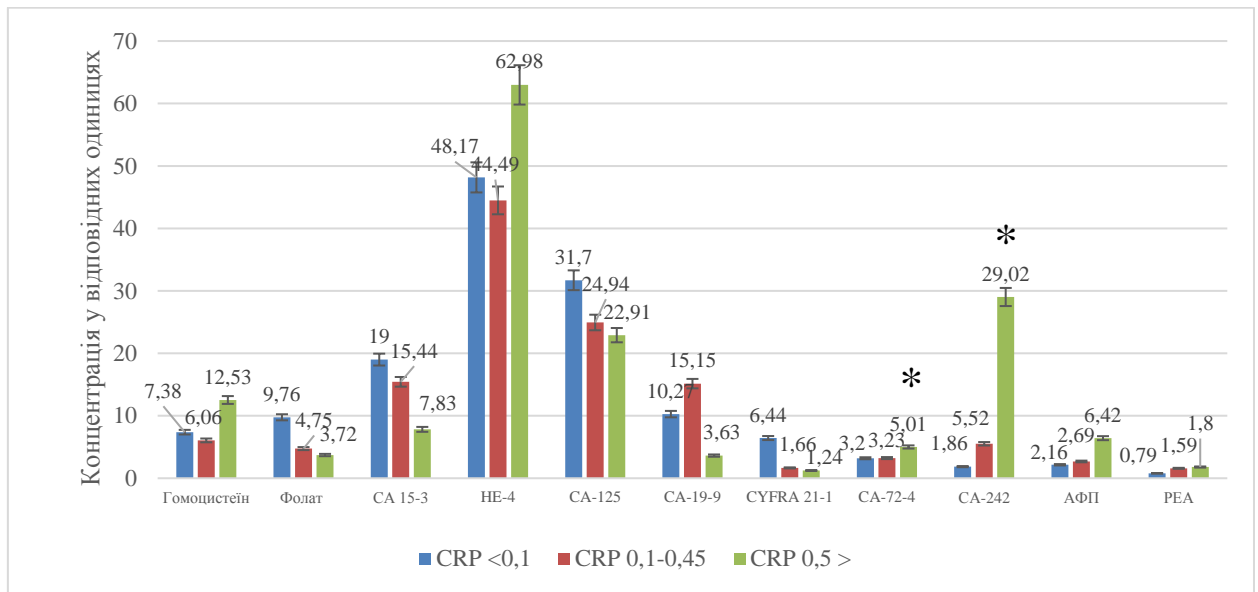


Рис. 3.1. Порівняння рівнів концентрацій головних метаболітів циклу фолієвої кислоти та досліджуваних онкомаркерів за трьома групами діапазонів рівня С-реактивного білка (CRP) пацієнток віком від 25 до 44 років. Перша група із CRP позначена синім кольором; друга група –помаранчевим кольором; третя група CRP понад 0,5, позначена сірим кольором (n = 50)

* - p < 0,05

Серед досліджуваних онкомаркерів HE-4, рівень концентрації якого залишався відносно стабільним, що може свідчити про слабку залежність цього показника від рівня запалення. Натомість маркери CA-125, CA-15-3 та CA-19-9 демонстрували подібну динаміку змін із максимальними значеннями у групі CRP 0,1-499, що може вказувати на можливу спільну регуляцію або вплив однакових метаболічних факторів на їх концентрацію.

Показники рівнів концентрацій інших маркерів характеризувалися менш вираженими коливаннями. Зокрема, CYFRA 21-1, AFP та CEA залишалися відносно стабільними у всіх групах, тоді як CA-72-4 демонстрував тенденцію до підвищення при найвищих значеннях CRP. Водночас CA-242 мав протилежну динаміку порівняно з основною групою онкомаркерів, що може свідчити про інші механізми його регуляції.

Особливу увагу привертає взаємозв'язок між показниками фолатного циклу та рівнями деяких онкомаркерів. У групі з найвищим рівнем фолату одночасно спостерігалися максимальні значення CA-125, CA-15-3 та CA-19-9. Натомість при різкому зниженні фолату відзначалося підвищення гомоцистеїну та зменшення рівнів цих маркерів. Така тенденція може свідчити про можливий зв'язок між станом фолатного обміну та експресією окремих пухлинних антигенів.

На діаграмі (рис. 3.2.) найбільш виражені коливання рівнів концентрацій спостерігалися для CA-242 та CA-72-4, тоді як CRP, CYFRA 21-1, AFP та CEA характеризувалися відносно стабільними значеннями.

Рівень концентрації CRP залишався низьким у більшості генотипів, що може свідчити про відсутність суттєвої залежності системного запального статусу від досліджуваних генетичних варіантів. Подібну відносну стабільність демонстрували також CYFRA 21-1, AFP та CEA, що може вказувати на слабкий вплив генотипу на концентрацію цих маркерів у досліджуваній вибірці. Натомість для маркерів CA-72-4 та особливо CA-242 спостерігалася значно більша варіабельність. Найвищі значення цих показників частіше відзначалися у генотипів 5, 7 та 10, що може свідчити про

можливий вплив генетичних факторів на рівень експресії муциноподібних пухлинних антигенів. Водночас генотипи 2 та 4 характеризувалися відносно низькими концентраціями більшості досліджуваних маркерів. Крім того, простежувалася тенденція до одночасного підвищення СА-242, СА-72-4 та АФП у деяких генотипах, що може вказувати на часткову кореляцію між цими показниками.

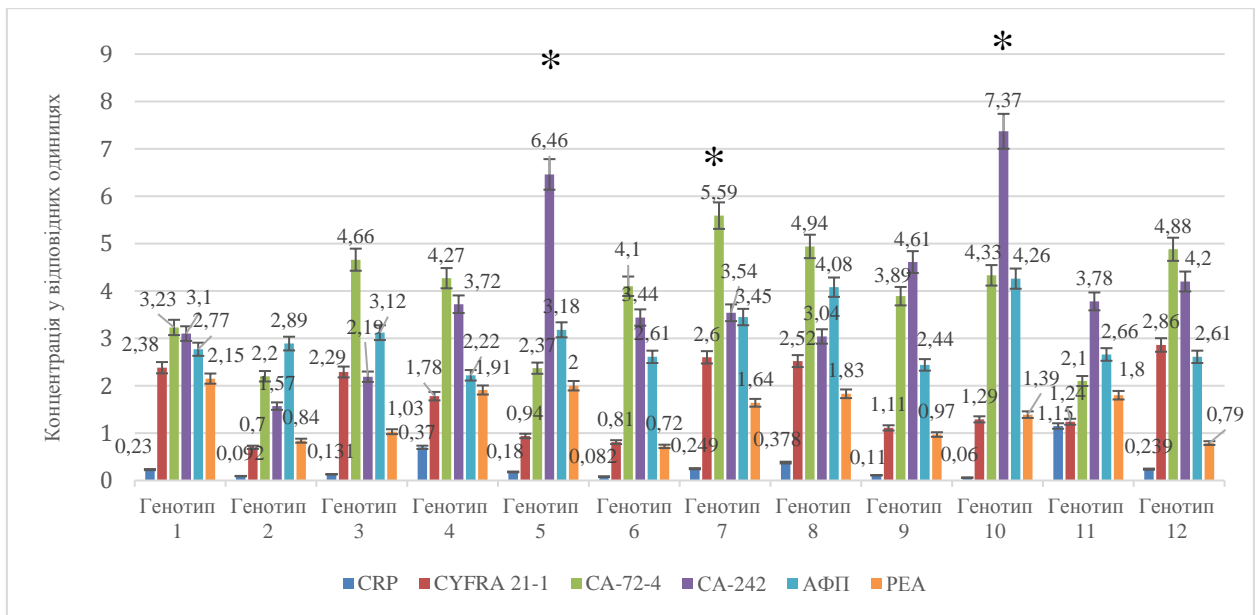


Рис. 3.2. Порівняння концентрацій CRP та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу. CRP позначений блакитним кольором; CYFRA 21-1 – помаранчевим кольором; CA-72-4 – сірим кольором, CA-242 – жовтим кольором, АФП – синім кольором, РЕА – зеленим кольором (n = 50)

* - $p < 0,05$

Таким чином, отримані результати свідчать про можливу наявність генотип-залежних відмінностей у рівнях окремих пухлинних маркерів, причому найбільша варіабельність характерна для СА-242 та СА-72-4, тоді як інші показники залишаються відносно стабільними.

Діаграма (рис. 3.3.) відображає найбільші коливання серед досліджуваних показників спостерігалися для маркерів HE-4, СА-125 та СА 15-3, тоді як

показники гомоцистеїну та фолату характеризувалися більш помірною варіабельністю.

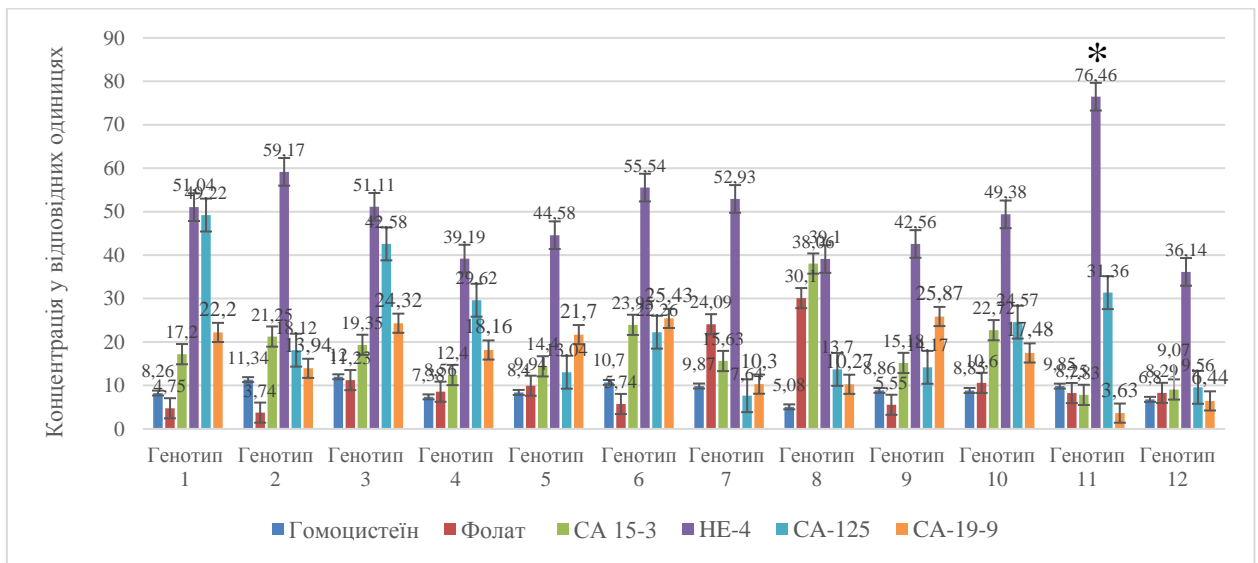


Рис. 3.3. Порівняння концентрацій гомоцистеїну, фолату та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу у жінок 25-44 років. Гомоцистеїн позначений блакитним кольором; фолат – помаранчевим кольором; СА 15-3 – сірим кольором, HE-4 – жовтим кольором, СА-125 – синім кольором, СА-19-9 – зеленим кольором (n = 50)

* - $p < 0,05$

Найбільші коливання концентрацій серед досліджуваних показників спостерігалися для маркерів HE-4, СА-125 та СА 15-3, тоді як показники гомоцистеїну та фолату характеризувалися більш помірною варіабельністю.

Рівень концентрації гомоцистеїну у різних генотипах змінювався в межах від 4,75 до 11,23. Найвищі значення концентрацій цього показника спостерігалися у носіїв генотипу 3 (11,23), тоді як мінімальні значення були характерні для генотипу 2 (3,74) та генотипу 8 (5,08).

