

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИЦ С МУТАНТНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ DPYD И TYMS

Важнейшим аспектом лечения онкологических заболеваний является химиотерапия, проводимая для подавления роста раковых клеток. В качестве препаратов часто используют аналоги пиримидинов, такие как Капецитабин, Фторурацил, UTF и др.

Примерно 80% вводимого препарата этого ряда метаболизируется печенью с помощью фермента дигидропиримидиндегидрогеназы (DPD), а еще 5% – с помощью тимидинсинтазы (TS). Снижение метаболической активности DPD приводит к увеличению концентрации активных метаболитов 5-фторурацила (5-ФУ), что повышает токсичность для здоровых клеток и увеличивает частоту побочных эффектов. Несмотря на то, что применение стандартных дозировок при генетически обусловленном дефекте DPD опасен летальным исходом, скрининг подобных аномалий пока не включен в стандарты клинической онкологии.

Цель работы – разработка метода идентификации некоторых однонуклеотидных полиморфизмов, позволяющих вести скрининг больных с активностью DPD и TS, отличной от нормальной.

В рамках исследования проведена работа по:

- 1) Разработке ДНК маркеров – праймеров и зондов с флуоресцентной меткой;
- 2) Отработке методики проведения анализа методом ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan для исследования частот встречаемости некоторых аллелей гена DPYD и гена TYMS 2R/3R;
- 3) Изучению распределения аллелей риска отдельных генов в популяции Беларуси.

Образцы ДНК коренных белорусов получены из ДНК-банка лаборатории нехромосомной наследственности ГНУ «Институт цитологии и генетики». Выборка сформирована случайным образом, путем отбора образцов из 6 регионов Беларуси: Центр, Западное Полесье, Восточное Полесье, Север, Восток, Запад.

В таблице 1 представлены разработанные последовательности праймеров для амплификации полиморфного локуса для DPYD 2846 и DPYD 1601 и зондов (проб) TaqMan, специфичных к определенным аллелям исследуемых локусов. Праймеры для гена TYMS взяты из результатов исследований Bezerra A. M. [et al.] [1].

Таблица 1 – Последовательности разработанных праймеров для амплификации полиморфных локусов гена DPYD и зондов (проб) TaqMan

	Последовательность праймеров специфичных к локусам:	
	DPYD 2846	DPYD 1601
Прямой праймер (F)	5' - GGTGAATTGAGCAACGTAGA - 3'	5' - AGTCACAA-TATGGAGCTTC - 3'
Обратный праймер (R)	5' - ACAGGTCATGTAGCATTTACCA - 3'	5' - CTAGCAAGAC-CAAAAGGA - 3'
А-проба (A-probe)	FAM 5' - TGTGGC-TATGATTGATGAAGA - 3'ВНQ-1	FAM 5' - CGGCCATTTCTACACTA - 3'ВНQ-1
Т-проба (T-probe)	HEX 5' - TTGTGGCTATGATTGTT-GAAG - 3'ВНQ-1	HEX 5' - CATTAATGTCCACCAGAT - 3'ВНQ-1

В проверенных по DPYD 2846 196 образцах гетерозигот не обнаружено, что можно объяснить крайне редкой встречаемостью этого гена ($A=0.005166$ среди европеоидов). Для уточнения частоты были проанализированы данные еще 143 человек, в результате найден лишь 1 гетерозиготный образец. Частота встречаемости в двух выборках составила $T=1.0$ $A=0.0$ в первой выборке и $T=0.993007$ $A=0.006993$ во второй. Качество проведения РВ-ПЦР с разработанной системой ДНК маркеров проверено с найденным позитивным контролем.

Среди 201 образца, проверяемых на DPYD 1601, найдено 4 носителя мутантного аллеля.

Таким образом, частота встречаемости DPYD 1601 $G>A$ составила $G = 0,980099$, $A=0,019901$, а значит исследуемый ген распространен на территории Беларуси.

Изучение гена TYMS показало, что понижение функциональной активности TS (2R2R) среди белорусов может наблюдаться достаточно часто – 38 человек из 189. $2R = 0,201058$, $2R/3R = 0,470899$, $3R = 0,328042$. Таким образом, полученные частоты совпадают с литературными данными, что свидетельствует о возможности применения метода в диагностических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. TYMS double (2R) and triple repeat (3R) confers risk for human oral squamous cell carcinoma // Bezerra, A. M. [et al.]. // Molecular biology reports. – 2014. – vol. 41. – P. 7737-7742.