

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАЦИЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* И *ABCB1*, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2017 г. С.В. Титов, Р.Н. Гейдаров, М.Е. Абрамов,
Э.Н. Тимофеев, В.М. Михайлович

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: v.mikhailovich@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.16 г.

Индивидуальный подход при лечении онкологических больных, учитывающий генетические особенности метаболизма пациента, позволяет подобрать адекватный препарат и его дозу, что повышает эффективность терапии и предотвращает развитие побочных токсических эффектов. С этой целью разработан метод на основе биологического микрочипа для изучения первичной структуры ДНК пациентов и идентификации полиморфизмов в генах *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* и *ABCB1*, ассоциированных с изменением метаболизма ксенобиотиков. На разработанном микрочипе проведено генотипирование образцов, полученных от 89 онкологических пациентов и 15 здоровых доноров. Результаты определения первичной структуры образцов ДНК полностью совпали с контрольным секвенированием. Для повышения специфичности определения полиморфных вариантов гена *UGT1A1* были применены гибридные зонды, содержащие LNA-нуклеотиды. Частоты встречаемости полиморфных аллельных вариантов генов *UGT1A1*28*, *DPYD*2A*, *GSTP1* (I105V) и *ABCB1* (C3435T) в изученной выборке составили 0,39; 0; 0,33 и 0,57 соответственно.

Ключевые слова: генотипирование, микрочип, химиотерапия, фармакогенетика, токсичность.

Известно, что изменение первичной структуры в генах, задействованных в биодegradации лекарственных средств, или генетический полиморфизм, способно приводить к изменению выведения ксенобиотиков из организма. Замедление метаболизма лекарственных препаратов приводит к неконтролируемому повышению концентрации активного вещества и способно вызвать тяжелую интоксикацию у пациента вплоть до летального исхода. В случае противоопухолевой терапии изменение фармакокинетики препаратов из группы цитостатиков может оказаться критическим, так как они обладают достаточно узким терапевтическим индексом и применяются в максимально допустимых концентрациях, по токсичности намного превосходят средства, применяемые в других областях медицины, и не обладают необходимым дифференцирующим действием (специфичностью) в отношении здоровых и пораженных клеток. Если располагать информацией о наличии у

больного генетически обусловленной проблемы с детоксикацией конкретных лекарственных препаратов, режим проведения химиотерапии, включающий выбор препарата, его дозу и схему применения, может быть скорректирован. Подобная коррекция позволит минимизировать или полностью избежать побочных эффектов, возникающие при использовании препарата, и спрогнозировать эффективность его применения в каждом конкретном случае.

В настоящей работе были проанализированы первичные структуры участков генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, *ABCB1*, оказывающих влияние на метаболизм противоопухолевых препаратов, и разработан биологический микрочип для регистрации этих изменений.

Ген *UGT1A1* кодирует уридиндифосфатглюкуронилтрансферазу (UGT), входящую в семейство ферментов, ответственных за глюкуронирование ряда субстратов. Конъюгация с глюкуроновой кислотой позволяет перевести ксенобиотики и эндогенные соединения в водорастворимую форму с последующим элиминированием печенью и почками [1]. В настоящее время описано множество различных вариантов изменения первичной структуры гена *UGT1A1*. Применительно к химиотерапии наиболее зна-

Сокращения: *ABCB1* – член 1 подсемейства В АТФ-связывающей кассеты, UGT – уридиндифосфатглюкуронилтрансфераза, ТА – тимин-аденин, *DPYD* – дигидропириимидиндегидрогеназа, GST – глутатион-S-трансфераза, LNA – замкнутая нуклеиновая кислота.

чимым является аллельный вариант *UGT1A1*28*. У носителей этого аллеля вместо шести тимин-адениновых (ТА) повторов в промотерной области гена присутствует дополнительная вставка двух нуклеотидов ТА, которая препятствует связыванию с промотером фактора транскрипции TFIIID и, как следствие, ведет к снижению экспрессии гена (до 70%) в сравнении с нормальным вариантом *UGT1A1*1* [2,3]. Установлено, что наличие ТА-вставок в структуре обеих хромосом (гомозиготный генотип *28/*28 (ТА7/ТА7)) приводит к возникновению побочных эффектов при терапии иринотеканом (нейтропения и диарея) [4–6].