Концентрація фолату демонструвала досить значні коливання між генотипами. Найвищий рівень концентрації спостерігався у генотипу 8 (30,1), тоді як мінімальні значення були характерні для генотипу 2 (3,74) та генотипу

6 (5,74). У генотипі 8, де рівень концентрації фолату є максимальним, спостерігається відносно низький рівень концентрації гомоцистеїну, що відповідає відомим біохімічним механізмам фолатного циклу, у яких достатня кількість фолатів сприяє ефективному реметилуванню гомоцистеїну.

Серед пухлинних маркерів найбільш високі значення у більшості генотипів демонстрував HE-4. Його концентрація змінювалася у широкому діапазоні — від 36,14 до 76,46. Максимальний рівень було зафіксовано у генотипу 11 (76,46), тоді як найнижчі значення відзначалися у генотипу 12 (36,14) та генотипу 4 (39,19). Маркер СА-125 також демонстрував виражені коливання між генотипами. Найвищі значення були характерні для генотипу 1 (49,22) та генотипу 3 (42,58), тоді як мінімальні значення спостерігалися у генотипу 7 (7,64).

Рівні концентрацій СА 15-3 демонстрували значну варіабельність, коливаючись приблизно від 17,2 до 30,1. Найвищі значення спостерігалися у генотипу 8, тоді як нижчі показники концентрацій були характерні для генотипів 1 та 12. Це може свідчити про певний вплив генотипу на рівень цього маркера, хоча його коливання менш виражені порівняно з HE-4 або СА-125.

Маркер СА 19-9 демонстрував значні коливання між генотипами. Найвищі значення були характерні для генотипу 9 (25,87) та генотипу 6 (25,43), тоді як мінімальні значення спостерігалися у генотипу 11 (3,63).

У деяких генотипах спостерігається одночасне підвищення рівнів концентрацій СА-125 та HE-4, що може свідчити про часткову кореляцію між цими маркерами, які часто використовуються у комплексній діагностиці пухлин гінекологічної локалізації. Натомість метаболіти фолатного циклу (гомоцистеїн і фолат) демонструють іншу динаміку змін, що підкреслює відмінності між метаболічними та пухлинними біомаркерами.

Таким чином, отримані результати свідчать, що найбільш значні коливання характерні для HE-4, СА 15-3 та СА-125, тоді як показники гомоцистеїну і фолату демонструють більш помірні зміни.

Представлена діаграма (рис. 3.4.) демонструє розподіл рівнів вітаміну В12 у двох вікових групах пацієток (25–44 та 45–70 років) залежно від трьох градацій рівня С-реактивного білка (CRP): $<0,1$; $0,1-0,499$; $\geq 0,5$.

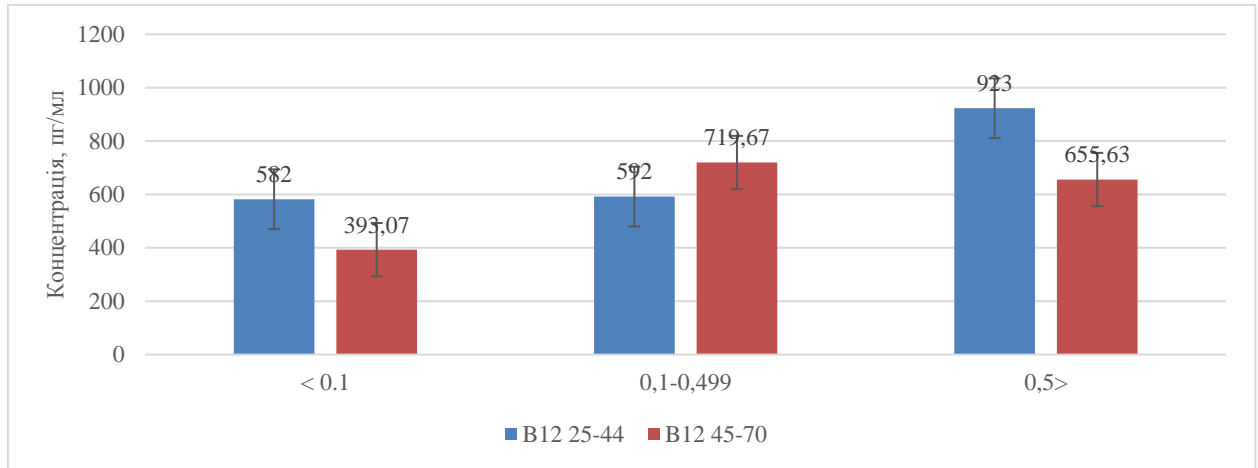


Рис. 3.4. Порівняння середніх значень концентрацій вітаміну В12 у жінок 25-44 та 45-70 років за концентрації CRP менше 0,1; 0,1-0,499 та більше 0,5. Молоді жінки позначені синім кольором, а жінки старшого віку – помаранчевим ($M1 \pm 141$, $M2 \pm 208$, $M3 \pm 122$, $n = 102$)

* - $p = 0,17$

У молодшій віковій групі (25–44 роки) спостерігається чітка тенденція до підвищення рівня концентрації вітаміну В12 зі зростанням CRP. Так, при низькому рівні концентрації CRP ($<0,1$) середнє значення В12 становить 582, тоді як у групі з помірним рівнем концентрації CRP ($0,1-0,499$) воно незначно зростає до 592. Найбільш виражене підвищення концентрації відбувається у групі з високою концентрацією CRP ($\geq 0,5$), де рівень В12 досягає 923. Це може свідчити про позитивну кореляцію між системним запаленням та концентрацією вітаміну В12 у молодших жінок. Подібна закономірність потенційно пояснюється активацією білків гострої фази, змінами метаболізму або вивільненням В12 із депо в умовах запального процесу.

Натомість у старшій віковій групі (45–70 років) спостерігається інша, більш варіабельна картина. При низькому рівні CRP ($<0,1$) значення В12 є значно нижчим (393,07), ніж у молодшій групі, що може вказувати на вікове зниження засвоєння або запасів вітаміну. У групі з помірним рівнем концентрації CRP (0,1–0,499) відзначається різке підвищення рівня В12 до 719,67, що навіть перевищує показники молодшої групи на цьому ж рівні концентрації CRP. Однак при високому рівні концентрації CRP ($\geq 0,5$) відбувається зниження до 655,63, хоча цей показник залишається вищим вдвічі, ніж за низької концентрації CRP.

Порівняльний аналіз між віковими групами показує, що при низькому CRP рівень В12 суттєво вищий у молодших жінок, що відповідає фізіологічним очікуванням. Проте при середньому рівні CRP старша група демонструє навіть вищі значення, ніж молодша, що може вказувати на вікові особливості реакції на запалення.

Загалом можна зробити висновок, що зв'язок між рівнем концентрації CRP та концентрацією вітаміну В12 має віковозалежний характер. У молодшій групі цей зв'язок є прямим і прогресивним, тоді як у старшій — більш складним, із піковими значеннями при помірному рівні запалення. Це підкреслює необхідність урахування віку при інтерпретації рівнів концентрацій вітаміну В12 у контексті запальних процесів та може мати клінічне значення для діагностики і корекції дефіцитних станів.

3.2. Кореляції між досліджуваними показниками у жінок 45 -70 років

Діаграма на рис.3.5 відображає розподіл біохімічних та онкомаркерних показників у жінок віком 45–70 років у трьох групах рівня концентрації CRP до 0,1; 0,1–0,499 та понад 0,5. Загалом у цій віковій групі спостерігається доволі чітка диференціація маркерів за характером їхніх взаємозв'язків, що

дозволяє виділити кілька функціональних блоків показників та оцінити їхню роль у метаболічних і патологічних процесах.

Найбільш виражені кореляційні зв'язки характерні для маркерів, пов'язаних з онкопатологією репродуктивної системи, насамперед для HE-4, СА 15-3 та СА-125. Маркер HE-4, для якого спостерігаються приблизно однакові посередні значення у всіх трьох діапазонах концентрацій CRP. Така відносно рівномірна представленість у всіх категоріях кореляцій може свідчити про те, що HE-4 є одним із найбільш стабільних показників, чий рівень не залежить від рівня системного запалення. Відомо, що HE-4 є важливим маркером епітеліального раку яєчників, тому висока частка сильних кореляцій у цій віковій групі може бути пов'язана з віковими змінами гормонального статусу та метаболізму.

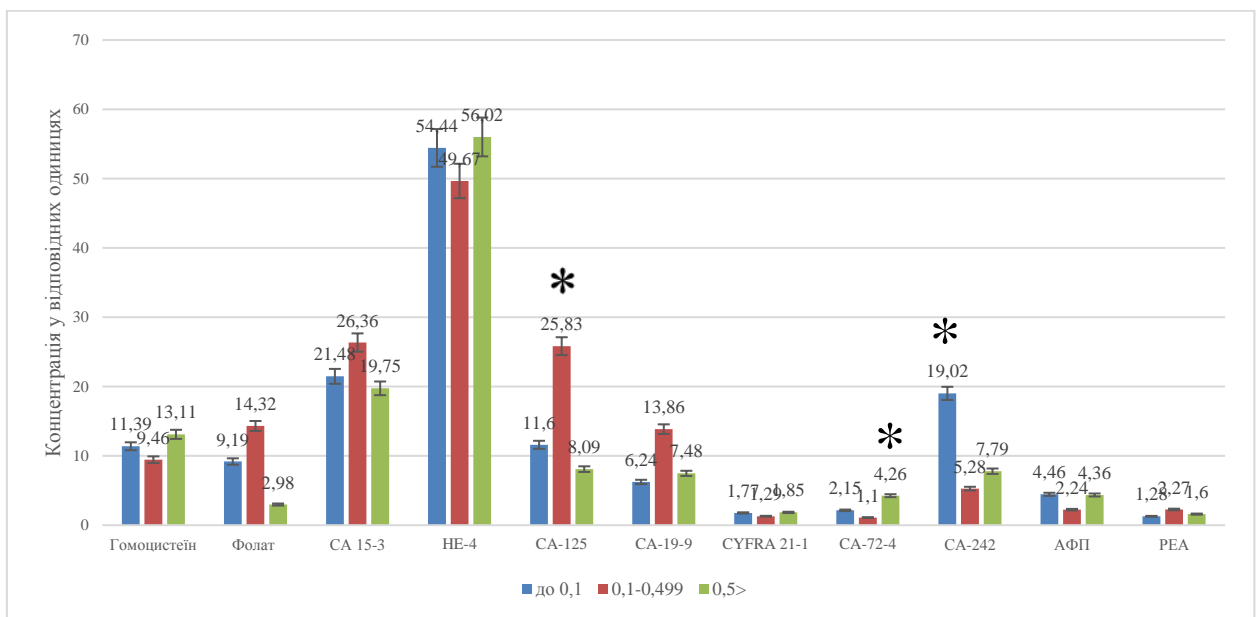


Рис. 3.5. Порівняння концентрацій головних метаболітів циклу фолієвої кислоти та досліджуваних онкомаркерів за трьома групами діапазонів рівня CRP пацієток віком від 45 до 70 років. Перша група із CRP до 0,1, позначена синім кольором; друга група – CRP 0,1–0,499, позначена помаранчевим кольором; третя група CRP понад 0,5, позначена сірим кольором (n = 52)

* - $p < 0,05$

Подібна, хоча й трохи менш виражена картина спостерігається для СА 15-3. Такий розподіл може свідчити про те, що даний маркер частіше бере участь у помірних функціональних взаємозв'язках, які можуть бути пов'язані з метаболічними або гормональними процесами. Оскільки СА 15-3 традиційно асоціюється з патологією молочної залози, його активні кореляційні зв'язки у жінок старшої вікової групи можуть відображати вікові зміни тканинної проліферації та гормонального регулювання.

