

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Гурьева Оксана Дмитриевна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ТЕРАПИИ
МЕТОТРЕКСАТОМ НА ОСНОВЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У
ДЕТЕЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Валиев Тимур Теймуразович

доктор медицинских наук, доцент

Савельева Марина Ивановна

Москва - 2025 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Общие сведения об остром лимфобластном лейкозе у детей	17
1.2 Роль метотрексата в улучшении результатов лечения острого лимфобластного лейкоза у детей	21
1.3 Фармакогенетические основы лекарственной токсичности.....	27
1.4 Нежелательные и токсические реакции при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей	37
1.5 Перспективы использования фармакогенетического тестирования при лечении острого лимфобластного лейкоза.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Критерии отбора и общие клинико-терапевтические характеристики участников исследования	44
2.2 Дизайн исследования	49
2.3 Критерии и определения осложнений, включенных в анализ токсичности при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу ALL IC-BFM 2009	50
2.4 Определение полиморфизмов генов <i>ABCB1</i> и <i>SLCO1B1</i>	56
2.5 Статистическая обработка результатов	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	59
3.1 Результаты лечения и нежелательные лекарственные реакции, обусловленные применением метотрексата в рамках протокола ALL IC-BFM 2009.....	59

3.2 Исследование ассоциаций полиморфизмов генов <i>ABCB1</i> и <i>SLCO1B1</i> с исходами терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей.....	65
3.3 Результаты терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей в зависимости от мутационного статуса генов <i>ABCB1</i> и <i>SLCO1B1</i> и дозировки метотрексата.....	70
3.4 Исследование ассоциаций полиморфизмов генов <i>ABCB1</i> и <i>SLCO1B1</i> с клиническими и биохимическими нежелательными лекарственными реакциями, а также с временем экскреции метотрексата, при остром лимфобластном лейкозе у детей.....	74
3.5 Прогностическое значение клинических и генетических факторов при терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей.....	86
ОБСУЖДЕНИЕ.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
ВЫВОДЫ.....	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Схема протокола ALL IC-BFM 2009. Стратификация на прогностические группы риска.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — это наиболее распространенное злокачественное новообразование (ЗНО) у детей, на которое приходится около 30% всех ЗНО. Несмотря на значительные успехи в лечении этого заболевания, при котором показатели многолетней выживаемости достигают 90.7% (Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т., 2019; Литвинов Д.В., Карачунский А.И., 2015), пациенты по-прежнему страдают от токсических эффектов, вызванных лекарственными средствами, что в ряде случаев требует редукции дозы или прекращения введения цитотоксических препаратов и способствует снижению общей эффективности терапии [1, 2, 7, 8, 9]. Кроме того, исследователи Evans W.E., Crews K.R. (2004г. и 2020г.) отметили значительную межиндивидуальную вариабельность токсичности лекарственных средств и исходов заболевания, в связи с чем роль фармакогенетики (ФГ) в выявлении генетических полиморфизмов генов-кандидатов для оптимизации терапевтических подходов весьма высока [5, 6].

В настоящее время в Российской Федерации применяются международные протоколы лечения ОЛЛ у детей: ALL IC-BFM 2002/2009 и ALL-MB 2008/2015, похожие по спектру используемых препаратов и, следовательно, ожидаемому профилю токсичности. Данный факт определяет ОЛЛ у детей, как идеальную платформу для изучения ФГ [4, 23].

Основным недостатком исследований ФГ при ОЛЛ в детском возрасте является то, что на каждом этапе программного лечения пациенты получают комбинации различных препаратов с многократно перекрывающимся профилем токсичности. Кроме того, в ряде случаев взаимодействия «лекарство-ген» усугубляются взаимодействиями «лекарство-лекарство», как, например, при

изучении лекарственных взаимодействий 6-меркаптопурина (6-МП) и метотрексата [3-5].

Метотрексат (МТХ) - ингибитор фолиевой кислоты, введенный в клиническую практику в 1950-х годах, остается основным компонентом в терапии ОЛЛ. МТХ подавляет синтез ДНК, конкурентно ингибируя фермент дигидрофолатредуктазу (DHFR), тем самым прерывая биосинтез тимидина. Множество транспортеров и ферментов участвуют в метаболизме фолиевой кислоты, некоторые обеспечивают всасывание и транспорт МТХ, что влияет на его фармакокинетику (ФК) [6]. Активность белков-транспортеров оказывает влияние на концентрацию препарата в плазме крови и тканях, тем самым определяя лекарственную токсичность [26, 34]. Выявление полиморфизмов генов, кодирующих белки-переносчики МТХ и ферменты его биотрансформации, позволяет прогнозировать риск МТХ-индуцированной токсичности со стороны кожи и слизистых, печени, почек, нервной системы. Возраст пациентов на активность белков-транспортеров не влияет.

Переносчик органических анионов растворенного вещества 1В1 (*SLCO1B1*) - транспортер МТХ, расположен в основном на гепатоцитах человека. Два однонуклеотидных полиморфизма (SNP, single nucleotide polymorphism) *SLCO1B1*, rs11045879 и rs4149081, были связаны с клиренсом МТХ и с тяжелой гастроинтестинальной токсичностью во время проведения фазы консолидации при лечении ОЛЛ [22, 38]. Исследования других научных групп также подтвердили, что SNP коррелируют с результатами терапии [20, 25, 34]. Radtke S. с соавторами показали, что вариант *SLCO1B1* rs4149056 в значительной степени связан с ФК МТХ. По результатам высокопроизводительного секвенирования экзонов *SLCO1B1* у детей с ОЛЛ, четыре общих гаплотипа *SLCO1B1* были связаны с самым низким клиренсом МТХ. Различные полиморфизмы в этом гене могут объяснить изменения клиренса высокодозного МТХ у 10,7% больных [38]. Следовательно, SNP в гене *SLCO1B1* являются важными детерминантами токсичности МТХ, в особенности стоматита и мукозита [20].