Дигидропиримидиндегидрогеназа (DPYD) – начальный и скоростьлимитирующий фермент трехэтапного пути катаболизма урацила и тимидина. Белок отвечает за деградацию фторпиримидинов, таких как 5-фторурацил [7], капецитабин [8] и тегафур [9]. Понижение активности дегидрогеназы ассоциировано с более чем четырехкратным повышением риска возникновения острой или летальной токсичности при назначении стандартных доз 5-фторурацила [10]. Одним из наиболее изученных изменений первичной структуры данного гена является аллельный вариант *DPYD*2A* – однонуклеотидная замена (G→A) в донорном сайте сплайсинга, приводящая к пропуску 14-го экзона, фрагмента, кодирующего аминокислотные остатки 581–635 белка DPYD [11–13]. Наличие такого изменения в гомозиготном варианте приводит к полному отсутствию активности фермента [10].

Глутатион-S-трансферазы (GST) отвечают за детоксикацию широкого спектра лекарственных препаратов путем конъюгации с глутатионом. Известны два наиболее распространенных аллельных варианта *GSTP1*, которые приводят к аминокислотным заменам в активном центре фермента [14]. Однонуклеотидная замена A→G в 313 позиции гена *GSTP1* приводит к замене Ile на Val, что ассоциировано с пониженной ферментативной активностью, повышенной устойчивостью к противоопухолевым препаратам и увеличенной токсичностью [15–17]. У больных колоректальным раком, имеющих такое изменение и получавших оксалиплатин, отмечено снижение выживаемости и увеличение риска прогрессирования заболевания [16]. Установлена связь замены Ile на Val (поз. 105) с повышенным риском нейтропении при лечении оксалиплатином и фторурацилом [18]. При лечении рака груди эпилрубуцином также рекомендуется учитывать наличие мутации 313A→G [19].

Ген *ABCB1* кодирует Р-гликопротеин, принадлежащий группе АТР-связывающих транспортных белков, которая насчитывает 48 членов, входящих в состав семи семейств. Физиологическая роль транспортных белков заключается в защитной функции по выведению токсических веществ в желчь, мочу, желудочно-кишечный тракт, в участии в образовании гематоэнцефалического барьера, а также регуляции фармакокинетики многих лекарственных средств, включая цитостатики [20,21]. Наиболее значимым с клинической точки зрения полиморфизмом гена *ABCB1* считается замена С→Т в позиции 3435. При этом структура Р-гликопротеина не меняется, но снижается экспрессия гена *ABCB1*, по-видимому, за счет снижения стабильности, нарушения процессинга или трансляции мРНК [22].

Изучение первичной структуры описанных генов и разработка новых диагностических инструментов многопараметрического анализа для идентификации клинически значимых полиморфизмов, ассоциированных с изменением метаболизма противоопухолевых препаратов, является задачей актуальной и востребованной. Решение этой задачи будет способствовать увеличению выживаемости и качества жизни пациентов, позволит снизить время нахождения больных в стационаре и сократит расходы на лечение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. Образцы были получены от 15 здоровых доноров и 89 онкологических больных, которым проводили химиотерапию в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации с сентября 2009 г. по декабрь 2010 г. Все пациенты и здоровые доноры являлись жителями Европейской части России и представлены преимущественно популяцией восточных славян. Материал для исследования был собран с соблюдением процедуры информированного согласия. Образцы ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови либо из цельной крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, США).

Синтез олигонуклеотидов и изготовление микрочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации и праймеры для амплификации были синтезированы на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, США). Зонды для гибридизации содержали спейсер со свободной аминогруппой «3'-Amino-Modifier C7 CPG 500» (Glen Research, США) для последующей сополимеризации с компо-

нентами гидрогеля. Олигонуклеотиды были разработаны с помощью программного обеспечения «Oligo 6» («Molecular Biology Insights») и «Bioedit» (Т. Hall, URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>).

Биологические микрочипы были изготовлены согласно процедуре, подробно описанной ранее [23].

Аmplификация образцов ДНК и гибридизация. Подготовку образцов для гибридизации на микрочипе осуществляли путем проведения двух стадий гнездовой мультиплексной полимеразной цепной реакции. На первой стадии в состав реакционной смеси (30 мкл) входили 70 мМ трис-НСl, рН 8,6, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дезоксидинтрифосфат вместо дезокситимидин-5'-трифосфата, «Силекс», Россия), 5 Ед. Таq-ДНК-полимеразы («Силекс», Россия), 0,5 Ед. урацил-ДНК-гликозилазы («Силекс», Россия), смесь праймеров для первой стадии (0,5 мкМ каждого), содержащая *UGT* – 5'-TCC CTG CTA CCT TTG TGG ACT GAC AGC TT и 5'-CAA CGA GGC GTC AGG TGC TA; *ABCV* – 5'-TCA GCT GCT TGA TGG CAA AGA и 5'-CCA CAT GCT CCC AGG CTG TTT ATT; *GSTP* – 5'-ATC CCC AGT GAC TGT GTG TTG AT и 5'-CTG CAC CCT GAC CCA AGA AG; *DPYD* – 5'-CCC TGG ACA AAG CTC CTT TCT GAA и 5'-CAT CAG CAA AGC AAC TGG CAG ATT, а также матрица в количестве не менее 10 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на термоциклере DYAD 220 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, США). Реакционную смесь инкубировали при 94°C в течение 8 мин, затем выполняли 36 циклов со следующим температурно-временным режимом: 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с. Конечную инкубацию выполняли 5 мин при 72°C.

