

АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *GSTP1* И *ABCB1* У ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ САРКОМАМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И КОСТЕЙ

Ю.А. Хоченкова¹, Р.Н. Гейдаров², Е.Е. Фесенко³, А.В. Шварова¹, Н.М. Иванова¹, М.Е. Абрамов¹, Е.В. Степанова¹

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

² ФГБУ науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

³ Институт биофизики клетки РАН, г. Пушкино

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, токсичность, саркомы мягких тканей и костей

Цель работы. Исследована значимость однонуклеотидного полиморфизма генов *GSTP1* и *ABCB1* для эффективности и токсичности химиотерапии у детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей высокого риска.

Материалы и методы. В исследование включены 58 детей с саркомами мягких тканей и костей. Генотипирование *GSTP1* (105)Ple/(105)Val (rs1695) и *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) было проведено на ДНК, выделенной из мононуклеаров крови.

Результаты. Генотип *GSTP1* (105)Ple/(105)Val и *ABCB1* 3435C>T не коррелировал с частотой возникновения и степенью гематологической токсичности. Генотип GG *GSTP1* (105)Ple/(105)Val коррелировал с возникновением рецидивов заболевания и укороченной безрецидивной выживаемостью в отличие от больных с генотипом AA.

Заключение. Оценка *GSTP1* генотипа может иметь значение для выбора детей, которые имеют высокий шанс ответить на химиотерапию.

Введение

Частота встречаемости сарком мягких тканей (СМТ) составляет 6–8% от всех злокачественных образований детского возраста. За последние 5 лет в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН 14,3% от всех госпитализированных детей были пациенты с СМТ, из них 90% относились к группе неблагоприятного прогноза, 53% имели метастазы на момент диагностирования.

В настоящее время в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН разработан протокол «Лечение детей группы высокого риска со злокачественными опухолями мягких тканей туловища и конечностей». Общая схема протокола состоит из 3–6 альтернирующих курсов неoadъювантной терапии, в зависимости от непосредственной эффективности, этапа локального контроля первичного очага и метастазов, и адъювантного этапа лечения, в зависимости от степени полученного патоморфоза, состоящего из 6 курсов.

Однако использование химиотерапии осложнено возникновением системной токсичности, что часто снижает эффективность лечения, увеличивает ин-

валидность и снижает уровень жизни больных. Как показывают расчеты, лечение токсических осложнений химиотерапии составляет 34–86% от общей стоимости поддерживающего лечения онкологических больных [1]. Токсичность химиопрепаратов не может быть предсказана такими факторами, как почечная и печеночная функции, возраст больных, стиль жизни и др. Возможность предсказания такой токсичности до назначения лечения является актуальной не решенной проблемой клинической онкологии, имеет большое практическое значение и позволит улучшить эффективность лечения и качество жизни больных.

Генетические факторы являются важными детерминантами токсичности и эффективности противоопухолевой терапии. В геноме человека обнаружено более 30 семейств ферментов, участвующих в метаболизме лекарств [2, 3]. Для многих из них свойственна генетическая нестабильность, приводящая к различиям в белковых последовательностях транслируемых ими ферментов. Их полиморфизмы могут приводить к нарушениям экспрессии и регуляции генов, появлению белков с измененными функциональными свойствами.

На сегодняшний день разработка фармакогенетических маркеров для рутинного тестирования генетического профиля больных на основе анализа

Адрес для корреспонденции

Степанова Евгения Владиславовна
E-mail: e_stepanova@nm.ru

ДНК периферической крови является актуальной и до конца не решенной задачей. Известно несколько десятков генетических маркеров, ассоциированных с токсичностью противоопухолевой терапии. Среди перспективных маркеров называются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) генов *GSTP1*, *ABCB1*, *MTHFR*, *UGT1A1*, которые ассоциированы с токсичностью часто используемых химиопрепаратов (фторпиримидины, таксаны, алкилирующие агенты, иринотекан и антифолаты) [4, 5]. Так, ранее было установлено, что при лечении больных остеосаркомой комбинированной химиотерапией (доксорубицин, метотрексат и цисплатин) высокий риск миелосупрессии и кардиотоксичности ассоциирован с вариантным аллелем *GSTP1* 313A>G [5, 6]. В этой связи становится все более актуальной проблема поиска и изучения наиболее перспективных и информативных маркеров токсичности и эффективности химиотерапии и подбора оптимальных режимов введения лекарственных препаратов с учетом генетических особенностей пациентов.

