



Климкович Н.Н.¹, Руденкова Т.В.¹, Костюк С.А.¹, Алешкевич С.Н.², Демиденко А.Н.³, Яковлева Е.А.²

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

Полиморфные варианты генов цитохрома P450 у детей с острым лимфобластным лейкозом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Климкович Н.Н. – концепция и дизайн исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация данных, написание текста, редактирование; Руденкова Т.В. – анализ литературы, получение экспериментальных данных, создание базы и статистическая обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание текста, редактирование; Костюк С.А. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование; Алешкевич С.Н. – сбор материала и создание базы данных, интерпретация и статистическая обработка данных; Демиденко А.Н. – сбор материала и создание базы данных, статистическая обработка и интерпретация данных, редактирование; Яковлева Е.А. – сбор материала и создание базы данных.

Подана: 15.08.2022

Принята: 29.09.2022

Контакты: det.hematology@mail.ru

Резюме

Цель. Анализ полиморфизмов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 у детей с токсическими осложнениями на фоне лечения ОЛЛ.

Материалы и методы. Материал исследования – периферическая кровь и буккальный эпителий 43 пациентов с ОЛЛ на фоне полихимиотерапии в возрасте от 2 до 17 лет. Использованы клиничко-лабораторные, молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция (ПЦР), рестрикция фрагментов ДНК, электрофоретический анализ фрагментов ДНК), статистические методы.

Результаты. Профиль токсических осложнений у детей с острыми лимфобластными лейкозами из В-клеток-предшественников на фоне химиотерапии, соответствующих III–IV степени токсичности, представлен гематологическими, гастроинтестинальными, печеночными и инфекционными осложнениями. Частота аллелей дикого типа была доминирующей для полиморфизмов: A4889G (rs1048943) в гене CYP1A1; T7632A (rs6413432), G1293C (rs3813867) и C1053T (rs2031920) в гене CYP2E1; A2549del (rs35742686) в гене CYP2D6, для данных геновариантов частота выявления составила от 90,70 до 100%. Распространенность гетерозиготных геновариантов среди обследованных пациентов была выше для полиморфизма T6235C (rs4646903) в гене CYP1A1 (гетерозиготный аллель TC – 27,91%), а также для полиморфизма G1846A (rs3892097) в гене CYP2D6 (гетерозиготный аллель GA – 32,56%). Самая высокая частота выявления мутантного аллеля была определена для полиморфизма C100T (rs1065852) в гене CYP2D6 (мутантный аллель TT – 27,50%).



Заключение. Установлена частота выявления различных вариантов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 у детей на фоне химиотерапии ОЛЛ. Полученные результаты лягут в основу дальнейших исследований определения ассоциации полиморфных вариантов генов CYP с формированием осложнений в ходе лечения детей с ОЛЛ.

Ключевые слова: цитохром P450, полиморфизм генов CYP, дети, острый лимфобластный лейкоз, осложнения

Klimkovich N.¹, Rudenkova T.¹, Kostiuk S.¹, Aleshkevich S.², Demidenko A.³, Yakovleva E.²

¹ Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² Republican scientific and practical Center for children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

³ Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Klimkovich N.– research concept and design, literature analysis, data analysis and interpretation, text writing, editing; Rudenkova T.– literature analysis, experimental data acquisition, database creation and statistical data processing, data analysis and interpretation, text writing, editing; Kostiuk S.– research concept and design, analysis and interpretation of data, editing; Aleshkevich S.– collection of material and creation of a database, interpretation and statistical processing of data; Demidenko A.– collection of material and creation of a database, statistical processing and interpretation of data, editing; Yakovleva E.– collection of material and creation of a database.

Submitted: 15.08.2022

Accepted: 29.09.2022

Contacts: det.hematology@mail.ru

Abstract

Purpose. Analysis of CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 gene polymorphisms in children with toxic complications during acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment.