Маркер СА-125 демонструє іншу тенденцію, у групі середніх значень концентрацій CRP його значення є максимальним (25,83), тоді як при низькому значенні CRP становить 11,6, а при навпаки високих значеннях CRP становить 8,09. Це може свідчити про те, що СА-125 частіше включається у помірні міжпоказникові взаємозв'язки, але рідше формує дуже сильні асоціації. Така особливість може пояснюватися тим, що рівень СА-125 залежить від багатьох фізіологічних факторів (запалення, гормональні зміни, стан ендометрію), що знижує специфічність його кореляцій.

Аналогічну картину демонструє й СА-19-9, у групах низького та високого значень концентрацій CRP значення СА-19-9 становить 6,24 та 7,48, відповідно, проте у групі середніх значень CRP вдвічі вищий середній показник, котрий становить 13,86.

Метаболічні показники гомоцистеїну та фолату формують окремий блок. Для гомоцистеїну значення становлять 11,39, 9,46 та 13,11, відповідно для слабких, середніх та високих значень концентрацій CRP. Це може свідчити про досить рівномірну участь цього метаболіту у різних типах біохімічних взаємозв'язків. Водночас фолат демонструє іншу тенденцію: 9,19 при слабких кореляціях, 14,32 при середніх і лише 2,98 при сильних. Така картина може відображати класичну біохімічну залежність між фолатним циклом та іншими метаболічними процесами, де фолат частіше виступає як регуляторний фактор, що формує помірні кореляційні зв'язки.

Значення концентрацій CYFRA 21-1 залишаються низькими у всіх діапазонах концентрацій CRP (1,77–2,29), що може свідчити про відносно

слабку інтеграцію цього показника у загальну систему біохімічних взаємозв'язків. Для СА-72-4 навпаки спостерігається поступове збільшення значень від 2,15 за низьких концентрацій CRP до 4,26 при високих значеннях, що може вказувати на тенденцію до формування більш тісних асоціацій із запальними процесами.

Окремо варто відзначити СА-242, який демонструє дуже виражену асиметрію: 19,02 за низької концентрації CRP, водночас за середніх та високих значень CRP 5,28 та 7,79, відповідно, що є кратною різницею, тобто за нижчого рівня запалення експресія цього онкомаркера знижується.

Альфа-фетопротейн має відносно невеликі значення у всіх групах (4,46; 2,24; 4,36, відповідно), що відповідає його ролі як менш специфічного показника у досліджуваній віковій групі. Подібну картину демонструє і РЕА, значення якого коливаються у межах 1,28–2,27, що свідчить про слабку залежність від ступеня запалення.

Загалом отримані результати свідчать про те, що у жінок віком 45–70 років формується кілька відносно незалежних функціональних груп показників. Перша група представлена маркерами СА 15-3, СА-125, СА-19-9 та СА-72-4 які демонструють найбільш виражені кореляційні зв'язки та можуть відображати процеси, пов'язані із системним запаленням. Друга група представлена маркерами HE-4 та CYFRA 21-1, які демонструють стабільні рівні експресії у всіх трьох групах ступеня запалення.

Діаграма на рис. 3.6. відображає розподіл рівнів концентрацій CRP та онкомаркерів CYFRA 21-1, СА-72-4, СА-242, АФП та РЕА у різних генотипових групах. Аналіз середніх значень демонструє, що більшість показників характеризуються нерівномірним розподілом між генотипами, що може свідчити про можливий вплив генетичних особливостей на метаболічні та пухлинно-асоційовані маркери.

Найбільш виражені коливання на діаграмі (рис. 3.6.) демонструє маркер СА-242. У більшості генотипів його рівень перебуває в межах приблизно 1–5 одиниць, однак для окремих генотипових груп спостерігаються різкі пікові

значення. Так, у генотипі 4 значення концентрації СА-242 сягає 11,59, а у генотипі 10 спостерігається максимальний показник 14,56, що суттєво перевищує рівні інших генотипів.

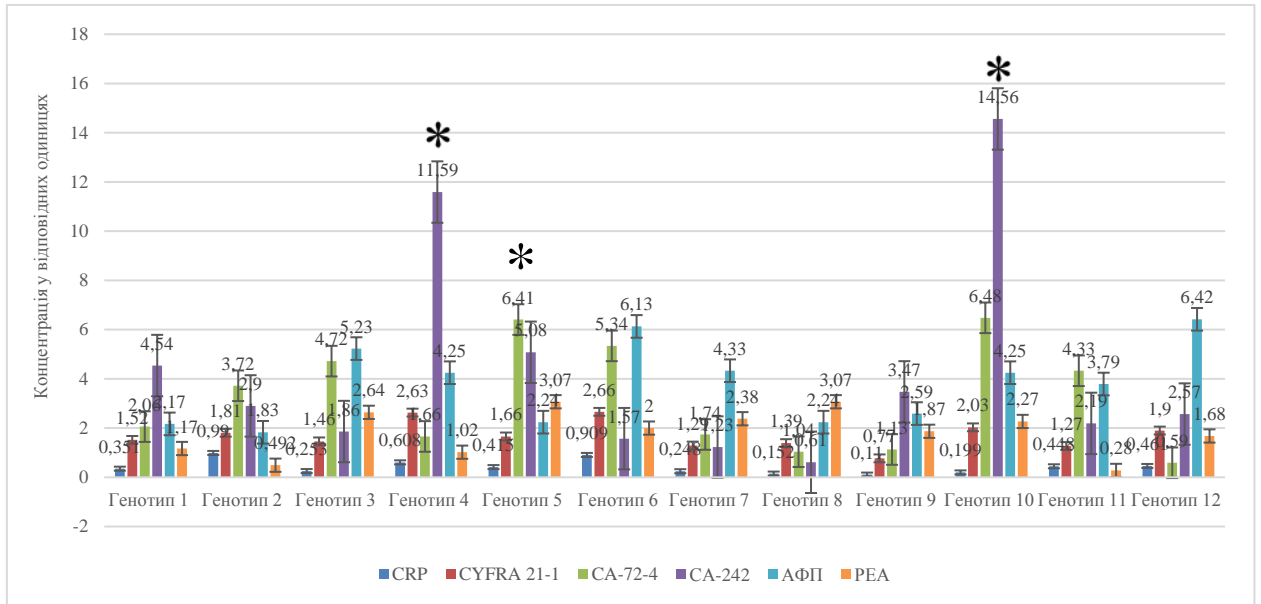


Рис. 3.6. Порівняння рівнів концентрацій CRP та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу у жінок 45-79 років. CRP позначений блакитним кольором; CYFRA 21-1 – помаранчевим кольором; CA-72-4 – сірим кольором, CA-242 – жовтим кольором, АФП – синім кольором, РЕА – зеленим кольором (n = 52)

* - $p < 0,05$

Маркер АФП демонструє відносно стабільну, але помітну варіабельність концентрацій між генотипами. Найнижчі значення спостерігаються у перших генотипових групах (2–3 одиниць), тоді як у генотипах 7 та 10 рівень підвищується до 4,25-4,33. Максимальне значення 6,42 відзначається у генотипі 12 та 6,13 у генотипі 6. Такий розподіл може свідчити про певну схильність окремих генотипів до підвищеної експресії даного білка, що іноді пов'язують із змінами регуляції клітинного росту або регенерації тканин.

Маркер СА-72-4 демонструє помірну варіабельність концентрацій. У більшості генотипів його значення коливаються у межах 3–6 одиниць, при цьому найбільш високі рівні відзначаються у генотипах 5 та 10 (6,41 та 6,48, відповідно). Подібний розподіл може свідчити про наявність слабких або середніх асоціацій між генотипом та експресією цього глікопротеїну.

Показник CYFRA 21-1 демонструє порівняно невеликі значення концентрацій у більшості генотипів (1–3 одиниці). Це може свідчити про відсутність зв'язку між його експресією та генотипом поліморфізмів циклу фолієвої кислоти.

Показники рівнів концентрацій CRP демонструє кратно вищі значення серед досліджуваних показників в порівнянні із молодшою групою жінок. У більшості генотипів його рівень є підвищеним, проте у межах допустимої норми, однак у генотипах 2, 4 та 6 значення виходять за допустимі медичні норми, що може свідчити про підвищену схильність до системного запалення у цих групах генотипів із віком.

Маркер PEA характеризується відносно стабільними значеннями, які переважно знаходяться у межах 1–3 одиниць. Найвищі показники спостерігаються у генотипах 6 та 7, де вони досягають 2–2,5, тоді як у генотипі 11 значення є мінімальним. Подібний розподіл може свідчити про відсутність значної генотипової залежності для цього показника.

Узагальнюючи отримані результати, можна зазначити, що серед усіх досліджуваних маркерів найбільшу варіабельність демонструє СА-242, який формує чіткі пікові значення у кількох генотипах. Помірну генотипову залежність проявляють СА-72-4 та АФП, тоді як CRP, CYFRA 21-1 та PEA характеризуються більш стабільним розподілом між групами. Така структура може свідчити про те, що досліджувані генетичні варіанти здатні впливати на рівень окремих онкомаркерів, формуючи специфічні біохімічні профілі для різних генотипових груп.

Діаграма на рис. 3.7 відображає розподіл рівні концентрацій метаболічних показників як гомоцистеїн та фолат, а також онкомаркерів СА 15-3, НЕ-4, СА-125 та СА-19-9 серед різних генотипових груп.

Найбільш виражену варіабельність демонструє НЕ-4, який є одним із ключових маркерів епітеліального раку яєчників. У більшості генотипів його значення коливаються в межах 47–65 одиниць, проте для генотипу 4 спостерігається значне підвищення — 88,92, що є максимальним показником на графіку. Також відносно високі значення фіксуються у генотипах 1 (62,35), 3 (59,9), 6 (56,57) та 9 (65,25). Така нерівномірність може свідчити про генотип-специфічні особливості регуляції експресії або секретії цього білка. Порівняно нижчі значення спостерігаються у генотипів 5, 7 та 10, де рівень НЕ-4 знижується приблизно до 41–52 одиниць.

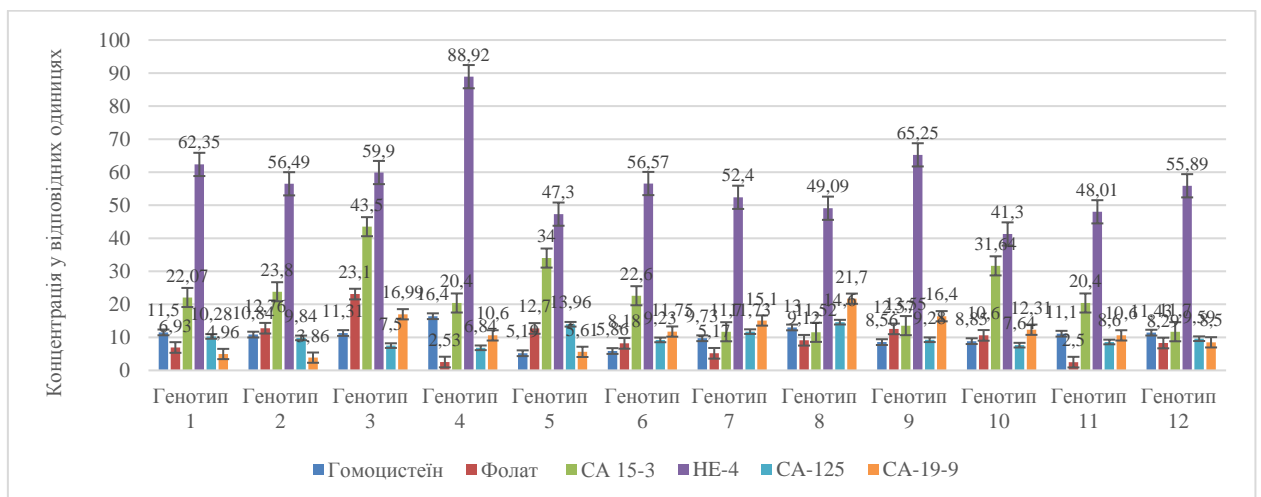


Рис. 3.7. Порівняння рівнів концентрацій гомоцистеїну, фолату та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу у жінок 45-70 років. Гомоцистеїн позначений блакитним кольором; фолат – помаранчевим кольором; СА 15-3 – сірим кольором, НЕ-4 – жовтим кольором, СА-125 – синім кольором, СА-19-9 – зеленим кольором (n = 52)

Маркер СА 15-3 аналогічно демонструє помітну варіабельність. У більшості генотипів його значення перебувають у межах до 23,8 одиниць, що

відповідає типовим концентраціям для цього показника. Однак найвищі значення спостерігаються у генотипах 3 (43,5), 5(34) та 10 (31,64), котрі є перевищенням норми для генотипу 3, та межовими значеннями для генотипів 5 та 10, тоді як у решті генотипів рівень залишається відносно стабільним.