На второй стадии в состав реакционной смеси входили 70 мМ трис-НСl, рН 8,6, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дезоксидинтрифосфат вместо дезокситимидин-5'-трифосфата, «Силекс», Россия), 6,6 мкМ дезоксиридинтрифосфата, меченного Су5 («Биочип-ИМБ», Россия), 5 Ед. Таq-ДНК-полимеразы («Силекс», Россия), смесь праймеров для второй стадии, содержащая *UGT* – 5'-ACA GTC AAA CAT TAA CTT GGT GTA TCG и TTT GCT CCT GCC AGA GGT TCG; *ABCV* 5'-CAG GAG CCC ATC CTG TTT GAC T и TAG GCA GTG ACT CGA TGA AGG CAT; *GSTP* 5'-TCT ATG GGA AGG ACC AGC AGG AG

и TCA GCC CAA GCC ACC TGA; *DPYD* – 5'-TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT A и CAT TCA CCA ACT TAT GCC AAT TCT C. Концентрация прямых праймеров, указанных в паре первыми, составляла 33 нМ каждого, обратных – 330 нМ. В качестве матрицы использовали 1 мкл ПЦР-продукта, полученного на первой стадии. Реакцию проводили при следующих температурно-временных условиях: 94°C – 3 мин; 36 циклов: 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с; финальная инкубация: 72°C – 5 мин.

В результате после второй стадии получали преимущественно одноцепочечные флуоресцентно меченные фрагменты генов *UGT1A1*, *ABCV1*, *GSTP1* и *DPYD*.

Гибридизацию проводили путем добавления 12 мкл продукта амплификации второй стадии к 24 мкл буфера, содержащего 1,5 М гуанидина тиоцианата, 0,075 М HEPES, рН 7,5, и 7,5 мМ ЭДТА. Смесь заливали в гибридизационную камеру биочипа и инкубировали в течение 6 ч при 37°C. После гибридизации микрочип промывали дистиллированной водой дважды в течение 30 с при 37°C и высушивали.

Регистрация изображения. Регистрацию результатов гибридизации осуществляли на аппаратно-программном комплексе «Чипдетектор» («Биочип-ИМБ», Россия). Интерпретацию результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Imageware», входящего в состав комплекса.

Секвенирование. Достоверность определения генотипов для каждого случая полиморфизма была подтверждена секвенированием на автоматическом секвенаторе ABI Prism Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа первичной структуры вариантов генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, *ABCV1* методом гибридизации на биочипе была разработана мультиплексная двухстадийная полимеразная цепная реакция, позволяющая одновременно амплифицировать анализируемые мишени. Последовательности праймеров для обеих стадий были разработаны нами ранее [24].

Для иммобилизации на биологическом микрочипе были разработаны аминированные по 3'-концу олигонуклеотидные зонды. Список разработанных зондов приведен в табл. 1.

Определение различного числа ТА-повторов в гене *UGT1A1* представляло собой более сложную задачу по сравнению с определением точечного нуклеотидного полиморфизма в ге-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на микрочипе

Ген	Название зонда	Нуклеотидная последовательность зонда 5'-3'
<i>UGT1A1</i>	TA5	+G+CCATATAT+A+TATATA+A+G
<i>UGT1A1</i>	TA6	+G+CCATATAT +A+TATATATA+A+G
<i>UGT1A1</i>	TA7	+G+CCATATATAT+A+TATATATA+A+G
<i>UGT1A1</i>	TA8	+G+CCATATATAT+A+TATATATATA+A+G
<i>ABCB1</i>	AB-C	GAAGAGATCGTGAGGGC
<i>ABCB1</i>	AB-T	GGAAGAGATTGTGAGGGC
<i>GSTP1</i>	GS-A	CTGCAAATACATCTCCCTCAT
<i>GSTP1</i>	GS-G	TGCAAATACGTCTCCCTCA
<i>DPYD</i>	DP-G	CCAGACAACGTAAGTGTGA
<i>DPYD</i>	DP-A	CCAGACAACATAAGTGTGA

Примечание. Знак «+» перед нуклеотидом означает, что данный нуклеотид является LNA-модифицированным.