Нами проведено пилотное исследование вклада однонуклеотидного полиморфизма генов *GSTP1* и *ABCB1* в токсичность химиотерапии у детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей высокого риска.

Материалы и методы

В исследование были включены 58 детей с диагностированными саркомами мягких тканей и костей, которые находились на лечении в отделении общей онкологии НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Средний возраст детей составил $10,6 \pm 4,6$ года (от 1 до 17 лет). У детей диагностированы различные агрессивные саркомы с неблагоприятным прогнозом течения болезни. 12 (20,7%) имели различные саркомы мягких тканей и 46 (79,3%) — костей. Для их лечения были использованы комбинированные режимы химиотерапии в высоких дозах: метотрексат, доксорубицин и цисплатин.

Для каждого больного были собраны основные демографические показатели, результаты клинко-лабораторных методов обследования, видов применявшегося лечения и токсичности химиотерапии.

Методика определения однонуклеотидных полиморфизмов генов

Материалом для исследования полиморфизмов генов *ABCB1* и *GSTP1* служила ДНК, полученная из лейкоцитов периферической крови больных с помощью набора для выделения и очистки нуклеиновых кислот QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия).

Оценку полиморфизмов генов в образцах проводили с помощью двух последовательных стадий мультиплексной ПЦР. Для первой стадии ПЦР

использовали следующие праймеры: для *GSTP1* — F: 5'-ATCCCCAGTGAAGTGTGTGTTGAT-3' и R: 5'-CTGCACCCTGACCCCAAGAAG-3', для *ABCB1* — F: 5'-TCAGCTGCTTGATGGCAAAGA-3', R: 5'-CCACATGCTCCCAGGCTGTTTATT-3' и R: 5'-TAGCACCTGACGCCTCGTTG-3'. Амплификацию проводили в следующих условиях: начальная денатурация при 95 °C (4 мин), 36 циклов амплификации (30 сек — денатурация при 95 °C, 30 сек — отжиг праймеров при 60 °C, 30 сек — элонгация при 72 °C), завершающий этап элонгации при 72 °C (5 мин). Во второй стадии ПЦР использовали следующие праймеры: для *GSTP1* — F: 5'-TCTATGGGAAGGACCAGCAGGAG-3' и R: 5'-TCAGCCCAAGCCACCTGA-3', для *ABCB1* — F: 5'-CAGGAGCCCATCCTGTTTGACT-3' и R: 5'-TAGGCAGTGAAGGCAT-3'. Реакцию проводили в температурно-временном режиме, аналогичном 1-й стадии.

Детекцию SNP генов *ABCB1* и *GSTP1* осуществляли с использованием микрочиповой технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Гибридизация на биологическом микрочипе проводилась с продуктами второй стадии ПЦР.

Анализ результатов гибридизации проводили с использованием универсального аппаратно-программного комплекса для анализа биологических микрочипов (ИМБ РАН).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «SPSS» (v13.0 for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ^2) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95% точности). Расчет выживаемости проводили методом Каплана–Мейера. Сравнение двух кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия.

Результаты и обсуждение

У 58 детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей, был изучен однонуклеотидный полиморфизм генов *GSTP1* (105)Ile/(105)Val и *ABCB1* 3435C>T.

Генотип AA гена *GSTP1* (105)Ile/(105)Val определяли примерно в 29,%, AG — 56,9%, а GG — в 13,8% изученных случаев. Частота встречаемости генотипов у больных саркомами мягких тканей и костей значимо не отличалась друг от друга (табл. 1).