Materials and methods. The study material was peripheral blood and buccal epithelium of 43 patients with ALL and polychemotherapy aged from 2 to 17 years. Clinical-laboratory, molecular-biological (polymerase chain reaction (PCR), restriction of DNA fragments, electrophoretic analysis of DNA fragments), statistical methods were used.

Results. The profile of toxic complications in children with ALL from B-cell precursors against during of chemotherapy, corresponding to III–IV degrees of toxicity, was represented by hematological, gastrointestinal, hepatic and infectious complications. The frequency of wild-type alleles was dominant for the polymorphisms: A4889G (rs1048943) in the CYP1A1 gene; T7632A (rs6413432), G1293C (rs3813867), and C1053T (rs2031920) in the CYP2E1 gene; A2549del (rs35742686) in the CYP2D6 gene; for these gene variants the detection rate was 90.70 to 100%. The prevalence of heterozygous gene variants among the examined patients was higher for the polymorphism T6235C (rs4646903) in the CYP1A1 gene (heterozygous allele TC – 27.91%), and for the polymorphism G1846A (rs3892097) in the CYP2D6 gene (heterozygous allele GA – 32.56%). The highest frequency

of mutant allele detection was determined for the C100T polymorphism (rs1065852) in the CYP2D6 gene (mutant TT allele – 27.50%).

Conclusion. The frequency of detection of different variants of CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 genes was established in children during of chemotherapy for ALL. The results obtained will form the basis for further studies to determine the association of CYP polymorphic variants with the formation of complications during the treatment of children with ALL.

Keywords: cytochrome P450, CYP polymorphism, children, acute lymphoblastic leukemia, complications

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) относится к группе клинически гетерогенных клональных злокачественных новообразований из лимфоидных клеток-предшественников, имеющих определенные генетические и иммунофенотипические характеристики. ОЛЛ является самой многочисленной подгруппой лейкозов у детей и составляет 70–80% от их общего числа [1]. Последние 30 лет ознаменовались значительными успехами в изучении и терапии ОЛЛ, особенно детского возраста. Модифицированные протоколы агрессивной полихимиотерапии (ПХТ) для лечения детского ОЛЛ позволили улучшить показатели выживаемости с 20–40% до 70–85%, что вывело заболевание из ряда фатальных. В настоящее время показатель долгосрочной (более 5 лет) выживаемости при ОЛЛ у детей в ведущих клиниках мира достигает 80–90% [2]. Однако негативной стороной ПХТ являются побочные эффекты противоопухолевых препаратов, обусловленные низкой селективностью действия большинства из них, что служит серьезным ограничением в достижении максимального лечебного действия. Практически все химиопрепараты, используемые в лечении ОЛЛ, обладают выраженной органной токсичностью, что значительно ухудшает качество жизни пациентов, приводит к удлинению вынужденных перерывов в лечении, нарушению основных принципов программной терапии, что чревато наличием остаточного лейкоэмического клона, увеличению количества рецидивов, ухудшению показателей бессобытийной выживаемости пациентов.

Дети с одинаковым типом опухоли и получающие одинаковое лечение могут проявлять разные клинические реакции с точки зрения эффективности и токсичности лекарственного средства, что предполагает наличие отдельных генетических факторов, влияющих на возникновение побочных эффектов. И дальнейшие исследования должны быть направлены на минимизацию токсичности и на получение персонализированного лечения в соответствии с индивидуальным риском токсичности, представленным каждым пациентом [3]. Поэтому представляется актуальным проведение исследований с целью выявления взаимосвязи между генетическим полиморфизмом и действием химиотерапевтических агентов. В этом отношении важны гены цитохрома P450, поскольку их продукты катализируют окислительный метаболизм многих химических веществ, в том числе лекарственных средств, например, участвуют в активации циклофосамида и метаболизме глюкокортикоидов и винкристина [3, 4]. Гены P450 кодируют группу высокополиморфных ферментов, которые играют критическую роль в метаболизме лекарств [5]. Известно, что именно члены семейств CYP1, CYP2 и CYP3 генов P450 ответственны за большую часть метаболического



клиренса примерно 75% всех лекарственных средств [6, 7]. Вариация в этих генах P450 может приводить к синтезу белков с измененной каталитической активностью, что проявляется высокой индивидуальной вариабельностью метаболизма лекарственных средств и фармакологических эффектов [5].