нах *ABCB1*, *GSTP1*, *DPYD*. По этой причине нами были ранее сконструированы и протестированы модифицированные зонды, содержащие LNA-нуклеотиды [25]. LNA-нуклеотиды (locked nucleic acid) представляют собой синтетические аналоги нуклеиновых кислот, в которых дезоксирибозное кольцо зафиксировано в 3'-эндо-конформации с помощью метиленового мостика, связывающего атом кислорода в положении 2' и 4'-С-положение рибозного цикла. Выбор положения LNA-нуклеозидов в последовательности дискриминирующего зонда осуществляли эмпирическим путем.

Был разработан биологический микрочип для идентификации аллельных вариантов генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, *ABCB1*. Микрочип представляет из себя матрицу из десяти полусферических гелевых ячеек, расположенных на подложке. В ячейках ковалентно иммобилизованы олигонуклеотидные зонды (см. табл. 1).

Схема расположения ячеек с соответствующими зондами на микрочипе представлена на рис. 1а.

Принцип анализа на биологическом микрочипе основывается на разнице в интенсивности сигналов от совершенных и несовершенных дуплексов, образуемых между флуоресцентно меченным продуктом амплификации целевого фрагмента гена и олигонуклеотидным зондом, иммобилизованным в ячейке микрочипа. В верхнем ряду микрочипа (см. рис. 1) расположены зонды для определения количества ТА-повторов в гене *UGT1A1* (ТА5-ТА8). Ниже попарно расположены зонды для определения мутаций в первичной структуре генов *ABCB1*, *GSTP1*, и *DPYD* (второй-четвертый ряды сверху соответственно). В паре идентифицирующих зондов слева расположенный зонд был комплементарен нормальной (не измененной) структуре гена. Справа расположили зонд, детектирующий мутацию, или полиморфный аллель

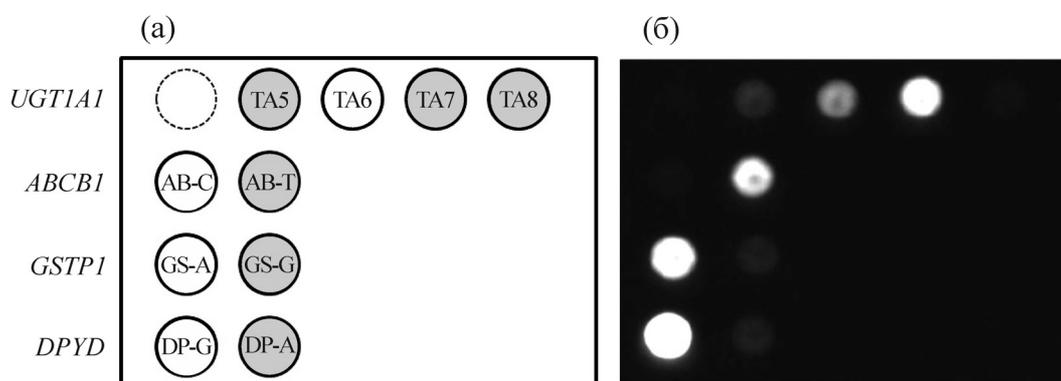


Рис. 1. Схема расположения зондов на микрочипе (а) и пример гибридизационной картины образца ДНК, содержащей полиморфизмы *ABCB1*(Т) и *UGT1A1*(Т7/Т7) (б). Зонды, комплементарные нормальной первичной структуре гена (дикому варианту аллеля), на схеме обозначены ячейками светлого фона; зонды к измененной структуре гена (мутантный вариант) обозначены ячейками серого фона. Левая верхняя ячейка не содержит зонд и служит контролем флуоресцентного фона.