Биодоступность МТХ также зависит от генетических полиморфизмов переносчиков семейства ABC, которые транспортируют молекулы МТХ из энтероцитов в просвет желудочно-кишечного тракта (кодируются генами *ABCC2*, *ABCB1*, *ABCG2*) и в кровь (кодируются генами *ABCC1* и *ABCC3*). Системное выведение МТХ обеспечивается за счет клубочковой фильтрации и активной секреции из клеток почечных канальцев [21, 48].

Все существующие протоколы терапии ОЛЛ предполагают расчет дозы МТХ, исходя из площади поверхности тела без учета влияния клинических или генетических факторов. Поскольку клиренс препарата имеет большое значение для токсичности и исходов терапии, точное дозирование высокодозного 1000 – 5000 мг/м² МТХ (HD-МТХ) у каждого пациента для достижения целевых ФК-параметров позволит получить максимальные терапевтические эффекты при минимизации токсичности. Для создания алгоритмов дозирования препарата необходимы дополнительные данные о влиянии клинических и генетических факторов на клиренс HD-МТХ [19, 20].

Вследствие комбинации химиотерапевтических препаратов в протоколах терапии ОЛЛ у детей, отдельные SNP вряд ли окажут существенное воздействие на ФК лекарств и частоту достижения полных ремиссий. Определение полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм цитостатиков, то есть фармакогенетические аспекты токсичности, является многообещающим и динамично развивающимся направлением клинической онкологии. В связи с этим актуальным является выявление подобных ассоциаций у детей с ОЛЛ, что позволит установить связь эффективности и безопасности МТХ с его фармакогенетическими особенностями и выявить факторы риска, позволяющие прогнозировать ответ на терапию и тяжесть токсических явлений при лечении ОЛЛ с включением МТХ.

Степень разработанности темы диссертации

Совершенствование программ лечения ОЛЛ оценивается не только по частоте достижения полных ремиссий, многолетней безрецидивной и общей выживаемости больных, но и на основании показателей токсичности противоопухолевого лечения. На каждом этапе становления протоколов терапии ОЛЛ, включения новых препаратов (метотрексата, L-аспарагиназы, 6-меркаптопурина, блинатумомаба и др.) проводится анализ спектра и степени тяжести токсических эффектов. Большое внимание вопросам токсичности при программной терапии ОЛЛ у детей и подростков было уделено в работах корифеев отечественной школы детских онкогематологов – профессоров Махоновой Л.А. и Румянцева А.Г., а современные режимы химиотерапии были проанализированы с точки зрения эффективности и токсичности Валиевым Т.Т. (2021г., 2022г.).

Большое внимание в изучении токсичности протоколов лечения ОЛЛ уделяется метотрексату, как одному из базовых препаратов при ОЛЛ. Установлено достоверное влияние дозы препарата, функции печени и почек на степень выраженности токсических эффектов МТХ, но полученные данные не могут в полной мере объяснить межиндивидуальные различия в клинических вариантах токсичности, в связи с чем проводятся исследования, направленные на анализ роли фармакогенетических факторов. Так, сравнивая результаты терапии ОЛЛ группы высокого риска у детей по протоколам МБ-2002 и МБ-2008, Литвинов Д.В. (2023 г.), упоминает актуальность фармакогенетического тестирования для разработки лечебной тактики [8]. В работе Котовой Е.С. «Полиморфизмы генов *TPMT*, *NUDT15* и особенности метаболизма 6-меркаптопурина у взрослых больных Rh-негативными острыми лимфобластными лейкозами/лимфомами» показана взаимосвязь фармакогенетических маркеров и терапевтических подходов при острых лейкозах [10].

К настоящему времени в РФ не изучалась эффективность и токсичность лечения детей с ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009, с акцентом на фармакогенетическое исследование полиморфных вариантов генов белков-переносчиков. Для выявления возможных ассоциаций генотипов *ABCB1* и *SLCO1B1* с ФК МТХ, токсичностью лечения в фазе консолидации и исходами терапии, мы впервые инициировали исследование в российской популяции больных.

Цель исследования

Оптимизация лечения острого лимфобластного лейкоза у детей для повышения его эффективности и безопасности на основе анализа фармакогенетических биомаркеров.

Задачи исследования

1. Изучить частоту встречаемости токсических нежелательных лекарственных реакций (≥ 3 степеней выраженности) и неблагоприятных исходов терапии высокодозным метотрексатом у детей с острым лимфобластным лейкозом.
2. Выявить ассоциации токсических нежелательных лекарственных реакций (≥ 3 степеней выраженности) и неблагоприятных исходов терапии высокодозным метотрексатом с носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с острым лимфобластным лейкозом.
3. Оценить фармакокинетику высокодозного метотрексата по времени его экскреции в зависимости от наличия токсических нежелательных лекарственных реакций (≥ 3 степеней выраженности) и неблагоприятных исходов терапии с учетом носительства полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с острым лимфобластным лейкозом.

4. Оценить выживаемость (бессобытийную, безрецидивную и общую) у детей с острым лимфобластным лейкозом в зависимости от носительства полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* и дозы метотрексата.

5. Разработать прогностические модели развития нежелательных явлений при терапии высокодозным метотрексатом детей с острым лимфобластным лейкозом.

Научная новизна

1. Впервые в отечественной онкогематологии у детей с острым лимфобластным лейкозом изучена частота встречаемости генетических полиморфизмов белков-транспортеров метотрексата *ABCB1* и *SLCO1B1*.

2. Впервые определены ассоциативные связи между токсическими нежелательными лекарственными реакциями (≥ 3 степеней выраженности) высокодозного метотрексата и носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с острым лимфобластным лейкозом.

3. Впервые установлены ассоциативные связи между неблагоприятными исходами терапии детей с острым лимфобластным лейкозом высокодозным метотрексатом и носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1*.