Для СА-125 характерна відносно стабільна динаміка. У більшості генотипів його значення коливаються приблизно від 5 до 15 одиниць, що свідчить про відсутність різких генотипових відмінностей. Дещо підвищені показники спостерігаються у генотипів 7 та 8, де значення наближаються до 12–14 одиниць, що може відображати індивідуальні особливості регуляції синтезу цього глікопротеїну.

Маркер СА-19-9 демонструє помірну варіабельність між генотипами. У більшості випадків його рівень становить 5–12 одиниць, однак у генотипі 7 спостерігається відносно підвищення (15 одиниць).

Рівень концентрації гомоцистеїну коливається у межах 5–12 одиниць, причому найбільш високі значення спостерігаються у генотипів 2, 4 та 8. У свою чергу, фолат схожі коливання, здебільшого у межах 5–12 одиниць, хоча для окремих генотипів відзначається підвищення до 20–21 одиниці (наприклад, у генотипі 4).

Загалом результати свідчать про те, що серед досліджуваних показників найбільш чутливим до генотипових відмінностей є HE-4, який демонструє найвищу амплітуду змін між групами. Помірну варіабельність проявляють СА 15-3 та СА-19-9, тоді як СА-125 характеризується більш стабільним розподілом.

Діаграма на рис. 3.8. відображає варіацію рівнів вітаміну В12 у двох вікових групах пацієток 25–44 та 45–70 років у 12 виділених генотипах. Отримані дані свідчать про суттєву гетерогенність показників В12 як між генотипами, так і між віковими групами, що вказує на можливий вплив генетичних факторів у поєднанні з віковими особливостями метаболізму.

У групі 25–44 років спостерігається значна варіабельність рівнів В12 із мінімальними значеннями у генотипах 2 (241,19) та 3 (335) і максимальним

піком у генотипі 7 (973). Високі значення також характерні для генотипів 1 (771,75) та 8 (788). Інші генотипи демонструють відносно помірні рівні (переважно в межах 350–550), що може свідчити про середній рівень забезпеченості вітаміном або відсутність вираженого впливу відповідних генетичних варіантів на його обмін. Загалом для молодшої групи характерна наявність виражених пікових значень, що формують асиметричний розподіл із тенденцією до високих концентрацій у певних генотипах.

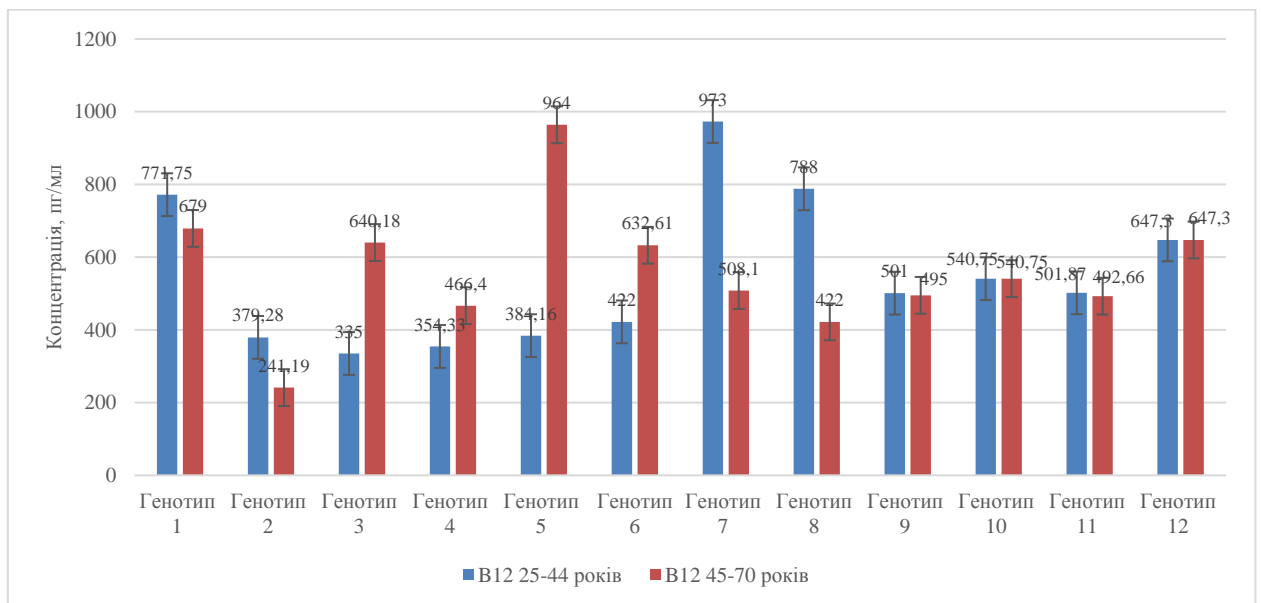


Рис. 3.8. Рівень концентрації вітаміну В12 у жінок 25-44 та 45-70 років за різних генотипів циклу фолієвої кислоти. Молоді жінки позначені синім кольором, а жінки старшого віку – помаранчевим (n = 52)

У старшій віковій групі (45–70 років) картина є ще більш контрастною. Найнижчі показники зафіксовані у генотипі 2 (379,28) та особливо у генотипі 2 (241,19), тоді як найвищий рівень спостерігається у генотипі 5 (964), що перевищує більшість значень молодшої групи. Значні рівні також характерні для генотипів 1 (679) та 12 (647). Водночас у генотипах 7 і 8 відзначається помітне зниження рівня В12 (508,1 та 422, відповідно) порівняно з молодшою

групою, що може свідчити про вікове зниження ефективності метаболізму або засвоєння у носіїв цих генотипів.

Порівняльний аналіз між віковими групами демонструє декілька ключових закономірностей. По-перше, відсутня єдина універсальна тенденція: в одних генотипах (наприклад, 1, 7, 8) рівень В12 вищий у молодшій групі, тоді як в інших (3, 4, 5, 6, 12) — у старшій. Це свідчить про наявність взаємодії «генотип × вік», де вплив генетичного варіанта змінюється з віком. По-друге, у деяких генотипах (9, 10, 11) значення В12 майже ідентичні в обох групах, що може вказувати на відносну стабільність метаболізму вітаміну незалежно від вікового чинника.

Особливу увагу привертають генотипи з найбільшою міжгруповою різницею. Генотип 7 характеризується різким зниженням рівня В12 у старшій групі порівняно з молодшою (973 проти 508,1), що може свідчити про високу чутливість до вікових змін. Натомість генотип 5 демонструє протилежну тенденцію — значне підвищення у старшій групі (964 проти 384,16), що може бути пов'язано з компенсаторними механізмами або особливостями регуляції транспортних білків.

Загалом отримані результати підтверджують, що рівень концентрації вітаміну В12 визначається не лише віком, але й генетичною варіабельністю, причому характер цього впливу є складним і неоднорідним. Виявлені закономірності можуть мати важливе значення для персоналізованої медицини, зокрема при оцінці ризику дефіциту вітаміну В12, інтерпретації лабораторних показників та розробці індивідуалізованих підходів до корекції.

3.3. Кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 25-44 років

На представленій діаграмі (рис. 3.9.) відображено розподіл біохімічних та онкомаркерних показників у чоловіків віком 25–44 роки залежно від рівня концентрації С-реактивного білка (CRP), що виступає маркером системного

запалення. Умовно виділено три групи: низький рівень концентрації CRP (<0,1), помірний (0,1–0,499) та підвищений (>0,5). Загальний аналіз демонструє наявність як прямих, так і обернених зв'язків між рівнем CRP і досліджуваними показниками, що свідчить про складний характер метаболічних і запальних процесів в організмі.

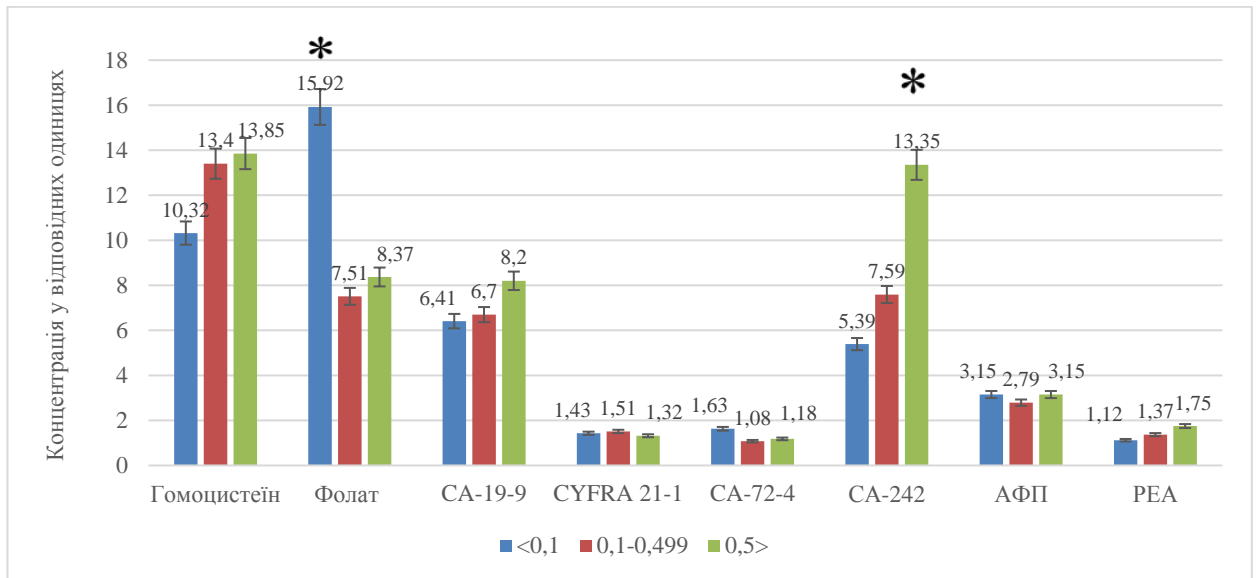


Рис. 3.9. Рівні концентрацій головних метаболітів циклу фолієвої кислоти та досліджуваних онкомаркерів за трьома групами діапазонів рівня CRP пацієнтів віком від 25 до 44 років. Перша група із CRP до 0,1, позначена синім кольором; друга група – CRP 0,1–0,499, позначена помаранчевим кольором; третя група CRP понад 0,5, позначена сірим кольором (n = 48)

* - p < 0,05

Показник гомоцистеїну демонструє чітку позитивну кореляцію з рівнем CRP: його концентрація зростає від 10,32 у групі з низьким CRP до 13,4 і 13,85, відповідно у групах із середнім і високим рівнями концентрацій. Це може свідчити про посилення ендотеліальної дисфункції та зростання серцево-судинного ризику на тлі системного запалення. Водночас фолат має виражену обернену залежність: найвищий рівень концентрацій спостерігається при низькому CRP (15,92), тоді як у групах із вищим CRP його значення значно

нижчі 7,51 і 8,37, відповідно. Така тенденція узгоджується з біохімічною роллю фолатів у метаболізмі гомоцистеїну, що опосередковано підтверджує їх взаємозв'язок: зниження фолатів асоціюється зі зростанням гомоцистеїну та посиленням запалення.