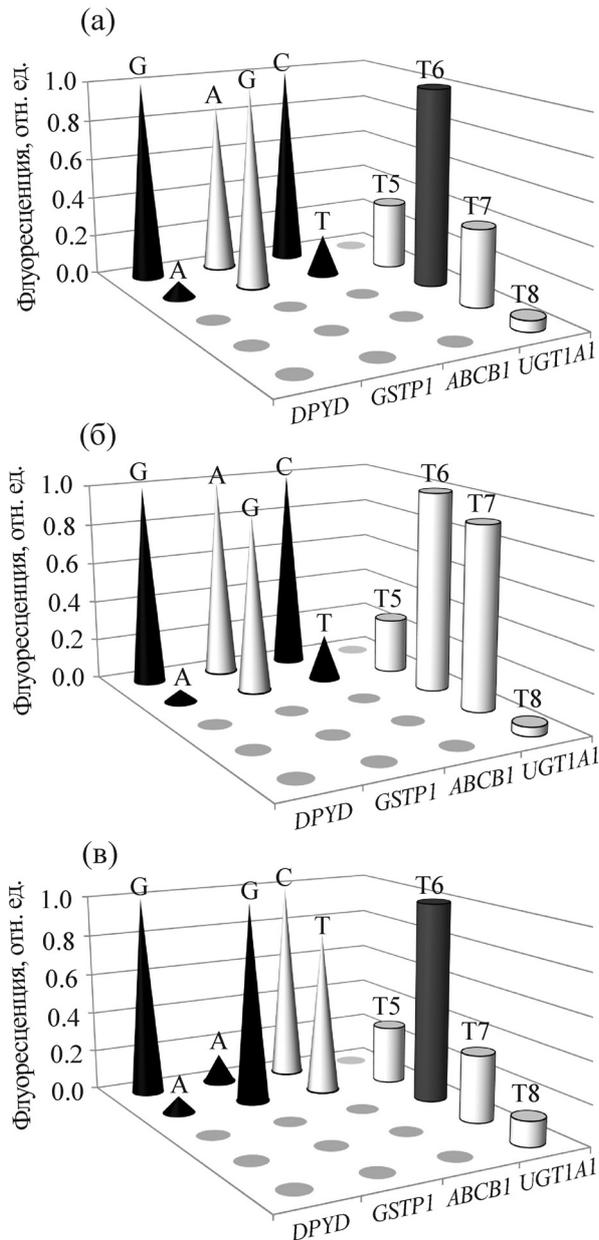


Рис. 2. Гистограммы определения первичной структуры участков генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, *ABCB1* методом гибридизации на биочипе. Конусами обозначены нормализованные сигналы при определении соответствующих однонуклеотидных замен. Темным цветом обозначены гомозиготные варианты, светлым – гетерозиготные. Цилиндрические столбцы отражают сигналы зондов для определения количества ТА-повторов в гене *UGT1A1*. В норме сигнал зонда Т6 не менее чем в два раза превышает таковые от зондов Т5, Т7 и Т8 (а) и (в)), в гетерозиготном состоянии (Т6/Т7) соответствующие сигналы возрастают (б).

(ячейки обозначены серым цветом). Если флуоресцентный сигнал, соответствующий дикому типу, превышает значение такового, соответствующего релевантной мутации, более чем в два

раза, делали заключение о наличии гомозиготного варианта по анализируемому аллелю. В противном случае гаплотип определяли как гетерозиготный. Двухкратное значение порога было определено экспериментально путем сравнения полученных результатов гибридизационного анализа с контрольным секвенированием. Чтобы убедиться, что выбранный порог отвечает требованиям специфичности (способности точно и однозначно дифференцировать полиморфизм), каждый испытуемый образец ДНК подвергся гибридизации в пяти повторах.

На рис. 2 представлены примеры гистограмм определения первичной структуры участков генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, *ABCB1* методом гибридизации на биочипе. В анализируемых участках генов *DPYD*, *GSTP1*, *ABCB1* идентифицировали однонуклеотидный полиморфизм. Определяемые нуклеотиды указаны над конусами гистограммы. В гомозиготном варианте (темные пары конусов) сигнал от совершенного дуплекса в каждом случае превышал таковой, полученный от несовершенного, в два и более раз (см. пример на рис 2а для генов *DPYD* (G) и *ABCB1* (C)). В случае гетерозиготного варианта (светлые пары конусов) – сигналы увеличивались, а разница их значений уменьшалась (пример на рис. 2а,б, зонды к участку гена *GSTP1*). По схожей схеме идентифицировали количество ТА-повторов в участке гена *ABCB1*. Примеры гомозиготного аллельного варианта (Т6/Т6) представлены на рис. 2а,в, пример гетерозиготного варианта (Т6/Т7) представлен на рис. 2б. Максимальный сигнал из каждой группы сравниваемых зондов нормализовали к единице.

С помощью разработанного биологического микрочипа был проведен анализ 104 образцов ДНК, полученных от 15 здоровых доноров и 89 онкологических больных.

Количество выявленных изменений в первичной структуре генов (аллельных вариантов) приведено в табл. 2. Результаты генотипирования на микрочипе полностью соответствовали результатам секвенирования.

Указанные в таблице частоты не разделены по группам «больные» и «здоровые», поскольку определяемые полиморфизмы не являются маркерами возникновения заболевания, а служат характеристической величиной для популяции в целом.