При анализе распределения больных в зависимости от однонуклеотидной мутации в гене *ABCB1* 3435C>T показано, что гомозиготы CC в общей группе встречаются в 17,3%, TT — в 31,0%, а гетерозиготы CT — в 51,7% случаев. У больных

Таблица 1. Частота распространения SNP *GSTP1* (105)Ile/(105)Val и *ABCB1* 3435C>T у детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей

Генотип	Частота встречаемости, n (%)		
	в общей группе	саркомы мягких тканей	саркомы костей
<i>GSTP1</i> (105)Ile/(105)Val			
AA	17 (29,3)	6 (50,0)	11 (23,9)
AG	33 (56,9)	5 (41,7)	28 (60,9)
GG	8 (13,8)	1 (8,3)	7 (15,2)
<i>ABCB1</i> 3435C>T			
CC	10 (17,3)	6 (50,0)	4 (8,7)
CT	30 (51,7)	5 (41,7)	25 (54,3)
TT	18 (31,0)	1 (8,3)	17 (36,9)

СМТ нормальный генотип CC встречался чаще (в 50% случаев), а мутантный TT реже (в 8,3%), чем у больных саркомами костей (в 8,7 и 36,9% случаев соответственно).

Генотип *GSTP1* (105)Ile/(105)Val и *ABCB1* 3435C>T не коррелировал с частотой возникновения и степенью гематологической токсичности (табл. 2).

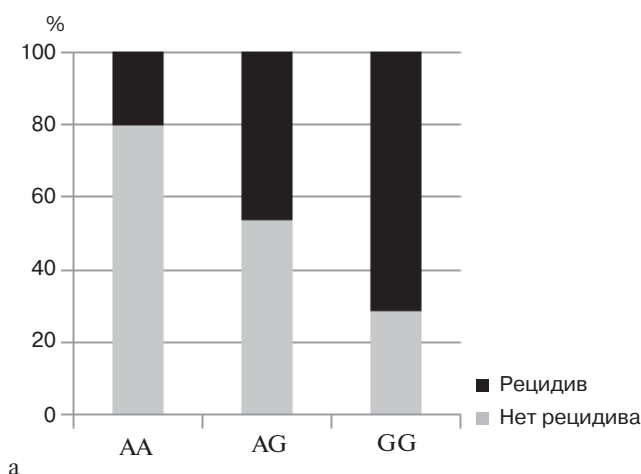
На момент проведения анализа рецидивы заболевания появились у 5 (18,5%) больных. Рецидив болезни наблюдали у 20,0% детей с AA генотипом

GSTP1 (105)Ile/(105)Val, 20,0% — с генотипом AG и в 60,0% случаев — GG. В то время у группы больных без рецидивов частота AA генотипа составила 18,2%, AG — 77,3% и GG — 4,5%. Обнаружена тенденция, что больные с мутантным гомозиготным генотипом GG имеют укороченную безрецидивную выживаемость в отличие от больных с генотипом AA (см. рисунок). У таких детей рецидивы возникают в более ранние сроки.

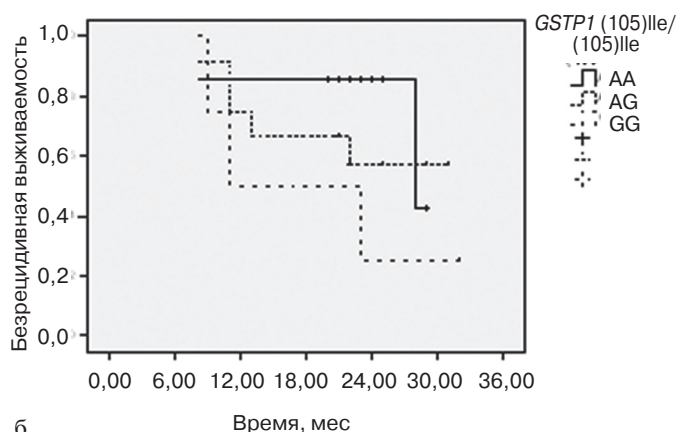
Полученные данные позволили провести первичный отбор маркеров, предсказывающих эф-

Таблица 2. SNP *GSTP1* (105)Ile/(105)Val и *ABCB1* 3435C>T и гематологическая токсичность химиотерапии у детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей

Генотип	Частота встречаемости в зависимости от степени токсичности, n (%)			
	общая группа	0–II	III–IV	IV
<i>GSTP1</i> (105)Ile/(105)Val				
AA	17 (29,3)	5 (31,3)	8 (40,0)	2 (28,6)
AG	33 (56,9)	10 (62,5)	10 (50,0)	3 (42,8)
GG	8 (13,8)	1 (6,2)	2 (10,0)	2 (28,6)
<i>ABCB1</i> 3435C>T				
CC	10 (17,3)	3 (18,7)	4 (20,0)	1 (14,3)
CT	30 (51,7)	9 (56,3)	8 (40,0)	4 (57,1)
TT	18 (31,0)	4 (25,0)	8 (40,0)	2 (28,6)