4. Впервые разработаны прогностические модели риска развития неблагоприятных исходов терапии высокодозным метотрексатом, учитывающие как клинические, так и генетические факторы, а также дозу препарата.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный в ходе выполнения диссертационной работы алгоритм прогнозирования эффективности и безопасности применения МТХ у детей с ОЛЛ с учетом результатов фармакогенетического тестирования полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* может быть использован в работе стационарных отделений

лечебных учреждений гематологического профиля с целью усовершенствования и оптимизации терапии детей с ОЛЛ. Данные, полученные в исследовании, открывают новые возможности в персонализированном подходе к выбору адекватных методов терапии детей с ОЛЛ.

Методология и методы исследования

Клиническая часть проведена на базе НИИ детской онкологии и гематологии имени академика Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (директор — д.м.н., проф. С.Р. Варфоломеева) с 15.03.2016 г. по 29.11.2022 г. Проведен проспективный анализ клинических данных 124 пациентов в возрасте от 7 месяцев до 18 лет с установленным диагнозом острый лимфобластный лейкоз. 106 (85,5%) пациентов проходили обследование и лечение по программе ALL IC-BFM 2009, 18 (14,5%) пациентов - по программе ALL REZ BFM 2002 в отделении детской онкологии и гематологии (химиотерапии гемобластозов) № 1 (заведующий отделением — д.м.н. Т.Т. Валиев). Результаты эффективности терапии включали оценку частоты полных ремиссий, показателей пятилетней общей, безрецидивной и бессобытийной выживаемости, в зависимости от полиморфизмов генов *ABCB1* C3435T (rs1045642), C1236T (rs1128503), G2677T (rs2032582) и *SLCO1B1* T521C (rs4149056) и дозировки метотрексата. Токсичность терапии оценивалась согласно критериям шкалы СТСАЕ v5.0 2018 года. Изучалась взаимосвязь нежелательных реакций, у пациентов, получавших HD-MTX с полиморфизмами генов *ABCB1* C3435T (rs1045642), C1236T (rs1128503), G2677T (rs2032582) и *SLCO1B1* T521C (rs4149056) и фармакокинетикой препарата.

Фармакогенетическая часть работы (генотипирование пациентов по полиморфным маркерам *ABCB1* C3435T (rs1045642), C1236T (rs1128503), G2677T (rs2032582) и *SLCO1B1* T521C (rs4149056)) проводилась на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО

Минздрава России (директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины — д.м.н., доцент Мирзаев К.Б., исполнитель - Созаева Ж.А.) с помощью коммерческих наборов реагентов для определения соответствующих полиморфизмов (ООО «Синтол», Россия) методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Забор материала (периферическая венозная кровь) проводили однократно, независимо от сроков терапии МТХ.

Финансирование (определение однонуклеотидных генетических полиморфизмов методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени): работа выполнена в рамках государственного задания «Новые фармакогенетические маркеры безопасности фармакотерапии некоторых социально значимых заболеваний» (ЕГИСУ НИОКТР № 1022050400012-9).

Информация о катамнезе больных получена из организационно-методического отдела (заведующая отделением — к.м.н., А.А. Малахова) НИИ детской онкологии и гематологии имени академика Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии и гематологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. При статистической обработке результатов использовали программу IBM SPSS Statistics 26.0 (США).

Критерии включения:

1. Возраст от 7 месяцев до 18 лет.
2. Подтвержденный диагноз острого лимфобластного лейкоза (МКБ С91.0).
3. Получение информированного добровольного согласия законного представителя на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Выраженная соматическая патология (патология печени, почек, сердечно-сосудистой, нервной систем), препятствующая проведению программной химиотерапии.
2. Психотическое состояние или тяжелое психическое заболевание в анамнезе (шизофрения, эпилепсия, биполярное расстройство и т.п.).

3. Одновременный прием препаратов, влияющих на фармакокинетику и/или фармакодинамику метотрексата.

4. Отказ от подписания информированного добровольного согласия или отказ от продолжения участия в исследовании, оформленные законным представителем в письменной форме.

Положения, выносимые на защиту

1. Достижение высоких показателей выживаемости у пациентов с острым лимфобластным лейкозом опосредовано высокой эффективностью протокола ALL IC-BFM 2009, неудачи терапии могут быть обусловлены, в том числе, однонуклеотидными полиморфизмами генов белков-транспортеров метотрексата.

2. Полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с ОЛЛ, получивших терапию метотрексатом, являются предикторами ее безопасности и эффективности.

3. Полиморфизмы в генах *ABCB1* и *SLCO1B1* достоверно ассоциированы с токсическими явлениями, отмеченными при проведении протокола ALL IC-BFM 2009 у детей с острым лимфобластным лейкозом.

4. В роли предикторов неблагоприятных исходов у детей с острым лимфобластным лейкозом могут выступать как клинически выраженные токсические нежелательные лекарственные реакции (≥ 3 ст.), так и генетические полиморфизмы белков-переносчиков метотрексата *ABCB1* и *SLCO1B1*, доказанные построением высокоэффективных прогностических моделей ($>70\%$), что позволяет использовать фармакогенетическое тестирование в клинической практике врача-онколога.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствуют паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки, клиническая медицина), направлениям исследования: п. 6 «Разработка и совершенствование методов диагностики, лечения и профилактики в области педиатрической онкологии», п. 10 «Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов»; и паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки), направлениям исследования: п. 6 «Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств», п. 10 «Проведение фармакогенетических исследований», п. 16 «Мониторинг безопасности лекарственных средств, изучение нежелательных реакций лекарственных средств, разработка методов их профилактики и коррекции», п. 15 «Разработка методов математического моделирования, в том числе, выбора дозирования лекарственных средств при их первичном и курсовом назначении».

Степень достоверности и апробация результатов

В диссертационной работе представлены результаты, основанные на тщательном анализе проспективных данных с использованием современных методик сбора и обработки исходной информации корректного числа наблюдений (124 пациента). Достоверность исследуемой базы данных подтверждается актом проверки первичного материала. Обработанный большой объем данных о детях с ОЛЛ, полученный при исследовании клинического материала на современном сертифицированном оборудовании, является достаточным для получения достоверных результатов. При статистическом анализе были использованы корректные современные методики обработки медицинской информации.