До настоящего времени роль полиморфизма генов цитохрома р450 в развитии токсических осложнений на фоне ПХТ при ОЛЛ не изучена. Выявление ассоциаций различных аллелей генов с развитием токсических осложнений на фоне ПХТ ОЛЛ позволит разработать прогностические критерии и подходы к персонализированному лечению, учитывающему биохимическую индивидуальность пациента.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ полиморфизмов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 у детей с токсическими осложнениями на фоне лечения ОЛЛ.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основную группу исследования включены 43 пациента с ОЛЛ в возрасте от 2 до 17 лет, медиана возраста 6,8 года. В распределении по гендерной принадлежности незначительное преобладание пациентов мужского пола – 24 мальчика (55,8%) и 19 девочек (44,2%). Критериями включения пациентов в исследование являлось наличие диагноза ОЛЛ, проведение ПХТ не менее 2 месяцев по поводу основного заболевания, отсутствие токсических осложнений, включая синдромальную патологию, до начала лечения.

Материалом исследования служила периферическая кровь и буккальный эпителий, полученный с использованием одноразовых универсальных стерильных зондов. Биологический материал у пациентов забирался после подписания информированного согласия законных представителей пациентов на участие в исследовании. Пробирки с кровью и соскобом эпителиальных клеток слизистой ротовой полости замораживали и оставляли для хранения при температуре -18°C . Выделение ДНК из крови проводили с использованием коммерческого набора реагентов NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel). Выделение ДНК из соскобов буккального эпителия проводили с применением набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь).

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6. Амплификацию ДНК проводили с применением специфических пар праймеров (табл. 1) и мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Республика Беларусь) на приборе QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific).

Программы амплификации, которые использовали в ходе исследований, представлены в табл. 2.

Для идентификации уровней амплификации специфических и неспецифических фрагментов проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов.

Таблица 1
Последовательности праймеров и ферменты для рестрикции фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6
Table 1
Primer sequences and restriction enzymes for CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 gene fragments

Ген	№ rs	Фермент	Последовательность праймера
CYP1A1	rs1048943	BsrDI	F-CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC
			R-TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC
	rs4646903	MspI	F-TAGGAGTCTTGTCATGCCT
			R-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT
CYP2E1	rs6413432	DraI	F-TCGTCTCCTGAAAGCAGG
			R-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA
	rs3813867	Pst I	F-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
	rs2031920	RsaI	F-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
CYP2D6	rs35742686	MspI	F-ATGAGCTGCTAACTGAGCCC
			R-CCGAGAGCATACTCGGGAC
	rs3892097	MvaI	F-TGCCGCTTCGCCAACCACT
			R-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC
	rs1065852	HphI	F-GTGCTGAGAGTGTCTGCC
			R-CACCCACCATCCATGTTTGC

Таблица 2
Программы амплификации фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6
Table 2
Amplification programs for CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 gene fragments

Ген	№ rs	Программа амплификации
CYP1A1	rs1048943	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 40 циклов: 95 °C – 40 с, 64 °C – 40 с, 72 °C – 40 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
	rs4646903	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 30 циклов: 95 °C – 60 с, 57 °C – 60 с, 72 °C – 90 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
CYP2E1	rs6413432	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 40 с, 60 °C – 40 с, 72 °C – 60 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
	rs3813867	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
	rs2031920	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
CYP2D6	rs35742686	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 40 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
	rs3892097	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 30 с, 62 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.
	rs1065852	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин.