а



б

Рисунок. Частота рецидивов (а) и безрецидивная выживаемость (б) больных в зависимости от полиморфизма гена *GSTP1* (105)Ile/(105)Val

фективность химиотерапии у детей, страдающих саркомами мягких тканей и костей. В настоящее время начато более подробное изучение данных маркеров для подтверждения их клинической информативности и значимости.

В нашем пилотном исследовании не было обнаружено корреляций между полиморфизмом исследованных генов и токсичностью терапии. Возможно, из-за того что дети получали максимальные дозы лекарств, система детоксикации не справлялась с выведением лекарств из организма. Нами найдено лишь несколько публикаций по поиску маркеров, предсказывающих эффективность и токсичность химиотерапии у детей. Наши работы в данном направлении будут продолжены.

Внедрение фармакогенетических методов в клиническую практику до сих пор лимитировано из-за отсутствия рекомендаций по выбору препаратов и точной оценки риска возникновения токсичности. Проведение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН приоритетных исследований в области поиска и оценки клинической информативности генетических маркеров, предсказывающих токсичность различных режимов химиотерапии, позволит улучшить качество лечения больных и снизить стоимость поддерживающего лечения.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт № 16.512.11.2042).

ЛИТЕРАТУРА

1. Calhoun E.A., Chang C.H., Welshman E.E. et al. Evaluating the total costs of chemotherapy-induced toxicity: results from a pilot study with ovarian cancer patients. *Oncologist*. 2001, No. 6, p. 441-445.
2. Evans W.E., Relling M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999, No. 286, p. 487-491.
3. Evans W.E., Johnson J.A. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001, No. 2, p. 9-39.
4. Dervieux T., Meshkin B., Neri B. Pharmacogenetic testing: proofs of principle and pharmacoeconomic implications. *Mutat. Res.* 2005, v. 573, p. 180-194.
5. Sarasqueta A., van Lijnschoten G., Lemmens V.E., Rutten H.J., van den Brule A.J. Pharmacogenetics of oxaliplatin as adjuvant treatment in colon carcinoma: are single nucleotide polymorphisms in *GSTP1*, *ERCC1*, and *ERCC2* good predictive markers? *Mol. Diagn. Ther.* 2011, v. 15, p. 277-283.
6. Watson M.A., Stewart R.K., Smith G.B., Massey T.E., Bell D.A. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998, v. 19, p. 275-280.

Статья поступила 02.12.2012 г., принята к печати 10.01.2013 г.
Рекомендована к публикации Е.А. Сушенцовым

ANALYSIS OF *GSTP1* AND *ABCB1* SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH SOFT TISSUE AND BONE SARCOMAS

Khochenkova Yu.A.¹, Geidarov R.N.², Fesenko E.E.³, Shvarova A.V.¹, Ivanova N.M.¹, Abramov M.E.¹, Stepanova E.V.¹

¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» RAMS, Moscow, Russian Federation

² FSBI science Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences Moscow, Russian Federation

³ Institute of cell Biophysics RAS

Key words: single-nucleotide polymorphism, toxicity, soft tissue and bone sarcomas

Background. We analyzed the relationship between *GSTP1* и *ABCB1* single-nucleotide polymorphism and chemotherapy efficacy and toxicity in children with soft tissue and bone sarcomas.

Methods. The study 58 children with high risks soft tissue and bone sarcomas included to the study. Genotyping of *GSTP1* (105)Ile/(105)Val (rs1695) and *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) were performed by genomic DNA extracted from blood mononuclear cells.

Results. *GSTP1* (105)Ile/(105)Val and *ABCB1* 3435C>T genotypes had no association with frequency or grade hematological toxicity. Patients with *GSTP1* (105)Ile/(105)Val GG genotype had a greater risk of the disease recurrence and shorter diseasefree survival in comparison with AA genotype patients.

Conclusion. Assessment of *GSTP1* genotype may be important in selecting children suitable for chemotherapy.