Онкомаркер СА 19-9 демонструє поступове підвищення рівня концентрації зі збільшенням рівня концентрації CRP і становить 6,41; 6,7; 8,2, відповідно, що може свідчити про активацію запальних або проліферативних процесів. Натомість CYFRA 21-1 має майже ідентичні значення у всіх трьох групах, що вказує на відсутність чіткої залежності. Маркер СА 72-4 знижується при переході від низького до помірного CRP (1,63 та 1,08 відповідно), однак практично не змінюється при подальшому підвищенні (1,18), що свідчить про нелінійний характер зв'язку.

Найбільш виражену позитивну залежність від CRP демонструє СА-242: його рівень концентрації зростає більш ніж у два рази — від 5,39 у групі з низьким CRP до 13,35 у групі з високим. Це може вказувати на високу чутливість даного маркера до запальних процесів і потенційно на його роль як індикатора прихованої патології. Альфа-фетопротеїн не демонструє значущої динаміки: його значення залишаються відносно стабільними, що може свідчити про відсутність прямого зв'язку із запальним статусом у даній вибірці. Раково-ембріональний антиген має тенденцію до зростання (1,11; 1,3; 1,75), що може вказувати на помірну позитивну кореляцію з CRP, хоча ця залежність менш виражена порівняно з СА-242.

Узагальнюючи, можна виділити кілька ключових закономірностей. По-перше, підвищення CRP супроводжується зростанням гомоцистеїну та зниженням фолатів, що вказує на метаболічно-запальний зв'язок. По-друге, окремі онкомаркери (зокрема СА-242 та СА 19-9) демонструють позитивну кореляцію з рівнем запалення, що може свідчити про їх чутливість до неспецифічних запальних змін. По-третє, частина показників (CYFRA 21-1, СА 72-4, АФП) не має чіткої лінійної залежності, що підкреслює багатофакторність їх регуляції.

Наведена нижче діаграма на рис 3.10. демонструє розподіл рівнів концентрацій CRP та CYFRA 21-1, CA-72-4, CA-242, АФП і РЕА серед чоловіків віком 25–44 роки залежно від генотипу поліморфізмів циклу фолієвої кислоти.

Найбільш виражену варіабельність серед представлених показників демонструє CA-242. У більшості генотипів його значення перебувають у межах приблизно 3–7 одиниць, однак у деяких групах спостерігаються різкі підвищення. Так, у генотипі 6 зафіксовано максимальне значення — близько 9,45, а у генотипі 10 — 9,34. Також відносно високі показники відзначаються у генотипах 8 (7,59) та 12 (7,36).

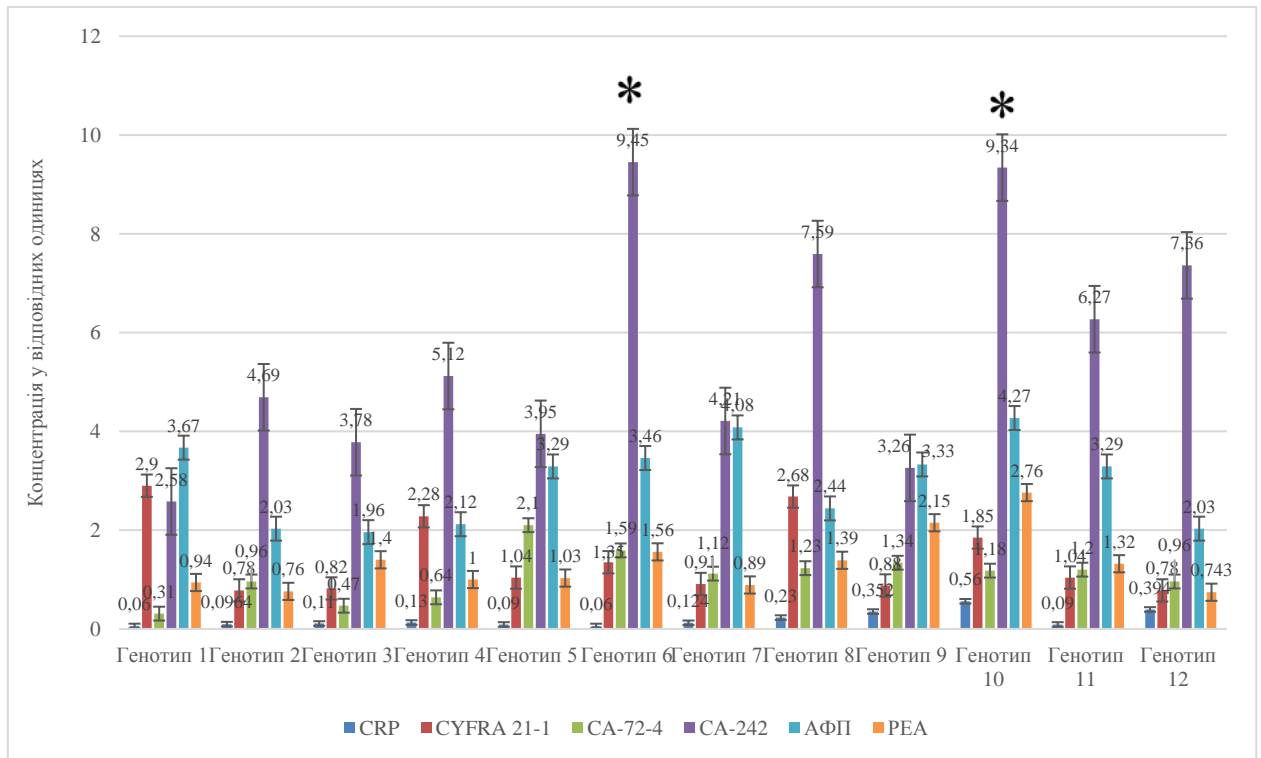


Рис. 3.10. Концентрації CRP та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу у чоловіків 25-44 років. CRP позначений блакитним кольором; CYFRA 21-1 – помаранчевим кольором; CA-72-4 – сірим кольором, CA-242 – жовтим кольором, АФП – синім кольором, РЕА – зеленим кольором (n = 48)

* - $p < 0,05$

АФП демонструє помірну варіабельність між генотипами. У більшості груп його значення коливаються від 2 до 4,3 одиниць. Найвищий показник спостерігається у генотипі 10 (4,27), тоді як дещо нижчі значення характерні для генотипів 1–4, однак загально коливання рівня АФП є незначними, тож це може свідчити про відсутність впливу генетичного фактору досліджуваних генотипів на його експресію у молодих чоловіків.

Маркер CYFRA 21-1 характеризується відносно невисокими значеннями рівнів концентрації, які в більшості генотипів знаходяться в межах 1–3 одиниць. Найбільш підвищені показники спостерігаються у генотипів 1 та 8, де вони досягають 2,9 та 2,68, відповідно. Аналогічна картина у показниках маркеру СА-72-4, де виражені низькі значення у більшості генотипів, переважно у межах 0,1–0,3 одиниці, що відповідає низькій активності цього маркера у досліджуваній віковій групі. Загалом варіабельність обох маркерів є помірною, що може свідчити про відносно слабкий вплив генотипових відмінностей на їхній рівень у молодих чоловіків.

Середні значення концентрації CRP у більшості генотипів коливаються у достатньо низьких медично допустимих нормах, окрім генотипу 10, де значення становить 0,56, що свідчить про потенційну кореляцію між цим генотипом та схильністю до системного запалення у молодих чоловіків.

Маркер PEA демонструє помірну варіабельність. Його значення здебільшого знаходяться у межах 0,7–2,7 одиниці, причому найбільш високі показники відзначаються у генотипах 9 та 10, де вони перевищують 2 одиниці. Це може свідчити про певні генотипові особливості регуляції цього онкомаркера.

Загалом діаграма на рис. 3.10. показує, що у чоловіків віком 25–44 роки найбільш виражену варіабельність між генотипами демонструє СА-242, тоді як інші маркери мають більш стабільний розподіл. Помірні генотипові відмінності характерні для АФП та PEA, тоді як CRP, CYFRA 21-1 та СА-72-4 характеризуються відносно низькою амплітудою змін.

Наведена нижче діаграма на рис. 3.11. відображає розподіл рівнів концентрацій гомоцистеїну, фолату та СА-19-9 серед 12 генотипових груп у чоловіків 25-44 роки.

Показник рівня концентрації гомоцистеїну демонструє відносно стабільний розподіл між генотипами, хоча спостерігається помірна варіабельність. У більшості генотипових груп його значення перебувають у межах приблизно 9–12 одиниць. Найвищий рівень спостерігається у генотипі 10 (18,46), що помітно перевищує значення інших груп. Дещо підвищені показники також характерні для генотипів 3 (16,61) та 4 (15,48). Підвищення гомоцистеїну може бути пов'язане з особливостями метаболізму фолатного циклу, зокрема з ефективністю реметилування гомоцистеїну до метіоніну. У свою чергу, найнижчі значення відзначаються у генотипі 6 (6,59).

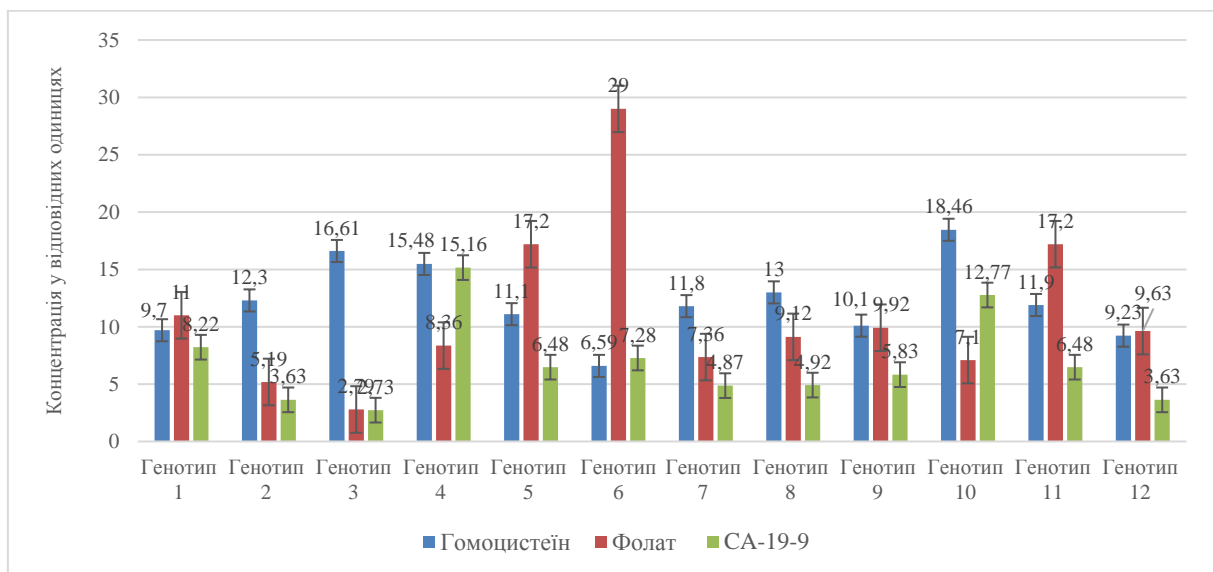


Рис. 3.11. Порівняння рівнів концентрацій гомоцистеїну, фолату та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу. Гомоцистеїн позначений блакитним кольором; фолат – помаранчевим кольором; СА-19-9 – сірим кольором (n = 48)

Показник рівня концентрації фолату характеризується значно більшою варіабельністю між генотипами. У більшості випадків його значення

знаходяться у межах 5–12 одиниць, однак для окремих генотипів спостерігаються суттєві відхилення. Найбільш виражене підвищення фіксується у генотипі 6, де рівень концентрації фолату досягає приблизно 29 одиниць, що є максимальним значенням на графіку. Досить високі показники також спостерігаються у генотипів 5 та 11 (17,2). Водночас найнижчі значення відзначаються у генотипі 3 (2,79). Така різниця може свідчити про суттєвий вплив генетичних факторів на засвоєння або метаболізм фолатів.