Далее проводили рестрикцию амплифицированных фрагментов с использованием ферментов: BsrDI (New England BioLabs); MspI (Thermo Fisher Scientific); DraI (Thermo Fisher Scientific), PstI (Thermo Fisher Scientific), RsaI (New England BioLabs); MvaI (Thermo Fisher Scientific), HphI (New England BioLabs) (табл. 3). Анализ результатов рестрикции амплифицированных фрагментов проводили в 3%-ном агарозном геле методом электрофоретического анализа.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы Statistica 10. Вид распределения количественных переменных определяли с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. Так как распределение значений переменных было отличным от нормального, для их описания использовали медиану и квартили ($Me (Q_{25}/Q_{75})$). Для сравнения количественных показателей применяли критерий Манна – Уитни. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частоты выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Таблица 3

Длина продуктов амплификации, вариант генотипа и длина продуктов рестрикции фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6

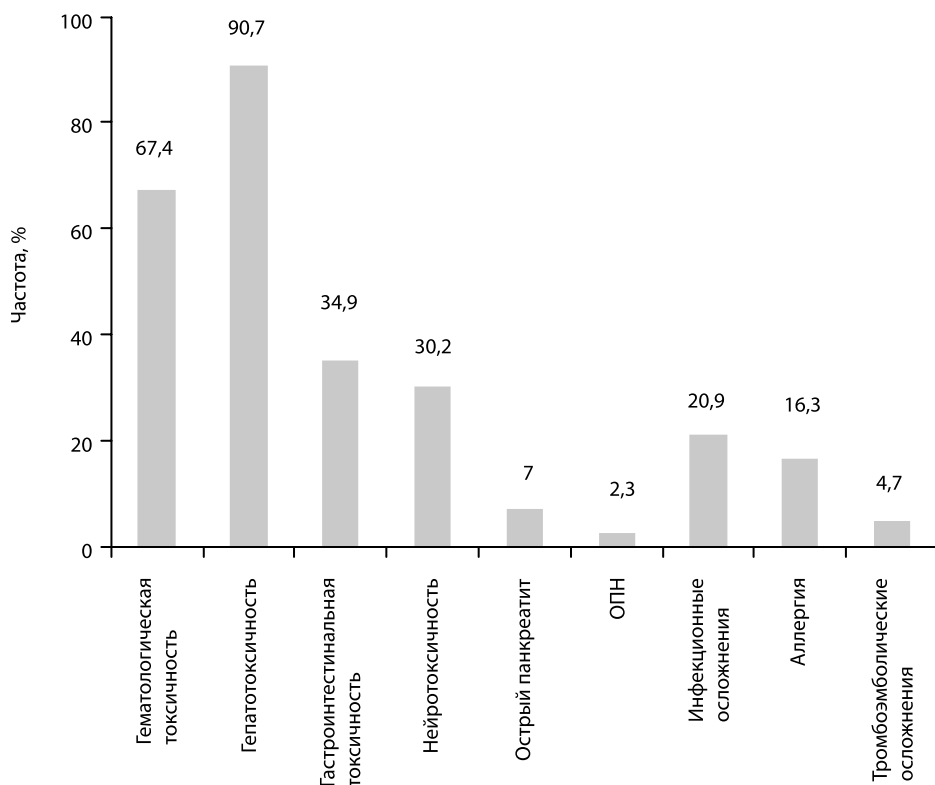
Table 3

Length of amplification products, genotype variant and length of restriction products of CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 gene fragments

Ген	Фермент	Длина продукта (п.о.)	Замена	Генотип – длина продуктов расщепления (п.о.)
CYP1A1	BsrDI	204	A2455G	Дикий тип (AA) – 150, 54
				Гетерозигота (AG) – 204, 150, 54
				Мутантный тип (GG) – 204
	MspI	340	T3801C	Дикий тип (TT) – 340
				Гетерозигота (TC) – 340, 200, 140
				Мутантный тип (CC) – 200, 140
CYP2E1	DraI	995	T7632A	Дикий тип (TT) – 571, 305, 121
				Гетерозигота (TA) – 876, 571, 305, 121
				Мутантный тип (AA) – 876, 121
	PstI	410	G1293C	Дикий тип (GG) – 410
				Гетерозигота (GC) – 410, 290, 120
				Мутантный тип (CC) – 290, 120
	RsaI	410	C1053T	Дикий тип (CC) – 360, 50
				Гетерозигота (CT) – 410, 360, 50
				Мутантный тип (TT) – 410
CYP2D6	MspI	270	A2549del	Дикий тип (AA) – 188, 82
				Гетерозигота (A/del) – 188, 168, 20
				Мутантный тип (del/del) – 168, 20
	MvaI	309	G1846A	Дикий тип (GG) – 201, 108
				Гетерозигота (GA) – 309, 201, 108
				Мутантный тип (AA) – 309
	HphI	330	C100T	Дикий тип (CC) – 282, 62
				Гетерозигота (CT) – 282, 182, 100
				Мутантный тип (TT) – 182, 100

