



Ассоциация полиморфных вариантов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 с развитием токсических осложнений на фоне терапии острого лимфобластного лейкоза у детей

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

ВВЕДЕНИЕ

Пациенты 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. К перспективным для изучения факторам относят наличие полиморфизмов в генах цитохрома P450, кодирующих ферменты, которые принимают участие в метаболизме лекарственных средств

Целью исследования явилось изучение распространенности полиморфизмов в генах цитохрома P450 (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6) и анализ их ассоциации с вероятностью развития осложнений на фоне полихимиотерапии острых лимфобластных лейкозов у детей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В группу исследования включены 106 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) из В-клеток-предшественников в возрасте от 1 до 17 лет (медиана возраста 5,2 года), получавших специфическую терапию по протоколу ALL-MB 2015 на базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (г.Минск, РБ) и гематологического отделения для детей РНПЦ радиационной медицины и экологии человека (г.Гомель, РБ).

Критерии включения в исследование: наличие диагноза ОЛЛ; проведение ПХТ не менее 2 месяцев по поводу основного заболевания; отсутствие токсических осложнений, включая синдромальную патологию, до начала лечения

Выделение ДНК из крови проводили с использованием коммерческого набора реагентов «NucleoSpin Blood» («Macherey-Nagel»). 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, использовали для амплификации фрагментов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6; амплификацию ДНК проводили с применением специфических пар праймеров и мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», РБ) на приборе «QuantStudio™ 3» («Thermo Fisher Scientific»); для идентификации уровней амплификации специфических и неспецифических фрагментов проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов; далее проводили рестриктирование амплифицированных фрагментов и анализ результатов в 2% агарозном геле методом электрофоретического анализа

РЕЗУЛЬТАТЫ

При идентификации полиморфных вариантов гена CYP1A1 (A4889G и T6235C) и гена CYP2E1 (T7632A, G1293C и C1053T) установлено доминирование аллелей дикого типа. Анализ полиморфизма A2549del в гене CYP2D6 позволил установить преобладание носителей аллеля дикого типа AA (83,02%). Для полиморфизма G1846A в гене CYP2D6 определено преимущественное распространение дикого (59,18%) и гетерозиготного (30,19%) аллелей. В результате определения полиморфизма C100T в гене CYP2D6 установлена высокая частота присутствия гетерозиготного (25,51%) и мутантного TT (25,51%) аллелей.

При определении полиморфизма A2455G (rs1048943) в гене CYP1A1 установлена ассоциация мутантного аллеля GG с развитием токсической периферической полинейропатии 3-4 степени (ОШ=3,9; 95% ДИ (0,23 – 65,17); p=0,001). Гетерозиготный аллель CT в гене CYP1A1 (T3801C, rs4646903) ассоциирован с вероятностью развития токсических осложнений ЦНС 3-4 степени в 10 раз выше по сравнению с аллелем дикого типа (ОШ=10,7; 95% ДИ (0,91-125,23); p=0,0001). Мутантный аллель TT при определении полиморфизма C-1053T (rs2031920) в гене CYP2E1 связан с высоким риском аллергических реакций в виде бронхоспазма и анафилаксии на фоне полихимиотерапии ОЛЛ (ОШ=9,0; 95% ДИ (0,52-156,52); p=0,0001). Вероятность развития острого панкреатита у пациентов, имеющих гетерозиготный аллель A/del полиморфного варианта A2549del (rs35742686) в гене CYP2D6 в 6 раз выше по сравнению с пациентами, имеющими аллель дикого типа (ОШ=6,4; 95% ДИ (1,23-33,36); p=0,001). При анализе полиморфизма A2549del (rs35742686) в гене CYP2D6 установлено, что мутантный аллель del/del ассоциирован с вероятностью развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л в 17 раз выше, чем у пациентов с аллелем дикого типа (ОШ=17,3; 95% ДИ (2,06-145,66); p=0,0001).

Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP1A1 (A4889G и T6235C)

Ген	Генотип	Частота выявления	
		n=106	
		%	n
CYP1A1 (BsrDI) rs1048943	AA	94,33	100
	AG	3,77	4
	GG	1,89	2
CYP1A1 (MspI) rs4646903	TT	82,08	87
	TC	17,92	19
	CC	0,00	0

Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2E1

Ген	Генотип	Частота выявления	
		n=106	
		%	n
CYP2E1 (DraI) rs6413432	TT	87,74	93
	TA	12,26	13
	AA	0,00	0
CYP2E1 (Pst I) rs3813867	GG	95,28	101
	GC	4,72	5
	CC	0,00	0
CYP2E1 (RsaI) rs2031920	CC	92,45	98
	CT	5,66	6
	TT	1,89	2

Результаты выявления полиморфных вариантов гена CYP2D6

Ген	Генотип	Частота выявления	
		n=106	
		%	n
CYP2D6 (MspI) rs35742686	AA	83,02	88
	A/del	11,32	12
	del/del	5,66	6
CYP2D6 (MvaI) rs3892097	GG	64,15	68
	GA	30,19	32
	AA	5,66	6

Результаты выявления полиморфизма C100T (rs1065852) гена CYP2D6

Ген	Генотип	Частота выявления	
		n=98	
		%	n
CYP2D6 (HphI) rs1065852	CC	53,06	52
	CT	21,43	21
	TT	25,51	25

Выполнена балльная оценка показателей на основе анализа абсолютных рисков, что соответствует вкладу каждого из вариантов генотипа генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 при определении риска развития токсических осложнений. Согласно полученным значениям с помощью ROC-анализа для каждого из вариантов генотипа генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 были определены значения, позволяющие разделить пациентов с низкой и высокой вероятностью развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ.

Определено граничное значение суммы баллов для полученной модели риска: равное 4 для развития панкреатотоксических осложнений 3-4 степени; равное 6 для развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л (3-4 степень токсичности); равное 7 для развития аллергических осложнений 3-4 степени. При значении менее граничного значения устанавливается низкая вероятность развития токсических осложнений. При наличии суммарно количества баллов выше граничного значения устанавливается высокая вероятность развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ.

Чувствительность данной модели для риска развития панкреатотоксических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ составила 80,1%, специфичность – 89,7%, точность – 88,9%. Для риска развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л (3-4 степень токсичности) при лечении ОЛЛ чувствительность модели составила 78,1%, специфичность – 96,6%, точность – 92,1%. Для риска развития аллергических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ чувствительность данной модели составила 67,0%, специфичность – 72,4%, точность – 69,8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярно-генетических особенностей генов цитохрома P450 может заложить фундамент для разработки индивидуализированного подхода к профилактике и снижению частоты развития осложнений химиотерапии