Маркер СА-19-9 демонструє відносно стабільні значення рівнів концентрацій у більшості генотипів, що коливаються приблизно у межах 3–7 одиниць. Найвищі показники спостерігаються у генотипах 4 (15,16) та 10 (12,77), що може свідчити про певні генотипові особливості регуляції цього маркера. У решті генотипових груп значення рівнів концентрацій залишаються помірними, що відповідає відсутності значних патологічних змін у досліджуваних групах чоловіків.

Особливу увагу привертає взаємозв'язок між гомоцистеїном та фолатом. На діаграмі (рис. 3.11.) можна спостерігати певні приклади такої залежності. Наприклад, у генотипі 6 дуже високий рівень фолату супроводжується одним із найнижчих значень гомоцистеїну, що узгоджується з біохімічними механізмами метаболізму. Натомість у генотипах 3 та 4, де рівень фолату нижчий або помірний, гомоцистеїн має тенденцію до підвищення.

Узагальнюючи отримані результати, можна зазначити, що серед досліджуваних показників найбільш виражену варіабельність між генотипами демонструє фолат, тоді як гомоцистеїн характеризується більш стабільним розподілом. Маркер СА-19-9 у більшості генотипів залишається у відносно вузькому діапазоні, хоча в окремих групах спостерігаються підвищені значення.

Графік порівняльної стовпчастої діаграми на рис. 3.12. відображає рівень вітаміну В12 у різних генотипових групах із порівнянням двох вікових категорій: 25–44 роки та 45–70 років. Такий формат дозволяє оцінити не лише

генотипову варіабельність показника, але й можливий вплив віку на концентрацію вітаміну В12 у сироватці крові.

Загалом аналіз діаграми демонструє, що рівень концентрації вітаміну В12 варіює між генотипами, причому в багатьох випадках спостерігається досить значна різниця між віковими групами. У більшості генотипів концентрація В12 у молодшій віковій групі (25–44 роки) є або вищою, або приблизно співставною з показниками старшої групи. Одним із найбільш показових прикладів є генотип 6, де у групі 25–44 років спостерігається одне з найвищих значень — 852,85, тоді як у групі 45–70 років рівень становить 434. Подібна різниця може свідчити про вікові зміни засвоєння або метаболізму вітаміну В12, які можуть бути пов'язані зі зниженням ефективності шлунково-кишкового всмоктування у старшому віці.

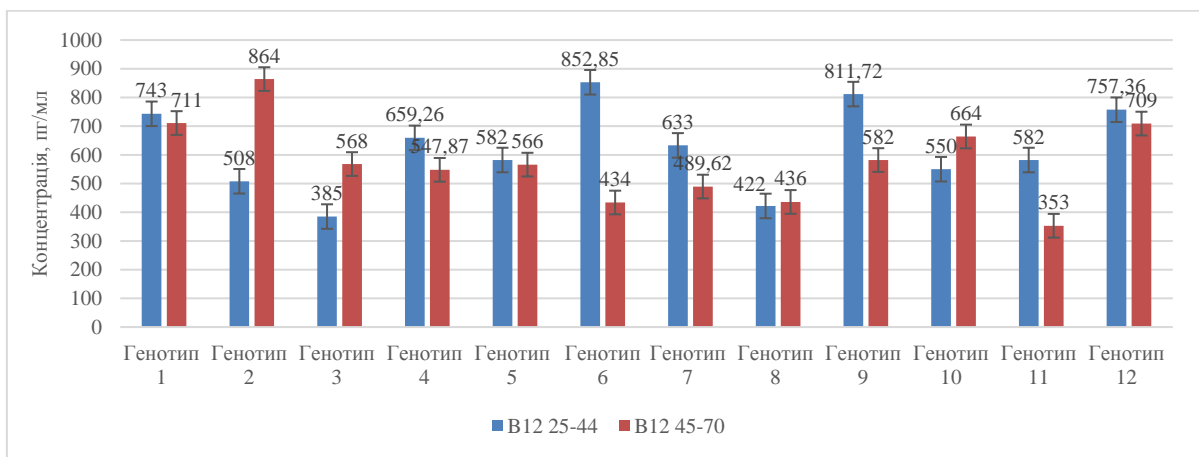


Рис. 3.12. Порівняння середніх значень концентрацій вітаміну В12 у чоловіків 25-44 та 45-70 років за різних генотипів циклу фолієвої кислоти. Молоді чоловіки позначені синім кольором, а чоловіки старшого віку – помаранчевим (n = 97)

Подібна тенденція спостерігається також у генотипах 9 та 11. У генотипі 9 рівень В12 у молодшій групі становить 811,72, тоді як у старшій — 582. У генотипі 11 різниця ще більш виражена: 582 у групі 25–44 років проти 353 у

групі 45–70 років. Такі результати можуть свідчити про можливу взаємодію між генотипом і віком у регуляції рівня цього вітаміну.

Водночас у деяких генотипах спостерігається протилежна тенденція, коли концентрація В12 є вищою у старшій віковій групі. Найбільш помітним прикладом є генотип 2, де рівень В12 у групі 45–70 років досягає приблизно 864, тоді як у групі 25–44 років він становить близько 508. Подібна ситуація також спостерігається у генотипах 3 та 10, де показники старшої вікової групи перевищують значення молодшої.

Деякі генотипи демонструють відносно невелику різницю між віковими категоріями. Наприклад, у генотипах 1 та 12 рівні В12 у двох вікових групах є досить близькими (743 проти 711 у генотипі 1 та 757 проти 709 у генотипі 12). Така стабільність може свідчити про менший вплив вікових факторів на метаболізм вітаміну В12 у носіїв цих генотипів.

Загалом результати свідчать про наявність вираженої генотипової та вікової варіабельності рівня вітаміну В12. У частині генотипів спостерігається тенденція до зниження концентрації В12 з віком, що узгоджується з відомими фізіологічними особливостями метаболізму цього вітаміну. В інших генотипах, навпаки, відзначається підвищення рівня у старшій віковій групі, що може свідчити про індивідуальні особливості регуляції обміну кобаламіну.

Таким чином, отримані результати можуть свідчити про те, що рівень вітаміну В12 формується під впливом як генетичних, так і вікових факторів, що призводить до формування специфічних метаболічних профілів у різних генотипових та вікових групах.

3.4. Кореляції між досліджуваними показниками у чоловіків 45-70 років

Представлена діаграма (рис. 3.13.) ілюструє біохімічні показники у чоловіків віком 45–70 років залежно від рівня концентрації С-реактивного білка (CRP), поділеного на три групи: $<0,1$; $0,1-0,499$; $\geq 0,5$. Аналіз дозволяє

виявити як маркери, чутливі до запального процесу, так і ті, що демонструють відносну стабільність незалежно від рівня CRP.

Показники рівнів концентрації гомоцистеїну демонструють помірну варіабельність між групами рівнів CRP. Найвищі значення спостерігаються при помірному рівні CRP (15,22), тоді як при високому CRP (14,12) відбувається незначне зниження, але показник залишається вищим, ніж у групі з низьким CRP (12,1). Така динаміка може свідчити про часткову позитивну асоціацію між запаленням і рівнем концентрації гомоцистеїну, хоча без чітко вираженої лінійної залежності.

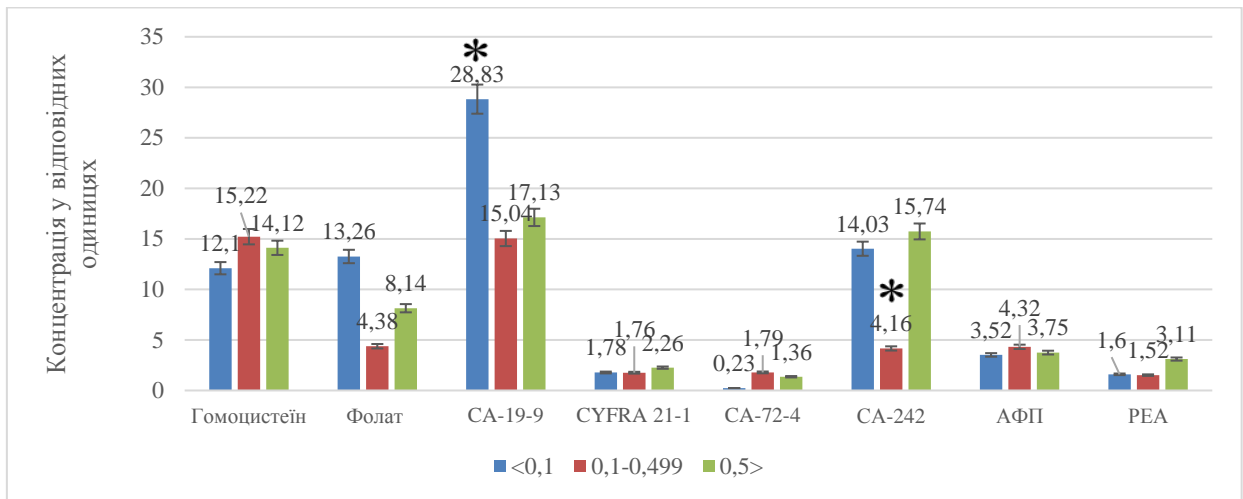


Рис. 3.13. Порівняння рівнів концентрацій головних метаболітів циклу фолієвої кислоти та досліджуваних онкомаркерів за трьома групами діапазонів рівнів концентрацій CRP пацієнтів віком від 45 до 70 років. Перша група із CRP до 0,1, позначена синім кольором; друга група – CRP 0,1–0,499, позначена помаранчевим кольором; третя група CRP понад 0,5, позначена сірим кольором (n = 49)

* - $p < 0,05$

Рівень концентрації фолатів, навпаки, має тенденцію до зниження зі зростанням CRP: від 13,26 при низькому CRP до 8,14 і 4,38 у групах із помірним і високим рівнями відповідно. Це вказує на негативну кореляцію між

запаленням і рівнем фолатів, що може бути пов'язано з підвищеним споживанням фолатів у процесах метаболізму або зниженням їх біодоступності при хронічному запаленні.

Особливо виражені зміни спостерігаються для онкомаркера СА 19-9. Його максимальне значення зафіксоване при низькому CRP (28,83), після чого відбувається різке зниження при підвищенні CRP (15,04–17,13). Така обернена залежність може вказувати на складні механізми регуляції, де високий рівень системного запалення не супроводжується підвищенням цього маркера, або навіть пригнічує його експресію.

Для маркерів CYFRA 21-1 та СА 72-4 характерна відносна стабільність із незначними коливаннями між групами. CYFRA 21-1 демонструє поступове зростання від 1,78 до 2,26, що може вказувати на слабку позитивну кореляцію із CRP. СА 72-4 має низькі значення у всіх групах із мінімальним підвищенням при середньому CRP, що не дозволяє говорити про чітку закономірність.

Водночас СА-242 демонструє виражену нелінійну залежність: найвищі значення спостерігаються при високому CRP (15,74), тоді як при середньому рівні CRP відбувається різке зниження (4,16), а при низькому — помірний рівень (14,03). Це може свідчити про активацію цього маркера саме при вираженому запаленні.

Альфа-фетопротейн демонструє відносну стабільність у всіх групах (3,52–4,32), що вказує на відсутність значущого впливу CRP на його рівень у даній когорті. Подібна тенденція характерна і для РЕА, хоча тут спостерігається поступове зростання зі збільшенням CRP від 1,6 до 3,11, що може свідчити про потенційний зв'язок із запальними процесами або супутніми патологічними станами.