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современные протоколы лечения ОЛЛ в детском возрасте состоят из 3 основных этапов (индукция ремиссии, консолидация ремиссии, длительная поддерживающая терапия ремиссии) и длятся 2–3 года. Основными препаратами, используемыми для терапии ОЛЛ, являются глюкокортикостероиды, антрациклины, винкристин, антимабоциты (меркаптопурин, метотрексат, цитарабин), алкилирующие агенты и аспарагиназа. Все пациенты, включенные в исследование, на момент обследования получали специфическую терапию по протоколу ALL-MB-2015 на базах государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» и гематологического отделения для детей государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека». Данный протокол подразумевает распределение пациентов на несколько терапевтических групп, разделенных на терапевтические подгруппы по категориям риска. В нашем исследовании пациенты имели ОЛЛ из В-клеток-предшественников и сформировали преимущественно терапевтические



Частота и клинично-лабораторные проявления основных осложнений у пациентов с ОЛЛ из В-клеток-предшественников на фоне специфической терапии
Frequency and clinical-laboratorial manifestations of the main complications in patients with ALL from B-progenitor cells against the background of specific therapy



группы А (41,8%) и В (30,2%). Терапевтическую группу С составили 9,3% пациентов, группу 1221 SR (стандартный риск) – 4,7%, группу 1221 IR (промежуточный риск) – 7%, группу D – 1% и группу F – 2,3% пациентов.

Оценка интенсивности побочного действия цитостатической терапии проводилась на этапах индукции и консолидации ремиссии с использованием шкалы оценки токсичности Common Toxicity Criteria (CTC) National Cancer Institute (NCI), version 5 (2017).

Различные по характеру осложнения были зарегистрированы у всех пациентов, их спектр и частота встречаемости представлены на рисунке.

Наиболее частым осложнением в исследуемой группе пациентов была гепатотоксичность, которая отмечалась в 90,7% случаев. Медиана показателя АлАТ составила 471,5 (63...2121) ЕД/л, АсАТ – 217,1 (52...1239) ЕД/л. При этом изменения уровня АлАТ, соответствующие I–II степени токсичности имели только 12,8% пациентов. У подавляющего количества пациентов с гепатотоксичностью на фоне антилейкемической терапии содержание АлАТ в сыворотке крови соответствовало III (51,3%) и IV (35,9%) степени токсичности (табл. 4). Уровень АсАТ I–II степени токсичности имели 53,8% пациентов, III и IV степени токсичности – 30,8% и 15,4% пациентов соответственно (табл. 4).

Гематологическая токсичность отмечалась у 67,4% пациентов, из них анемия (Hb 89,1 (69...98) г/л) регистрировалась в 48,8% случаев, нейтропения (нейтрофилы $0,41 (0...1,2) \times 10^9/\text{л}$) – в 55,8% случаев, тромбоцитопения (PLT 46,7 (18...66) $\times 10^9/\text{л}$) – в 30,2% случаев. Миелотоксичность в виде анемии и тромбоцитопении регистрировалась в основном в виде I–II степени токсичности. Для нейтропении у большинства пациентов были характерны проявления в виде токсичности III (24,1%) и IV (37,9%) степени (табл. 4).