Результаты исследования были доложены на Российской зимней школе молодых ученых и врачей по фармакогенетике, фармакогеномике и персонализированной терапии (2 февраля 2022г., г. Москва), на II Мультицентральной встрече «Российской группы ВФМ» (11–12 ноября 2022 года), на конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (21 октября 2022г., г. Минск, республика Беларусь), на научно-практической конференции «Третий всероссийский педиатрический форум студентов и молодых ученых с международным участием» (18–19 мая 2022 г., г. Москва), на научно-практической конференции с международным участием «Фармакогеномика в онкопедиатрии» (5 апреля 2024 г., г. Санкт-Петербург).

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научной конференции с участием отделений детской онкологии и гематологии (химиотерапия гемобластозов №1 и №2), отделения детской трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, научно-консультативного отделения, дневного стационара с проведением химиотерапии, отделения реанимации и интенсивной терапии отдела анестезиологии-реанимации, детского онкологического отделения хирургических методов лечения с проведением химиотерапии №1 (опухолей головы и шеи), детского онкологического отделения хирургических методов лечения №2 (опухолей торакоабдоминальной локализации и опорно-двигательного аппарата) НИИ детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова, отдела гематологии и трансплантации костного мозга НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, отделения клинической фармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры детской онкологии им. академика Л.А. Дурнова ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России 24.09.2024 г. (Протокол № 164/24).

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты диссертационного исследования об эффективности и безопасности терапии метотрексатом на основе фармакогенетического тестирования при остром лимфобластном лейкозе у детей внедрены в клиническую практику научно-исследовательского института детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 18.09.2024 г.). В практической деятельности используются разработанные практические рекомендации по проведению фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей генотипа CC гена *ABCB1* rs1128503, GG гена *ABCB1* rs203258, TT гена *ABCB1* rs4148738, TT гена *SLCO1B1* T521C rs4149056, а также алгоритм рациональной персонифицированной тактики ведения пациентов с вышеуказанными вариантами однонуклеотидных полиморфизмов.

Основные положения диссертационной работы используются в педагогическом процессе кафедры детской онкологии имени академика Л.А. Дурнова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации

Основные результаты диссертационного исследования представлены в 3 публикациях, из них 2 статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из 3 глав, введения, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, приложений и списка литературы, включающего 152 литературный источник. Объем работы составляет 129 страницы машинописного текста. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 17 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения об остром лимфобластном лейкозе у детей

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – один из наиболее распространенных гемобластозов, на долю которого приходится около 30% онкологических заболеваний у детей (в возрасте 1-18 лет) во всем мире [1]. Несмотря на значительные успехи в лечении этого заболевания (вероятность многолетних полных ремиссий и выздоровления составляет 90,7%), 75% пациентов испытывают побочные эффекты, связанные с химиолучевой терапией, и 1-3% имеют летальные осложнения [2, 3].

Пациенты более чем в 35 странах мира, в том числе и в Российской Федерации, получают лечение в соответствии с действующим протоколом, разработанным международной исследовательской группой BFM (Берлин-Франкфурт-Мюнстер). Данный протокол включает четыре этапа лечения (индукция, консолидация ремиссии, реиндукция и поддерживающая терапия), которые рассчитаны на два года [4]. Современная версия данного протокола (ALL IC-BFM 2002 и 2009) является актуальной клинической рекомендацией Минздрава России, успешно используется в клиниках Европы и стран СНГ.

Заметные изменения в терапии ОЛЛ у детей были достигнуты за последние четыре десятилетия по сравнению с концом 1960-х годов, когда излечения достигали лишь 30% пациентов. В настоящее время более 85% пациентов остаются в первой полной ремиссии даже через 10 лет от момента постановки диагноза. Оставшиеся 15% детей имеют рецидивы, и процент излечения снижается до 25-40% [3]. Достижения в лечении ОЛЛ во многом обусловлены более глубоким пониманием молекулярно-генетических особенностей патогенеза заболевания, разработкой с учетом этих данных риск-адаптированной терапии, появлением новых таргетных препаратов (блинатумомаб, инотузумаб, озогамицин) и использованием клеточных технологий (трансплантации

аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T)) [3]. Анализ базы данных SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results, наблюдение, эпидемиология и конечные результаты) показал повышение выживаемости среди детей, подростков и молодых взрослых с ОЛЛ: 5-летняя общая выживаемость (ОВ) составляет 89% и 61% соответственно [7]. Точный процент ОВ может варьировать в зависимости от того, как определяется возрастной диапазон группы больных «молодые взрослые». ОВ значительно снижается с увеличением возраста. Еще одной возрастной группой больных ОЛЛ, лечение которых сопряжено с неблагоприятным прогнозом, являются младенцы в возрасте до 1 года. В этой возрастной группе за последние 30 лет нет позитивной динамики изменения показателей выживаемости, а 6-летняя ОВ составляет 58,2% [7].

Длительность анамнеза заболевания от момента появления первых клинических признаков до морфо-иммунологической верификации диагноза составляет от нескольких недель до нескольких месяцев. Клиническая картина определяется степенью нарушения функций костного мозга (интоксикационный синдром в 50% случаев, анемия в 40%, геморрагический синдром, инфекционный синдром различной степени тяжести – в 60%) и наличием внекостномозговых проявлений ОЛЛ (гепато- и спленомегалия, гиперлейкоцитоз и бластоз в крови, лимфаденопатия и поражение органов средостения, ЦНС, кожи, яичек, лейкоцитарная инфильтрация сетчатки). В некоторых случаях наблюдается развитие болевого синдрома, связанного с поражением костей, нервов [19].