Узагальнюючи, можна виділити кілька ключових закономірностей. По-перше, частина показників (фолати) демонструє чітку негативну кореляцію з рівнем CRP, тоді як інші (CYFRA 21-1, РЕА) – слабку позитивну. По-друге, деякі маркери (СА 19-9, СА-242) мають нелінійний характер змін, що свідчить про складну регуляцію у відповідь на запалення. По-третє, окремі показники

(АФП) залишаються стабільними, що може вказувати на їхню незалежність від системного запального статусу.

Таким чином, у чоловіків 45–70 років вплив CRP на біохімічні показники є гетерогенним: одні маркери чітко реагують на зміни рівня запалення, тоді як інші залишаються відносно інертними. Це підкреслює необхідність комплексного підходу до інтерпретації лабораторних даних із урахуванням запального статусу пацієнта.

Представлена діаграма (рис. 3.14.) відображає комплексний розподіл біохімічних показників (CRP, CYFRA 21-1, СА 72-4, АФП, РЕА) у межах 12 генотипів, що дозволяє оцінити взаємозв'язки між генетичними особливостями, запальним статусом та пухлинними маркерами. Отримані дані демонструють виражену гетерогенність, що свідчить про складну багатофакторну регуляцію досліджуваних показників.

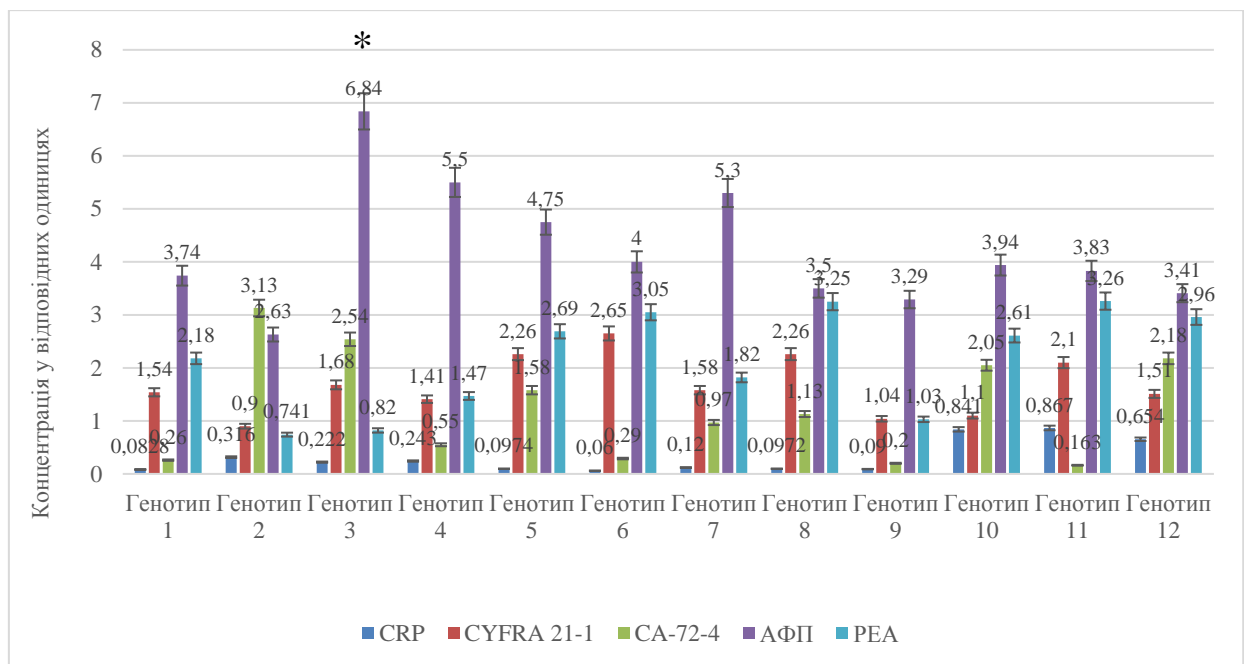


Рис. 3.14. Порівняння рівнів концентрації CRP та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу у чоловіків 25-44 років. CRP позначений блакитним кольором; CYFRA 21-1 – помаранчевим кольором; СА-72-4 – сірим кольором, АФП – жовтим кольором, РЕА – синім кольором.

* - $p < 0,05$

Рівень концентрації CRP у більшості генотипах залишається низьким, однак у генотипах 10,11 та 12 значення виходять за медично допустимі норми, водночас найнижчі значення характерні для генотипів 1, 6 та 7.

Показник CYFRA 21-1 демонструє помірні коливання між генотипами (0,9–2,7). Найвищі значення спостерігаються у генотипах 5, 6 та 8, що може вказувати на потенційно підвищену клітинну проліферацію або епітеліальне ремоделювання. Водночас у генотипах із низьким CRP (наприклад, 1 і 2) рівень CYFRA 21-1 також залишається невисоким, що може свідчити про часткову узгодженість між запальним статусом і цим маркером.

Рівень концентрації СА 72-4 варіює в діапазоні 0,7–3,3 із тенденцією до підвищення у генотипах 8, 11 та 12. Це може свідчити про генетично детерміновану схильність до підвищення даного маркера, незалежно від рівня CRP, оскільки чіткої прямої кореляції між цими показниками не простежується.

Альфа-фетопротейн демонструє найбільш виражену варіабельність серед усіх показників. Значення коливаються від 2,6 до 6,84, з піковими рівнями у генотипах 3 (6,84), 4 (5,5) та 7 (5,3). Такий розподіл формує чітко виражену асиметрію і може вказувати на суттєвий вплив генетичних факторів на регуляцію цього маркера. Водночас відсутність прямого зв'язку з CRP свідчить про незалежність АФП від запального компоненту в даному випадку.

Рівень концентрації РЕА характеризується особливо високими значеннями у генотипах 8, 11 та 12, що потенційно вказує на підвищений ризик асоційованих патологічних станів у носіїв цих варіантів.

Загалом можна виділити кілька ключових закономірностей. По-перше, прямий зв'язок між CRP і більшістю онкомаркерів є слабким або відсутнім, що свідчить про незалежність генетичних факторів від рівня системного запалення у формуванні їх концентрацій. По-друге, окремі маркери (наприклад, РЕА та СА 72-4) демонструють узгоджене підвищення у певних генотипах, що може вказувати на спільні механізми регуляції.

Представлена діаграма на рис. 3.15. відображає варіацію рівнів концентрацій гомоцистеїну, фолатів, а також онкомаркерів СА 19-9 і СА-242 у межах 12 генотипів. Отримані дані свідчать про виражену міжгенотипову гетерогенність і дозволяють простежити потенційні метаболічні та патофізіологічні взаємозв'язки між показниками.

Рівень концентрації гомоцистеїну характеризується помірною варіабельністю (від 7,4 до 19,1). Найвищі значення спостерігаються у генотипах 2 (18,46) та 4 (19,1), що виходить за допустимі медичні норми, тоді як мінімальні — у генотипі 3 (7,46). Загалом не простежується різких піків, що свідчить про відносно стабільний розподіл цього показника між генотипами. Фолати демонструють більш виражену варіабельність. Найвищі значення зафіксовані у генотипах 6 (17,9) та 9 (17,2), тоді як найнижчі — у генотипах 10–12 (4,5–6,39). Важливо, що в ряді випадків спостерігається обернена залежність між рівнями фолатів і гомоцистеїну: наприклад, у генотипі 4 високий гомоцистеїн поєднується з помірно низькими фолатами, що узгоджується з біохімічними механізмами, де дефіцит фолатів сприяє накопиченню гомоцистеїну.

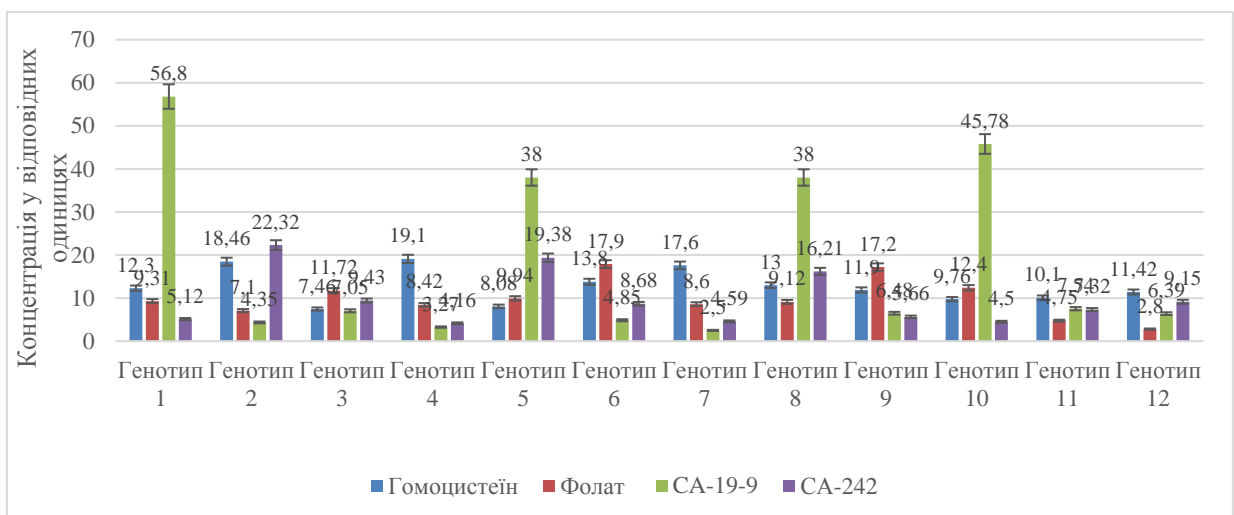


Рис. 3.15. Порівняння рівнів концентрацій гомоцистеїну, фолату та ряду пухлинних маркерів залежно від генотипу. Гомоцистеїн позначений блакитним кольором; фолат – помаранчевим кольором; СА-19-9 – сірим кольором, СА-242 – жовтим кольором

Онкомаркер СА 19-9 демонструє найбільш виражену варіабельність серед усіх показників. Максимальні значення спостерігаються у генотипах 1 (56,8), 10 (45,78), а також 5 і 8 (38), що формує чіткі пікові зони. У той же час у генотипах 3, 4, 9, 11 і 12 рівень СА 19-9 значно нижчий (5–9), що може свідчити про генетично зумовлену різницю в експресії або кліренсі цього маркера. Така асиметрія розподілу вказує на наявність окремих груп ризику серед генотипів.

Маркер СА-242 також демонструє значну варіабельність, хоча його значення загалом нижчі порівняно з СА 19-9. Найвищі показники характерні для генотипів 2 (22,32), 5 (19,38) та 8 (16,21), тоді як у більшості інших генотипів вони не перевищують 10. В окремих випадках (наприклад, генотипи 5 і 8) спостерігається одночасне підвищення як СА 19-9, так і СА-242, що може вказувати на спільні регуляторні механізми або потенційне клінічне значення такого поєднання.

Можна виділити кілька важливих закономірностей. По-перше, СА 19-9 і СА-242 у частини генотипів демонструють узгоджене підвищення, що свідчить про можливу синергічну регуляцію. По-друге, відсутня чітка залежність між концентраціями метаболічних показників (гомоцистеїн, фолати) та онкомаркерами, що підкреслює їх відносну автономність.

ВИСНОВКИ

У дослідженні встановлено наявність вибіркових кореляцій між показниками фолатного циклу, рівнем С-реактивного білка (CRP) та рядом онкомаркерів. Найбільш узгоджену динаміку продемонстрували СА-125, СА-15-3 та СА-19-9, тоді як СА-242 і СА-72-4 характеризувалися більшою варіабельністю та залежністю від генотипу. Кореляція між змінами метаболічного статусу і рівнями запальних маркерів та пухлинних антигенів можуть широко використовуватися у клінічній практиці для діагностики та моніторингу онкологічних захворювань.