Из-за небольшого размера изученной выборки и в ряде случаев отсутствия необходимых клинико-анамнестических данных достоверной корреляции между наличием у больных анализируемых полиморфизмов и возникновением

Таблица 2. Аллельные варианты генов, идентифицированные при изучении 104 образцов ДНК методом гибридизации на биочипе

Ген	Гомозигота по дикому типу (норма)	Гомозигота по мутантному типу	Гетерозигота
<i>UGT1A1</i>	ТА6/ТА6 45	ТА7/ТА7 21	ТА6/ТА7 38
<i>ABCB1</i>	С/С 22	Т/Т 36	С/Т 46
<i>GSTP1</i>	А/А 49	Г/Г 14	А/Г 41
<i>DPYD</i>	Г/Г 104	А/А 0	Г/А 0

токсического эффекта от применения противоопухолевых препаратов обнаружить не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительное определение генотипа пациента перед назначением курса химиотерапии тем или иным препаратом находит все более широкое применение в клинической практике и позволяет вплотную подойти к так называемой персонализированной медицине. Во многих странах при лечении некоторыми препаратами генотипирование является желательной, а в некоторых случаях – строго рекомендованной процедурой. К примеру, генетическое тестирование на наличие мутантных аллелей генов *UGT1A1* и *DPYD* перед назначением соответственно иринотекана и фторпиримидинов рекомендовано Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA). По этой причине разработка современных методов определения первичной структуры полиморфных генов и молекулярной идентификации ряда клинически значимых полиморфизмов наряду с внедрением их в рутинную практику онкологических центров является, безусловно, важной и актуальной задачей.

К настоящему времени предложены несколько методов определения аллельных вариантов генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* и *ABCB1*, отличающихся по своим характеристикам (воспроизводимость, цена, чувствительность, специфичность, время анализа и т.д.). К ним относятся секвенирование, анализ длины рестрикционных фрагментов, коммерчески доступный Invader[®]-тест, SMART-амплификация, анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью, TaqMan ПЦР [26–31].

В настоящей работе предложен способ одновременного определения первичной структуры для идентификации аллельных вариантов генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* и *ABCB1* на биологическом микрочипе. Разработанный метод основывается на гибридизационном анализе, выполняемом на диагностических гидрогелевых микрочипах. Существенным преимуще-

ством метода в сравнении с упомянутыми выше является возможность определения множества полиморфизмов в рамках одного анализа. К тому же данный метод позволяет без внесения принципиальных изменений добавлять новые мишени для идентификации.

К важным преимуществам метода на основе биологических микрочипов следует также отнести надежность определения как широко распространенных гаплотипов, так и потенциально редких (для ТА-8 аллеля требуется проведение дополнительных подтверждающих экспериментов). Идентификация редких вариантов представляет особый интерес, поскольку коммерчески доступные методы генотипирования *UGT1A1* (TaqMan, анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью, Invader[®]) не предоставляют такой возможности. При этом частоты распределения аллельных вариантов варьируют в зависимости от популяции, и редкие аллели Т5 и Т8 у негроидов, например, встречаются значительно чаще (порядка 8 и 7% соответственно) в сравнении с европеоидами [32]. К недостаткам метода можно отнести существенное время анализа, составляющее 8 ч, что сравнимо с секвенированием.

Небезынтересным аспектом исследования представляется объединение и демонстрация работы на одном микрочипе DNA- и LNA-зондов. Применение последних потребовалось из-за невозможности дифференциации методом гибридизации с DNA-зондами мотивов ТА-5/ТА-7 в гене *UGT1A1*. Модифицированные LNA-нуклеотиды, инкорпорированные в DNA-зонды, позволили повысить температуру плавления совершенных дуплексов, образовавшихся при гибридизации, и в большинстве случаев понизить эту температуру для несовершенных дуплексов [25]. При этом отношение сигналов совершенный/ несовершенный дуплекс повысилось в диапазоне 1,3–2,0 раза, что позволило однозначно идентифицировать количество ТА-повторов.

Несмотря на то что исследование не носило статистического характера и не преследовало цели определения доли мутантной ДНК (аллелей) в изучаемой когорте, даже на столь не-

большой выборке удалось составить весьма общее представление о частотах аллельных вариантов генов *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* и *ABCB1*, встречающихся в популяции восточных славян. По литературным данным, частота встречаемости аллельного варианта *UGT1A1*28* (TA7, семь TA-повторов) среди европейцев составляет 0,26...0,31; среди афроамериканцев – 0,42...0,56, в азиатской популяции – 0,09...0,16 [32,33]. Для изученной в работе выборки частота встречаемости аллеля TA7 составила 0,39.