Таблица 4
Профиль токсических осложнений у детей с острыми лимфобластными лейкозами на фоне химиотерапии
Table 4
Toxicity profiles during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia

Нежелательное явление и его частота в группе обследованных	Степени токсичности и частота встречаемости признака в группе осложнений		
	I–II	III	IV
Гематологическая токсичность, n=29 (67,4%)			
Анемия	19 (65,5%)	2 (6,9%)	–
Нейтропения	6 (20,7 %)	7 (24,1%)	11 (37,9%)
Тромбоцитопения	6 (20,7%)	5 (17,2%)	2 (6,9%)
Гепатотоксичность, n=39 (90,7%)			
Уровень АлАТ	5 (12,8%)	20 (51,3%)	14 (35,9%)
Уровень АсАТ	21 (53,8%)	12 (30,8%)	6 (15,4%)
Гастроинтестинальная токсичность, n=15 (34,9%)	11 (73,3%)	3 (20%)	1 (6,7%)
Нейротоксичность, n=13 (30,2%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
Инфекционные осложнения, n=9 (20,9%)	–	6 (66,7%)	3 (33,3%)
Аллергические реакции, n=7 (16,3%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	–

Проявления гастроинтестинальной токсичности имели 34,9% пациентов. Из них большинство (73,3%) имели тошноту, рвоту, диарею или запоры, потерю аппетита без значимого снижения массы тела, дегидратации или недостаточности питания, что соответствует I–II степени токсичности. Однако у 20% пациентов гастроинтестинальная токсичность соответствовала III степени и характеризовалась еще недостаточным потреблением калорий, необходимостью зондового и парентерального питания. У одного ребенка развилась перфоративная язва двенадцатиперстной кишки (табл. 4).

Проявления нейротоксичности I–II степени в виде нарушения моторики, невралгических болей, головной боли, головокружения, полинейропатии были зафиксированы у 9 пациентов, что составило 69,2% из всех детей, имеющих нейротоксичность на фоне антилейкемической терапии. Нейротоксичность III степени в виде энцефалопатии с экстрапиримидными расстройствами, судорогами, нарушением моторики и объективной слабостью со значительным влиянием на функцию имели 30,8% детей этой группы (табл. 4).

Инфекционные осложнения на фоне ПХТ развились у 20,9% пациентов. Из них в 66,7% случаев инфекционные осложнения соответствовали III степени и в 33,3% случаев IV степени токсичности (табл. 4). Инфекционные осложнения были представлены распространенной инфекцией мягких тканей промежности в 2 случаях, в 4 случаях была диагностирована полисегментарная пневмония, 3 пациента перенесли сепсис.

Аллергические реакции на фоне химиотерапии регистрировались у 7 (16,3%) пациентов и все связаны с введением аспарагиназы. Аллергические реакции I–II степени токсичности в виде кожной сыпи, крапивницы, подъема температуры тела выше 38 °C имели 71,4% пациентов этой группы. У 28,6% детей аллергические реакции характеризовались крапивницей, бронхоспазмом и лихорадкой, что соответствует III степени токсичности (табл. 4).

Тромбоэмболические осложнения, не связанные с катетеризацией вены, на фоне химиотерапии ОЛЛ имели 2 (4,7%) пациента.

В образцах крови и буккального эпителия исследуемой группы пациентов с применением метода ПЦР и рестрикционного анализа была поведена идентификация полиморфных вариантов гена CYP1A1 (A4889G и T6235C). Полученные результаты, характеризующие частоту выявления различных геновариантов, представлены в табл. 5.

Анализ результатов изучения частоты выявления полиморфизма A4889G (rs1048943) в гене CYP1A1 показал, что у обследованных пациентов доминирующим был аллель дикого типа – AA (93,02%, n=40), гетерозиготный (AG) и мутантный (GG) аллели были выявлены в 4,65% (n=2) и 2,33% (n=1) случаев соответственно. Среди обследованных пациентов распространенность полиморфизма T6235C (rs4646903) в гене CYP1A1 составила: TT (аллель дикого типа) – 72,09% (n=31) случаев, гетерозиготный аллель TC – 27,91% (n=12) случаев. Мутантный аллель CC в группе пациентов не был выявлен.