Определение вариантов ОЛЛ основано на морфологических характеристиках, иммунофенотипическом профиле, цитогенетических и молекулярных особенностях, согласно классификации Всемирной организации здравоохранения 2016 г. (ВОЗ, The World Health Organization (WHO) classification) [23]. В дополнение к определению специфических для пациента факторов риска (пол, возраст, сопутствующий диагноз синдрома Дауна) и факторов риска, специфических для ОЛЛ (инициальный лейкоцитоз, иммуноподвариант,

хромосомные aberrации и молекулярно-генетические перестройки) при стратификации на прогностические группы риска необходимо учитывать ответ на химиотерапию (количество бластных клеток на 8-й день терапии преднизолоном, определение числа бластных клеток и МОБ в костном мозге в контрольные точки, предусмотренные протоколом терапии). Подобная комплексная оценка имеет особое значение для прогнозирования вероятности ремиссии и выживаемости при ОЛЛ (Таблица 1) [5, 76].

Таблица 1 - Прогностические факторы риска при ОЛЛ у детей [5, 76]

Факторы	Позитивные	Негативные
Возраст на момент постановки диагноза	от 1 года до 10 лет	<1 года или >10 лет
Пол	женский	мужской
Раса	европейская, азиатская	африканская, испанская
Синдром Дауна	нет	есть
Количество лейкоцитов на момент постановки диагноза	$< 20 \times 10^9/\text{л}$	$>20 \times 10^9/\text{л}$
ЦНС-статус	ЦНС-1 (не вовлечена)	ЦНС-2 (соотношение эритроцитов к лейкоцитам, как 100:1), ЦНС-3 (поражение ЦНС)
Поражение яичек	нет	есть
Минимальная остаточная болезнь (МОБ)	отрицательная постоянно снижается и становится негативной	положительная повышается и/или персистирует

Цитогенетические и молекулярные аномалии	гиперплоидность (51-65 хромосом) <i>ETV6-RUNX1</i> : t(12;21)(p13.2;q22.1) <i>NUMT1</i> реаранжировки трисомии 4 и 10	гиподиплоидный набор (<44 хромосом) <i>KMT2A</i> реаранжировки: t(v;11q23.3) <i>BCR-ABL1</i> : t(9;22)(q34.1;q11.2) (Ph+) <i>BCR-ABL1-like</i> (Ph-like) <i>TCF3-HLF</i> : t(17;19)(q22;p13) <i>MEF2D</i> реаранжировки Внутрихромосомная амплификация хромосомы 21 (iAMP21) Перестройки <i>BCL2</i> или <i>MYC</i> реаранжировки
--	---	--

В настоящее время в Российской Федерации в качестве клинических рекомендаций утверждены международные протоколы лечения ОЛЛ: ALL IC-BFM 2002/2009 и ALL-MB-2015. Во всем мире многие научные группы (COG, POG, CCLG, NOPHO и др.) разрабатывают свои протоколы лечения, похожие по спектру используемых препаратов, режимам введения и, следовательно, ожидаемому профилю токсичности. Данный факт определяет исследуемую нозологию как идеальную платформу для ФГ-анализа.

Современные протоколы лечения ОЛЛ в детском возрасте начинаются с фазы индукции, которая включает даунорубицин, препараты L-аспарагиназы (нативные и пегилированные), глюкокортикоиды (дексаметазон/преднизолон), алкалоиды барвинка розового – винкристин, алкилирующие агенты – циклофосфамид, антиметаболиты – цитозин арабинозид, 6-меркаптопурин (6-MP), для скорейшей редукции популяции бластных клеток и предупреждения развития лекарственной резистентности. Затем следует фаза консолидации, которая включает метотрексат (MTX), используемый в высоких дозах. Так, в

протоколах ALL IC-BFM 2002/2009 дозировка MTX составляет 2000 мг/м² или 5000 мг/м² в зависимости от прогностической группы риска и иммуноподварианта ОЛЛ, тогда как в протоколе ALL-MB-2015 MTX используется в существенно более низких дозах - 30 мг/м². Доза 6-MP также разная на этапах консолидации в зависимости от протокола лечения – 25 мг/м² в протоколе ALL IC-BFM 2002/2009 и 50 мг/м² – в ALL-MB-2015. В программах лечения ОЛЛ в большинстве стран континентальной Европы доза 6-MP составляет 50 мг/м²/сут, в то время как в Великобритании, скандинавских странах и США – 75 мг/м²/сут. Для максимального снижения вероятности рецидива следующим этапом терапии ОЛЛ является цикл реиндукции, включающий препараты, используемые в фазу индукции. И, наконец, завершающим этапом программного лечения ОЛЛ является длительная поддерживающая терапия низкими дозами MTX (20 мг/м² или 30 мг/м² в зависимости от протокола) и 6-MP [9, 20, 21]. Дискутабелен вопрос об избыточности терапии и преимуществе сокращения лечения ради меньшей токсичности и меньшего числа отдаленных осложнений [6, 7].

1.2 Роль метотрексата в улучшении результатов лечения острого лимфобластного лейкоза у детей

Метотрексат (MTX) – цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонист фолата, основной терапевтический эффект которого заключается в подавлении синтеза ДНК. Введен в клиническую практику в 1950-х годах, и до настоящего времени остается основным компонентом в терапии ОЛЛ, неходжкинских лимфом и остеосарком у детей и взрослых, рака головы и шеи, молочной железы, мочевого пузыря, плоскоклеточного рака легких и мезотелиомы плевры во взрослой когорте пациентов [24-26, 65, 66].

MTX является одним из основных препаратов стандартизированных протоколов лечения ОЛЛ у детей, в том числе ALL IC-BFM 2002/2009. В фазе консолидации пациенты получают высокие дозы (>2000 мг/м²) MTX и после

каждого введения оценивается его фармакокинетика, определение концентрации в сыворотке крови [5]. Высокая концентрация МТХ в плазме связана с повышением его токсичности (гематологической, кожной, нефротоксичности) [16]. Уровень МТХ в плазме крови, превышающий 1 или 0,25 мкмоль/л через 48 и 54 часа от начала инфузии, соответственно, свидетельствует о медленной элиминации МТХ, согласно протоколу ВФМ [19]. Ожидается, что улучшение исходов заболевания и снижение неблагоприятных эффектов будет достигнуто путем поиска способа калибровки дозы МТХ.