Частота встречаемости аллеля *DPYD*2A* по разным данным и для разных популяций варьирует от 0 до 3,5 [12,34–42]. В нашей работе, вероятно в связи небольшим размером выборки, редкий аллель А гена *DPYD* обнаружить не удалось.

Частота встречаемости полиморфизма I105V гена *GSTP1* широко варьирует: для европейцев она составляет 0,28...0,38, для азиатов – 0,16...0,26, для африканцев – 0,14...0,53 [43–47]. Частота встречаемости данного аллеля для изученной в работе выборки соответствовала частоте для европейцев и составила 0,33.

Частота аллеля Т полиморфизма С3435Т гена *ABCB1* для разных популяций варьирует в диапазоне 0,34...0,90 [48–50]. В настоящей работе это значение соответствовало 0,57.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в онкологической практике для выбора режима лечения и дозы препаратов все большее значение уделяется индивидуальным генетическим особенностям пациентов. Эти особенности связаны с изменением первичной структуры, или полиморфизмами генов, продукты которых принимают участие в транспорте и биотрансформации противоопухолевых препаратов. Фармакогенетическое тестирование уже используется для подбора индивидуальных схем лечения иринотеканом, фторурацилом и меркаптопурином. Стоит отметить, что для подавляющего количества противоопухолевых препаратов роль фармакогенетического тестирования для индивидуализации химиотерапии до сих пор находится в процессе изучения.

Применение разработанного биологического микрочипа в практической лабораторной диагностике будет способствовать внедрению индивидуального подхода при выборе режима лечения и адекватной дозировки препаратов при проведении химиотерапии. Использование же персонализированного подхода, в свою очередь, позволит увеличить число благоприятных исходов, повысить качество жизни пациентов,

снизить продолжительность нахождения больных в стационаре и сократить расходы на лечение.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00257).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. P. Strassburg, *Pharmacogenomics* **9**, 703 (2008).
2. P. J. Bosma, J. R. Chowdhury, C. Bakker, et al., *N. Engl. J. Med.* **333**, 1171 (1995).
3. R. H. Tukey, C. P. Strassburg, P. I. Mackenzie, *Mol. Pharmacol.* **62**, 446 (2002).
4. L. E. Carlini, N. J. Meropol, J. Bever, et al., *Clin. Cancer. Res.* **11**, 1226 (2005).
5. F. Innocenti, S. D. Undevia, L. Iyer, et al., *J. Clin. Oncol.* **22**, 1382 (2004).
6. E. Marcuello, A. Altes, A. Menoyo, et al., *Br. J. Cancer.* **91**, 678 (2004).
7. L. K. Mattison, R. Soong, and R. B. Diasio, *Pharmacogenomics* **3**, 485 (2002).
8. T. Takechi, H. Okabe, K. Ikeda, et al., *Oncol. Rep.* **14**, 33 (2005).
9. P. M. Hoff, *Invest. New Drugs* **18**, 331 (2000).
10. B. van Kuilenburg, P. Vreken, N. G. Abeling, et al., *Hum. Genet.* **104**, 1 (1999).
11. R. Meinsma, P. Fernandez-Salguero, A. B. van Kuilenburg, et al., *DNA Cell Biol.* **14**, 1 (1995).
12. X. Wei, H. L. McLeod, J. McMurrrough, et al., *J. Clin. Invest.* **98**, 610 (1996).
13. P. Vreken, A. B. van Kuilenburg, R. Meinsma, et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**, 645 (1996).
14. F. Ali-Osman, O. Akande, G. Antoun, et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 10004 (1997).
15. M. A. Watson, R. K. Stewart, G. B. Smith, et al., *Carcinogenesis* **19**, 275 (1998).
16. J. Stoecklacher, D. J. Park, W. Zhang, et al., *Br. J. Cancer.* **91**, 344 (2004).
17. T. Lecomte, B. Landi, P. Beaune, et al., *Clin. Cancer Res.* **12**, 3050 (2006).
18. A. Ruzzo, F. Graziano, F. Loupakakis, et al., *J. Clin. Oncol.* **25**, 1247 (2007).
19. L. Zhang, T. Sun, B. N. Zhang, et al., *Chin. Med. J. (Engl.)* **124**, 199 (2011).
20. F. Higgins, *Nature* **446**, 749 (2007).
21. G. D. Kruh, *Oncogene* **22**, 7262 (2003).
22. R. A. Randle, S. Raguz, C. F. Higgins, et al., *Biochem. J.* **406**, 445 (2007).
23. Y. Rubina, S. V. Pan'kov, E. I. Dementieva, et al., *Anal. Biochem.* **325**, 92 (2004).
24. R. Heydarov, S. Titov, M. Abramov, et al., *Cancer Biomark.*, doi: 10.3233/CBM-160165 (2016).
25. E. E. Fesenko, R. N. Heydarov, E. V. Stepanova, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 1177 (2013).
26. C. Skarke, S. Grusch, G. Geisslinger, et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **42**, 133 (2004).