1. В групі жінок 24–44 років виявлено синхронне підвищення СА-125, СА-15-3 та СА-19-9 у групі з максимальними значеннями фолату. СА-242 демонстрував протилежну динаміку щодо цих маркерів. HE-4 та CYFRA 21-1 залишалися відносно стабільними та не показували виражених кореляцій із показниками фолатного циклу або CRP.
2. В групі жінок 45–70 років спостерігалася тенденція до асоціації підвищеного CRP із варіаціями окремих онкомаркерів, однак чіткої узгодженої динаміки між усіма маркерами не встановлено. Найбільшу варіабельність зберігали СА-242 та СА-72-4.
3. В групі чоловіків 25–44 років кореляційні зв'язки були менш вираженими. Відзначено відносну стабільність більшості маркерів, при цьому СА-242 та СА-72-4 демонстрували індивідуальну варіабельність без чіткої залежності від CRP або показників фолатного циклу.
4. У групі чоловіків 45–70 років виявлено генотип-асоційоване підвищення СА-242 та СА-72-4, зокрема у генотипах 5, 7, 10, що супроводжувалося підвищенням AFP, однак CRP, CYFRA 21-1 та СЕА залишалися відносно стабільними та не демонстрували чітких кореляцій із іншими показниками.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Behrouzi, R., Barr, C. and Crosbie, E. (2021). HE4 as a Biomarker for Endometrial Cancer. *Cancers*, [online] Volume 13(19), p.4764. <https://doi.org/10.3390/cancers13194764> [Accessed 23 Sept 2021].
2. Galgano, M., Hampton, G. and Frierson, H. (2006). Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Modern Pathology*, 19(6), pp.847–853.
3. Lu, Q., Chen, H., Senkowski, C., Wang, J., Wang, X., Brower, S., Glasgow, W., Byck, D., Jiang, S.-W. and Li, J. (2015). Recombinant HE4 protein promotes proliferation of pancreatic and endometrial cancer cell lines. *Oncology Reports*, 35(1), pp.163–170.
4. Zhou, Y., Tao, L., Qiu, J., Xu, J., Yang, X., Zhang, Y., Tian, X., Guan, X., Cen, X. and Zhao, Y. (2024). Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), pp.1–86.
5. Zhang, R., Siu, M., Ngan, H. and Chan, K. (2022). Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 23(19), p.12041. Available at: [doi:https://doi.org/10.3390/ijms231912041](https://doi.org/10.3390/ijms231912041) [Accessed 10 Oct 2022].
6. Zhang, M., Cheng, S., Jin, Y., Zhao, Y. and Wang, Y. (2021). Roles of CA125 in diagnosis, prediction, and oncogenesis of ovarian cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, [online] Volume 1875(2), p.188503. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188503> [Accessed April 2021].
7. Franier, B. and Thompson, M. (2019). Early stage detection and screening of ovarian cancer: A research opportunity and significant challenge for biosensor technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 135, pp.71–81.
8. Akinwunmi, B., Babic, A., Vitonis, A., Cramer, D., Titus, L., Tworoger, S. and Terry, K. (2018). Chronic Medical Conditions and CA125 Levels among

- Women without Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 27(12), pp.1483–1490.
9. Zhang, J., Wei, Q., Dong, D. and Ren, L. (2021). The role of TPS, CA125, CA15-3 and CEA in prediction of distant metastasis of breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 523, pp.19–25.
 10. Momenimovahed, Z., Mazidimoradi A., Allahqoli, L., Khalajinia Z., Salehiniya H. and Alkatout I. (2025). Utility of CA-125 for diagnosis and prognosis of breast cancer: a systematic review. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, [online] Volume 6, p. 1002316. Available at: doi:<https://doi.org/10.37349/etat.2025.1002316> [Accessed 15 May 2025].
 11. Ryu, J., Kang, D., Cho, J., Lee, J., Kim, S., Nam, S., Lee, S., Kim, Y., Im, Y.-H., Ahn, J., Park, Y., Kim, J.-Y., Lee, H., Kang, M. and Yu, J. (2023). Prognostic Impact of Elevation of Cancer Antigen 15-3 (CA15-3) in Patients With Early Breast Cancer With Normal Serum CA15-3 Level. *Journal of Breast Cancer*, 26(2), pp.126–135.
 12. Duffy, M., Evoy, D. and McDermott, E. (2010). CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), pp.1869–1874.
 13. Owaid, H. and Jewad, A. (2025). Efficacy of Cancer Antigen 15-3, Trefoil Factor-3, and Human Epididymis Protein-4 in the Diagnosis of Breast Cancer. *Archives of Breast Cancer*, 12(3), pp.303–310.
 14. Ahmadipour, M., Bhattacharya, A., Sarafbidabad, M., Sazali, E., Ghoshal, S., Satgunam, M., Singh, R., Ardani, M., Missaoui, N., Kahri, H., Pal, U. and Pang, A. (2024). CA19-9 and CEA biosensors in pancreatic cancer. *Clinica chimica acta*, [online] Volume 554, pp.117788–117788. Available at: doi:<https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.117788> [Accessed 1 February 2024].
 15. Luo, G., Xiao, Z., Long, J., Liu, Z., Liu, L., Liu, C., Xu, J., Ni, Q. and Yu, X. (2013). CA125 is Superior to CA19-9 in Predicting the Resectability of Pancreatic Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17(12), pp.2092–2098.

16. Wang, M., Bu, H., Luo, W., Zeng, X., Chen, G., He, Y. and Cao, D. (2025). CA19-9, CEA and PIVKA- II as a novel panel of serum markers for diagnosis of pancreatic cancer. *Clinical Biochemistry*, [online] pp.110902–110902. Available at: doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2025.110902> [Accessed June 2025].
17. Zhu, J. and Li, H. (2023). Serum expression of tumor marker CA242 in patients with different gynecological diseases. *Laboratory Medicine*, 54(6), pp.613–617.
18. Qi, J., Chen, F., Li, J. and Qi, X. (2018). Diagnostic value of CYFRA 21-1 and carcinoembryonic antigen in diagnosis of operable lung cancer from benign lung disease. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, [online] Volume 14(9), p.400. Available at: doi:<https://doi.org/10.4103/0973-1482.174180> [Accessed June 2018].
19. Ucdal, M., Yazarkan, Y., Sonmez, G., Celtikci, B. and Balaban, Y. (2025). Alpha-fetoprotein: A Multifaceted Player in Cancer Biology. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology*, 15(1), pp.72–82.
20. Androutsopoulos, G., Gkogkos, P. and Decavalas, G. (2013). Mid-Trimester Maternal Serum hCG and AFP Levels: Clinical Significance and Prediction of Adverse Pregnancy Outcome. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, [online] Volume 11(2). Available at: doi:<https://doi.org/10.5812/ijem.5014> [Accessed 01 April 2013].
21. Kim, H., Jang, M. and Kim, E. (2025). Exploring the Multifunctional Role of Alpha-Fetoprotein in Cancer Progression: Implications for Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), pp.4863–4863.
22. Yanqing, H., Cheng, D. and Ling, X. (2018). Serum CA72-4 as a biomarker in the diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *Open Medicine*, Volume 13(1), pp.164–171.
23. Xu, Y., Zhang, P., Zhang, K. and Huang, C. (2021). The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer*, [online] Volume 1876(2), p.188634. Available at: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188634> [Accessed December 2021].
24. Michels, N., van Aart, C., Morisse, J., Mullee, A. and Huybrechts, I. (2021). Chronic inflammation towards cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, [online] Volume 157, p.103177. Available at: doi:<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103177> [Accessed January 2021].
25. PubChem (2026). *C-Reactive Protein (CRP) (201-206)*. [online] Nih.gov. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/C-Reactive-Protein-_CRP_-_201-206#section=Computed-Descriptors [Accessed 14 Mar. 2026].
26. Sproston, N. and Ashworth, J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, [online] Volume 9(754). Available at: doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754> [Accessed 13 April 2018].
27. Michels, K. and Binder, A. (2023). Impact of folic acid supplementation on the epigenetic profile in healthy unfortified individuals – a randomized intervention trial. *Epigenetics*, [online] Volume 19(1). Available at: doi:<https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2293410> [Accessed 14 December 2023].
28. Zhang, D., Wen, X., Wu, W., Guo, Y. and Cui, W. (2015). Elevated Homocysteine Level and Folate Deficiency Associated with Increased Overall Risk of Carcinogenesis: Meta-Analysis of 83 Case-Control Studies Involving 35,758 Individuals. *PLOS ONE*, [online] Volume 10(5), p.e0123423. Available at: doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123423> [Accessed 11 August 2018].

29. Crider, K., Yang, T., Berry, R. and Bailey, L. (2012). Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Advances in Nutrition*, 3(1), pp.21–38.
30. Nih.gov. (2026). *MTR 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4548>.
31. Simonenko, S., Bogdanova, D. and Kuldyushev, N. (2024). Emerging Roles of Vitamin B12 in Aging and Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 25(9), pp.5044–5044.
32. Balabanova, L., Averianova, L., Marchenok, M., Son, O. and Tekutyeva, L. (2021). Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 22(9), p.4522. Available at: doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22094522> [Accessed 26 April 2021].
33. Gautam, K., Raghav, A., Sankhwar, S., Singh, R. and Tripathi, P. (2023). Genetic Polymorphisms of Gene Methionine Synthase Reductase (MTRR) and Risk of Urinary Bladder Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(4), pp.1137–1141.
34. Zhu, X., Wei, J., Li, J., Zuo, S., Wang, J. and Liu, N. (2025). The causal role of homocysteine in multiple diseases: a systematic review of Mendelian randomization studies. *Nutrition and Metabolism*, [online] Volume 22(1). Available at: doi:<https://doi.org/10.1186/s12986-025-00933-0> [Accessed May 2025].
35. Nemtsova, M., Kalinkin, A., Kuznetsova, E., Bure, I., Alekseeva, E., Bykov, I., Khorobrykh, T., Mikhaylenko, D., Tanas, A. and Strelnikov, V. (2021). Mutations in Epigenetic Regulation Genes in Gastric Cancer. *Cancers*, 13(18), p.4586.
36. Lupan, I., Bintintan, V., Deleanu, D. and Samasca, G. (2024). Epigenetic Regulation of DNA Methylation and RNA Interference in Gastric Cancer: A 2024 Update. *Biomedicines*, [online] Volume 12(9), pp.2001–2001.

Available at: doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines12092001> [Accessed 3 September 2024].

37. Ribeiro, A., Pratcorona, M., Erpelinck-Verschueren, C., Rockova, V., Sanders, M., Abbas, S., Figueroa, M., Zeilemaker, A., Melnick, A., Löwenberg, B., Valk, P. and Delwel, R. (2012). Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(24), pp.5824–5831.
38. Russler-Germain, D., Spencer, D., Young, M., Lamprecht, T., Miller, C., Fulton, R., Meyer, M., Erdmann-Gilmore, P., Townsend, R. Wilson, R. and Timothy, L. (2014). The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. *Cancer Cell*, 25(4), pp.442–454.
39. Hackett, J., Sengupta, R., Zylitz, J., Murakami, K., Lee, C., Down, T. and Surani, M. (2012). Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. *Science*, 339(6118), pp.448–452.
40. Pastore, F. and Levine, R. (2016). Epigenetic regulators and their impact on therapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 101(3), pp.269–278.
41. Cheng, Y., Song, Z., Fang, X. and Tang, Z. (2024). Polycomb repressive complex 2 and its core component EZH2: potential targeted therapeutic strategies for head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical epigenetics*, [online] Volume 16(1). Available at: doi:<https://doi.org/10.1186/s13148-024-01666-2> [Accessed 10 April 2024].
42. Kouznetsova, V., Tchekanov, A., Li, X., Yan, X. and Tsigelny, I. (2019). Polycomb repressive 2 complex—Molecular mechanisms of function. *Protein Science*, 28(8), pp.1387–1399.