МТХ, в своей полиглутаматной форме (МТХПГ), является эффективным химиотерапевтическим агентом, который конкурентно ингибирует дигидрофолатредуктазу (DHFR), ключевой фермент, ответственный за реакцию восстановления дигидрофолата до тетрагидрофолата, и тимидилат синтетазу (TYMS) [6, 54]. Существует несколько биологически активных форм восстановленного фолата, включая 5,10-метилен-ТГФ и 5-метил-ТГФ, которые используются для синтеза тимидилата (катализируемого TYMS) и синтеза метионина, для которого необходим фермент метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR). Такое ингибирование истощает в клетках необходимый тетрагидрофолат (ТГФ), тем самым нарушая биосинтез пуринов и пиримидинов *de novo* и препятствуя образованию необходимых одноуглеродных доноров, необходимых для метилирования ДНК, что приводит к гибели клеток (терапевтический эффект МТХ) [7, 54].

Как и большинство антиметаболитов, МТХ активен в S-фазе клеточного цикла. Препарат переносится через клеточные мембраны посредством энергозависимого, чувствительного к температуре концентрационного процесса с участием фолат-связывающих белков, после чего он полиглутамилируется ферментом фолилполиглутамил синтетазой. Полиглутамилирование метотрексата усиливает его внутриклеточную персистенцию и, как было показано в исследовании Lopez-Lopez E. et al., коррелирует с чувствительностью лейкемических клеток к этому агенту [27].

Второй механизм, с помощью которого метотрексат повреждает клетки, может быть связан с вмешательством в синтез ДНК (что приводит к "смерти без тимины"), вторичным по отношению к ингибированию DHFR [3].

Токсическое действие МТХ может ингибироваться снижением уровня фолатов, таких как кальция фолинат (5-формилтетрагидрофолат, лейковорин). Возможность того, что в опухолевых клетках может быть нарушен транспорт таких восстановленных фолатов служит основой для стратегий, включающих введение высоких доз МТХ в сочетании с лейковорином. В 1960-х годах в первых экспериментах Goldin A. et al. введение лейковорина в течение 24-36 часов после МТХ позволило предотвратить МТХ-индуцированную токсичность, не снижая при этом противоопухолевую активность [100]. Лейковорин не может быть транспортирован в злокачественную клетку, но он может попасть в нормальные клетки и конкурировать с МТХ за места связывания с DHFR, поскольку в них сохраняется функция белков-переносчиков фолатов [131]. Если кальция фолинат присутствует в избыточном количестве, фермент реактивируется, и синтез пурина и тимидина может быть возобновлен. Внутриклеточно лейковорин способен конкурировать со свободным, но не с полиглутаматными формами МТХ, за связывание с DHFR [123]. В отличие от опухолевых клеток, в нормальном эпителии кишечника и предшественниках костного мозга в аналогичных условиях синтез МТХПГ происходит в сравнительно небольших количествах. Предполагается, что из-за более низкого уровня внутриклеточных МТХПГ лейковорин может более эффективно подавлять ингибирование DHFR в нормальных клетках по сравнению со злокачественными [123, 156, 157].

Кроме того, известен противовоспалительный эффект МТХ осуществляемый такими механизмами как:

- 1) ингибирование активации ядерного фактора-κB (NF-κB) и его ядерной транслокации;
- 2) ингибирование аминокимонимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид (AICAR) трансформилазы (ATIC), что вызывает накопление внутриклеточного

AICAR и высвобождение аденозина, что приводит к подавлению воспалительных и иммунных реакций;

3) ингибирование оксида азота;

4) ингибирование сигнального трансдуктора Janus-киназ и активирование транскрипции сигнального пути [70];

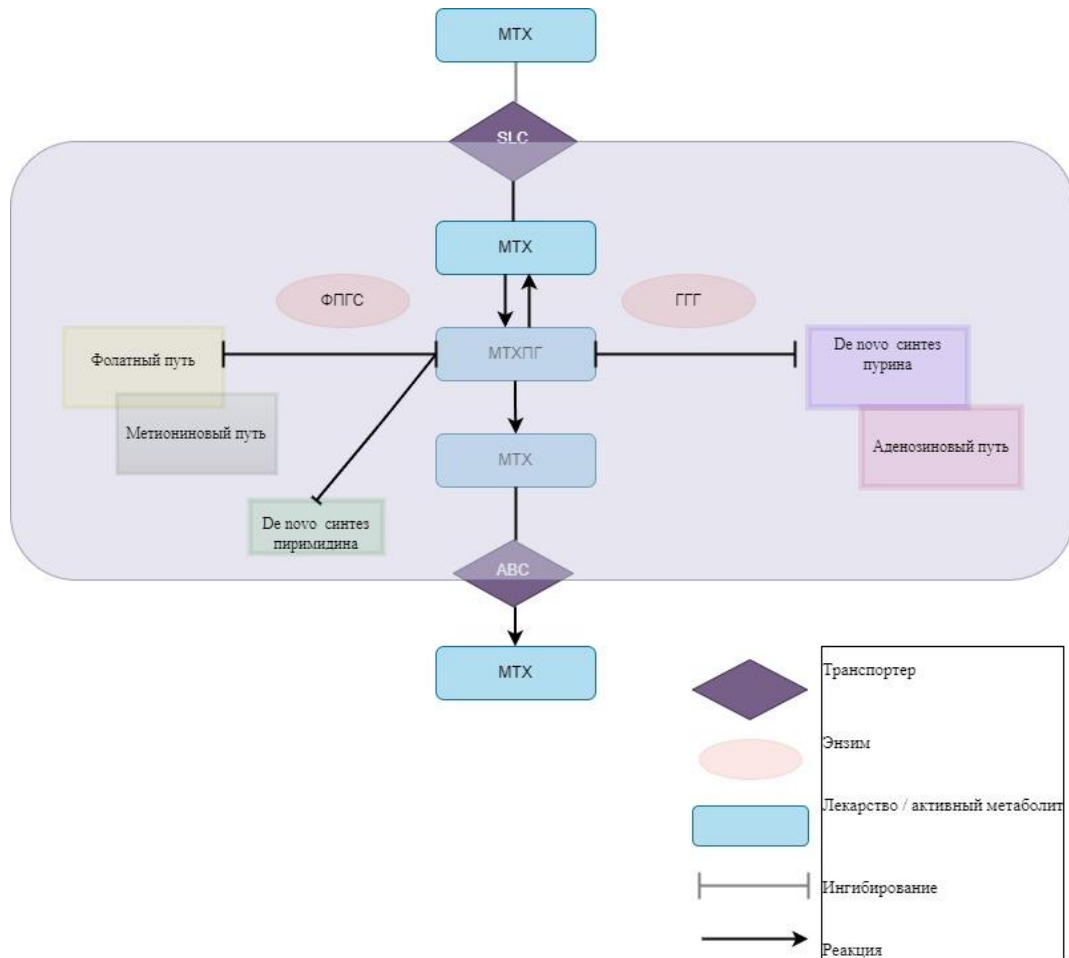
5) модулирование иммунных клеток, таких как Т-клетки и макрофаги, что приводит к изменению Т-клеточной опосредованной экспрессии цитокинов и молекул адгезии [67]. Аденозин-опосредованный эффект, является ключевым механизмом противовоспалительного действия МТХ. Тем не менее, МТХПГ оказывает влияние на иммунный хемотаксис и снижение уровня медиаторов воспаления. Устойчивое снижение ТГФ-опосредованного метилирования снижает накопление полиаминов (спермина и спермидина) во внеклеточных жидкостях и лимфоцитах пациентов. Эти полиамины являются важнейшими факторами клеточного роста, в том числе и в лимфоцитах. Действие МТХ ингибирует пролиферацию Т-клеток и синтез иммуноглобулинов, за чем следует локальное снижение продукции лимфоцитами интерферона (IFN)- γ и интерлейкина (ИЛ)-2, уменьшение воспаления, сходящееся к опосредованным аденозиновыми рецепторами эффектам [65, 66].