Для гена CYP2E1 было проведено выявление трех полиморфизмов: T7632A (rs6413432), G1293C (rs3813867) и C1053T (rs2031920). Характеристика частоты выявления различных геновариантов представлена в табл. 6.



Таблица 5

Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP1A1 у детей с острыми лимфобластными лейкозами

Table 5

Results of detection of polymorphic variants of the CYP1A1 gene in children with acute lymphoblastic leukemia

Ген	Генотип	Частота выявления	
		%	n
CYP1A1 (BsrDI) rs1048943 (n=43)	AA	93,02	40
	AG	4,65	2
	GG	2,33	1
CYP1A1 (MspI) rs4646903 (n=43)	TT	72,09	31
	TC	27,91	12
	CC	0	0

Таблица 6

Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2E1 у детей с острыми лимфобластными лейкозами

Table 6

Results of detection of polymorphic variants of the CYP2E1 gene in children with acute lymphoblastic leukemia

Ген	Генотип	Частота выявления	
		%	n
CYP2E1 (DraI) rs6413432 (n=43)	TT	90,70	39
	TA	9,30	4
	AA	0	0
CYP2E1 (Pst I) rs3813867 (n=43)	GG	100	43
	GC	0	0
	CC	0	0
CYP2E1 (RsaI) rs2031920 (n=43)	CC	93,02	40
	CT	6,98	3
	TT	0	0

У обследованных пациентов распространенность полиморфизма T7632A (rs6413432) составила: TT (аллель дикого типа) – 90,70% (n=39) случаев, гетерозиготный (аллель) TA – 9,30% (n=4) случаев. Мутантный аллель AA в анализируемой группе детей не был выявлен. Для полиморфизма G1293C (rs3813867) было установлено только присутствие дикого аллеля (GG) у обследованных пациентов (n=43). Доминирующим аллелем полиморфизма C1053T (rs2031920) был аллель дикого типа CC (93,02%, n=40), гетерозиготный вариант CT был выявлен в 6,98% (n=3) случаев. Мутантный аллель TT у обследованных детей с ОЛЛ выявлен не был.

В ходе исследований в гене CYP2D6 проводили определение трех полиморфизмов: A2549del (rs35742686), G1846A (rs3892097), C100T (rs1065852). Результаты, характеризующие частоту выявления различных геновариантов, представлены в табл. 7.

Анализ полученных результатов позволил установить, что среди обследованных пациентов преобладают носители аллеля дикого типа AA – 95,35% (n=41) случаев. Частота выявления гетерозиготного аллеля (A/del) составила 2,33% (n=1) случаев,

Таблица 7**Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2D6 у детей с острыми лимфобластными лейкозами****Table 7****Results of detection of polymorphic variants of the CYP2D6 gene in children with acute lymphoblastic leukemia**

Ген	Генотип	Частота выявления	
		%	n
CYP2D6 (MspI) rs35742686 (n=43)	AA	95,35	41
	A/del	2,33	1
	del/del	2,33	1
CYP2D6 (MvaI) rs3892097 (n=43)	GG	60,47	26
	GA	32,56	14
	AA	6,97	3
CYP2D6 (HphI) rs1065852 (n=40)	CC	52,50	21
	CT	20,00	8
	TT	27,50	11

мутантного аллеля (del/del) – 2,33% (n=1) случаев. Среди обследованных пациентов распространенность полиморфизма G1846A (rs3892097) в гене CYP2D6 составила: GG (аллель дикого типа) – 60,47% (n=26) случаев, гетерозиготный аллель GA – 32,56% (n=14) случаев, мутантный аллель AA – 6,97% (n=3).