27. Y. Hasegawa, T. Sarashina, M. Ando, et al., *Clin. Chem.* **50**, 1479 (2004).
28. J. Watanabe, Y. Mitani, Y. Kawai, et al., *Biotechniques* **43**, 479 (2007).
29. C. K. Huang, A. Dulau, C. J. Su-Rick, et al., *Diagn. Mol. Pathol.* **16**, 50 (2007).
30. D. Pirulli, M. Giordano, D. Puzzer, et al., *Clin. Chem.* **46**, 129 (2000).
31. J. R. Harraway, P. M. George, *Clin. Chem.* **51**, 2183 (2005).
32. E. Beutler, T. Gelbart, and A. Demina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8170 (1998).
33. D. Hall, G. Ybazeta, G. Destro-Bisol, et al., *Pharmacogenetics* **9**, 591 (1999).
34. M. Raida, W. Schwabe, P. Häusler, et al., *Clin. Cancer Res.* **7**, 2832 (2001).
35. H. S. Süzen, N. Yüce, G. Güvenç, et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **61**, 881 (2005).
36. S. A. Ridge, J. Sludden, O. Brown, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **46**, 151 (1998).
37. B. van Kuilenburg, E. W. Muller, J. Haasjes, et al., *Clin. Cancer Res.* **7**, 1149 (2001).
38. T. Ceric, N. Obralic, L. Kapur-Pojksic, et al., *Basic Med. Sci.* **10**, 133 (2010).
39. A. Ofverholm, E. Arkblad, S. Skrtic, et al., *Clin. Biochem.* **43**, 331 (2010).
40. A. Uzunkoy, F. Dilmec, A. Ozgonul, et al., *Anticancer Res.* **27**, 3899 (2007).
41. J. Ciccolini, C. Mercier, A. Evrard, et al., *Ther. Drug Monit.* **28**, 678 (2006).
42. S. M. Offer, A. M. Lee, L. K. Mattison, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 158 (2013).
43. P. Georgiadis, N. A. Demopoulos, J. Topinka, et al., *Toxicol. Lett.* **149**, 269 (2004).
44. A. Gsur, G. Haidinger, S. Hinteregger, et al., *Int. J. Cancer.* **95**, 152 (2001).
45. T. Ishii, T. Matsuse, S. Teramoto, et al., *Thorax* **54**, 693 (1999).
46. C. Dandara, J. Sayi, C. M. Masimirembwa, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 952 (2002).
47. C. P. Wild, F. Yin, P. C. Turner, et al., *Int. J. Cancer* **86**, 1 (2000).
48. T. Sakaeda, T. Nakamura, and K. Okumura, *Pharmacogenomics* **4**, 397 (2003).
49. M. Schwab, M. Eichelbaum, M. F. Fromm, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 285 (2003).
50. S. Dey, *Expert. Opin. Drug Deliv.* **3**, 23 (2006).

Analysis of Variations in Primary Structure of the *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1* and *ABCB1* Genes Involved in Anticancer Drug Metabolism

S.V. Titov, R.N. Heydarov, M.E. Abramov, E.N. Timofeev, and V.M. Mikhailovich

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, ul. Vavilova 32, 119991 Russia

A person-centered approach in caring for patients with cancer which takes individual genetic metabolism into account allows for prescription of adequate medication in the correct dose that optimizes the therapeutic effect without inducing adverse side effects (toxicity). For this purpose, a microarray-based method has been developed to analyze the primary DNA structure of patients and identify the polymorphisms in the *UGT1A1*, *DPYD*, *GSTP1*, and *ABCB1* genes associated with alterations in xenobiotic metabolism. The microarray was used to conduct genotyping of specimens taken from 89 cancer patients and 15 healthy donors. The results obtained after determination of the primary structure of DNA samples were in full concordance with those received from control sequencing. LNA-containing hybridization probes were used to enhance the specificity in the analysis of polymorphisms in the *UGT1A1* gene. Frequencies of the genetic variations *UGT1A1**28, *DPYD**2A, *GSTP1* (I105V), and *ABCB1* (C3435T) were 0.39; 0; 0.33; and 0.57, correspondingly.

Key words: genotyping, microarray, chemotherapy, pharmacogenetics, toxicity