Метотрексат проникает через клеточную мембрану в обоих направлениях посредством трансмембранной транспортной системы, опосредованной белками-транспортерами. Эта система включает сеть белков-транспортеров, которые принадлежат двум основным суперсемействам: транспортерам (переносчикам) растворенных веществ (solute carrier – SLC), которые важны для распределения и клиренса МТХ, и АТФ-связывающим кассетным транспортерам (ATP-binding cassette – ABC) [54].

Первый и основной белок-транспортер называется восстановленным переносчиком фолиевой кислоты 1 (RFC-1) или членом 1 семейства 19 переносчиков растворенных веществ (SLC19A1) [34, 35, 68]. Нарушение функции этого транспортера лежит в основе резистентности к терапии МТХ.

Распространенный вариант *RFC-1 G80A*, связан со снижением транспортировки метотрексата внутрь клетки [36]. Laverdiere C. et al. показали, что у детей с ОЛЛ, получавших лечение по протоколам Dana-Farber Cancer Institute (доза МТХ 4000 мг/м²), с вариантом *RFC-1 G80A* прогноз хуже, чем у пациентов с генотипом GG, что проявляется увеличением частоты рецидивов и снижением бессобытийной выживаемости (БСВ) [37]. Однако, другие исследования не смогли выявить взаимосвязи между исходом заболевания и полиморфизмами гена *RFC-1* [38]. В более высоких дозах (5000 мг/м²) МТХ может проникать в клетки посредством пассивной диффузии, тогда полиморфизмы генов, приводящие к снижению опосредованного переносчиками притока, могут быть менее значимыми [39].

Внутри клеток МТХ превращается МТХПГ за счет последовательного присоединения остатков глутаминовой кислоты с помощью фермента фолиполигглутамат синтетазы (ФПГС). Процесс полиглутаминирования способствует персистенции МТХ в клетке, потенцируя его ингибирующее воздействие на фолатный, метиониновый и аденозиновый метаболические пути, а также синтез пуринов и пиримидинов *de novo*, что является ключевым звеном противовоспалительного и антипролиферативного терапевтического эффектов МТХ [44]. В то же время фермент γ -глутамил-гидролаза (ГГГ) способен отщеплять остатки глутаминовой кислоты от МТХПГ, что позволяет выводить МТХ из клетки при участии АВС-транспортеров. МТХПГ оказывает прямое ингибирующее действие на 3 основных фермента: тимидилат синтазу (ТУМС), DHFR и 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеотид трансформилазу (АТИС). ТУМС катализирует превращение дезоксиуридинмонофосфата (dUMP) в дезокситимидинмонофосфат (dTMP) в метаболическом пути синтеза пиримидинов *de novo*. Механизм действия метотрексата схематично представлен на рисунке 1 [43].



Левая часть рисунка представляет ингибирование метотрексатом пиримидинового синтеза de novo, а также фолатного и метионинового путей. Правая сторона рисунка показывает подавляющее действие МТХ в образовании пурина и аденозина de novo. Эти механизмы лежат в основе антипролиферативного и противовоспалительного эффекта МТХ. АВС - АТФ-связывающая кассета; МТХ - метотрексат; МТХПГ - полиглутамат Метотрексата; SLC - переносчик органических анионов растворенного вещества. ГГГ - гамма-глутамил гидролаза, ФЛГС - фолиполиглутамат синтетаза.

Рисунок 1 - Механизм действия метотрексата [47]

МТХ конкурентно ингибирует DHFR и истощает внутриклеточные запасы фолиевой кислоты, что приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот, которые необходимы для создания пуринов, тем самым подавляя пролиферацию опухолевых клеток и вызывая апоптоз [13, 45]. Ингибирующее действие МТХ на АТIC приводит к нарушению синтеза пуринов и повышению уровня внеклеточного аденозина, который проявляет выраженные

противовоспалительные медиаторные свойства [46]. Также предполагается, что через аденозиновый путь частично реализуется антипролиферативный эффект МТХ [47].