В 3 образцах (6,98%) после проведения амплификации фрагмента гена CYP2D6 для идентификации полиморфизма C100T (rs1065852) не было выявлено специфических ампликонов ни при анализе кривых плавления, ни при электрофоретической детекции. При этом в данных пробах фрагменты других анализируемых генов (CYP1A1, CYP2E1), а также фрагменты гена CYP2D6 для идентификации полиморфизмов A2549del (rs35742686), G1846A (rs3892097) были успешно амплифицированы. Повторное выделение ДНК и амплификация данного фрагмента гена CYP2D6 подтвердили отсутствие специфических ампликонов в данных образцах (n=3), что может быть связано со сложной структурной организацией гена CYP2D6 и наличием межиндивидуальных особенностей структуры гена в области отжига подобранных пар праймеров. Таким образом, анализ полиморфизма C100T (rs1065852) в гене CYP2D6 проводили для 40 пациентов. Присутствие дикого аллеля (CC) определено у 52,50% (n=21) пациентов, гетерозиготного геноварианта CT – у 20,00% (n=8), мутантного аллеля TT – у 27,50% (n=11) обследованных пациентов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ профиля токсических осложнений у детей с острыми лимфобластными лейкозами из В-клеток-предшественников на фоне химиотерапии позволил определить частоту и клинико-лабораторные проявления основных осложнений с оценкой интенсивности побочного действия цитостатической терапии на основании шкалы CTC NCI, v. 5. Спектр нежелательных явлений, соответствующий III–IV степени токсичности, представлен гематологическими, гастроинтестинальными, печеночными и инфекционными осложнениями.



Частота выявления аллелей дикого типа была доминирующей для полиморфизмов: A4889G (rs1048943) в гене CYP1A1; T7632A (rs6413432), G1293C (rs3813867) и C1053T (rs2031920) в гене CYP2E1; A2549del (rs35742686) в гене CYP2D6, для данных геновариантов частота выявления составила от 90,70 до 100%.

Распространенность гетерозиготных геновариантов среди обследованных пациентов была выше для полиморфизма T6235C (rs4646903) в гене CYP1A1 (гетерозиготный аллель TC – 27,91% (n=12) случаев), а также для полиморфизма G1846A (rs3892097) в гене CYP2D6 (гетерозиготный аллель GA – 32,56% (n=14) случаев).

Максимальная частота выявления мутантного аллеля была установлена для полиморфизма C100T (rs1065852) в гене CYP2D6 (мутантный аллель TT – 27,50% (n=11) случаев).

Полученные результаты лягут в основу дальнейших исследований распространенности полиморфных вариантов генов CYP среди детей с ОЛЛ на фоне химиотерапии для определения их ассоциации с формированием осложнений в ходе лечения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Steliarova-Foucher E., Colombet M., Ries L.A.G. et al. (2017) International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Onco*, vol. 18, no 6, pp. 719–731.
2. Allemani C., Matsuda T., Di Carlo V. et al. (2018) Global surveillance of trends in cancer survival: analysis of individual records for 37,513,025 patients diagnosed with one of 18 cancers during 2000–2014 from 322 population-based registries in 71 countries (CONCORD-3). *Lancet*, vol. 391, no 10125, pp. 1023–1075.
3. Ocete Hita E., Urrutia-Maldonado E., Ales Palmer M.L. et al. (2016) Pharmacogenetics and Chemotherapy-Associated Hepatotoxicity in Children. *J of Pharmacol & Clin Res*, vol. 2, no 4, pp. 555–592.
4. Annalora A.J., Marcus C.B., Iversen P.L. (2017) Alternative Splicing in the Cytochrome P450 Superfamily Expands Protein Diversity to Augment Gene Function and Redirect Human Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos*, vol. 45, pp. 375–389.
5. Henderson L.M., Claw K.G., Woodahl E.L. et al. (2018) P450 Pharmacogenetics in Indigenous North American Populations. *J. Pers. Med*, vol. 8, no 9, pp. 1–33.
6. Zanger U.M., Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther*, vol. 2013, no 138, pp. 103–141.
7. Tabikhanova L.E., Osipova L.P., Churkina T.V. et al. (2018) Genetic polymorphism of CYP1A1 and CYP2D6 in populations of Buryats, Teleuts and Russians of Eastern Siberia. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, vol. 22, no 2, pp. 205–211. (in Russian)