Из организма МТХ выводится преимущественно почками путем гломерулярной фильтрации и активной секреции в почечных канальцах. В этом процессе принимает участие ряд белков-переносчиков, имеющих сродство к МТХ (*SLC22A6*, *SLC22A8*, *SLC19A1*, *ABCG2*, *ABCC2*, *ABCC4*) [43, 44].

Около 10% МТХ выводится с желчью с последующей реабсорбцией в кишечнике. В желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) МТХ абсорбируется путем активного транспорта при помощи переносчика фолиевой кислоты и протон-сопряженного переносчика (расположены на апикальной базолатеральной мембране энтероцитов), кодируемых генами *SLC19A1* и *SLC46A1*. Биодоступность МТХ также зависит от переносчиков семейства ABC, которые транспортируют молекулы МТХ из энтероцитов в просвет ЖКТ (кодируются генами *ABCC2*, *ABCB1*, *ABCG2*) и в кровь (кодируются генами *ABCC3* и *ABCC4*). Системное выведение МТХ обеспечивается за счет клубочковой фильтрации и активной секреции из клеток почечных канальцев. В этом процессе участвуют белки, кодируемые генами *SLC22A6*, *SLC22A8*, *SLC19* [48, 49].

1.3 Фармакогенетические основы лекарственной токсичности

В работах Chanfreau-Coffinier C. et al. и Yu M.H.C. et al. было показано, что >90% людей имеют полиморфизмы генов, связанных с метаболизмом лекарственных средств [31, 32]. Множество современных клинических исследований изучают ФГ данные в попытке описать большую вариабельность ФК МТХ и улучшить терапевтические результаты. На сегодняшний день ФГ исследования выявили несколько генов, которые вносят существенный вклад в ФК МТХ и в основном относятся к генам фолатного пути (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и *DHFR*) и генам белков-транспортеров (*SLCO1B1*, *SLC19A1*, *OAT1* и *OAT3*).

Однако попытка использовать эти данные клинически сложна из-за огромного объема ФГ данных, которые существуют в базе Pharmgkb.org, описаны в проекте «1000 генов» [<https://www.internationalgenome.org/>]. Кроме того, в отношении некоторых генетических вариантов имеются противоречивые доказательства, что может затруднить их клиническое применение, в то время как другие гены-кандидаты не имеют надлежащего воспроизведения и валидации, необходимых для того, чтобы быть надежными предикторами ФК МТХ [40-42].

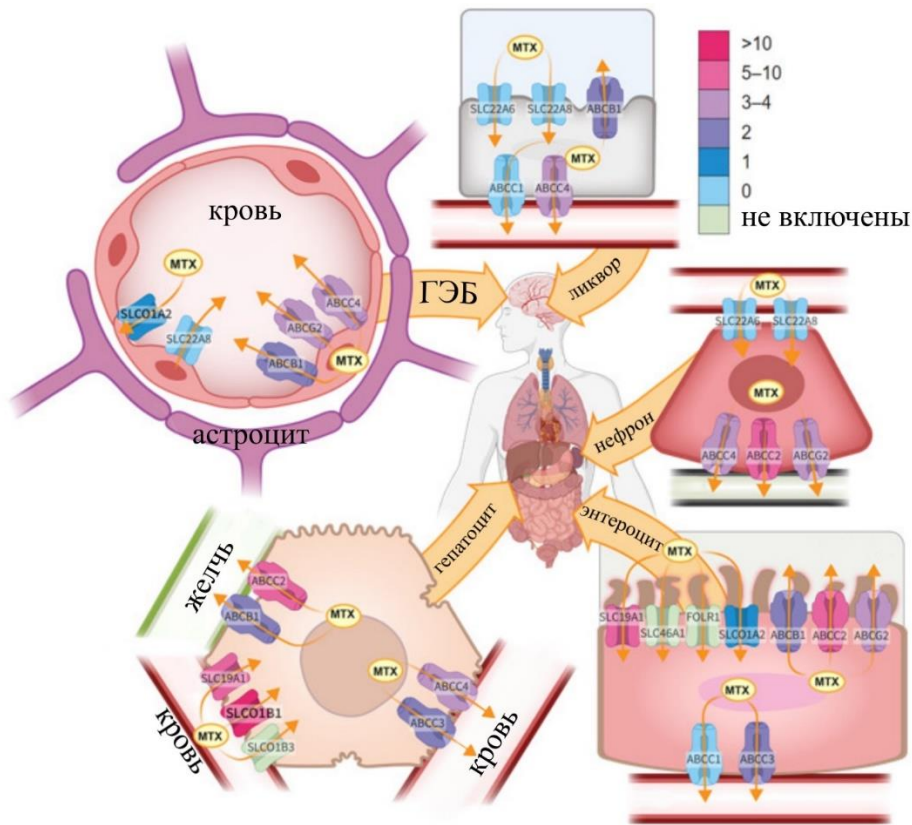
В систематическом обзоре Taylor Z.L. et al. использовалось руководство PRISMA для отбора и обобщения исследований геномных ассоциаций генов-кандидатов, в которых оценивалась связь между генетическими полиморфизмами и ФК МТХ у детей с острым лимфобластным лейкозом [3].

Как известно, белки-транспортеры экспрессируются в разных тканях и оказывают значительный эффект на фармакокинетику МТХ (его абсорбцию, распределение и элиминацию) [43, 44].

АТФ-связывающая кассета подсемейства В член 1 (ген *ABCB1*) кодирует АТФ-зависимый насос для выведения лекарств, также называемый геном множественной лекарственной устойчивости, экспрессируется в клетках печени, почек и ЖКТ [56]. MDR1 и MRP5, белки множественной лекарственной резистентности, кодируются высокополиморфными генами (*ABCB1* и *ABCC5*) [72].

Существуют данные о том, что транспортер MRP5 чрезмерно экспрессируется в клетках, составляющих гематоэнцефалический барьер головного мозга, это подтверждает гипотезу о том, что при некоторых полиморфизмах данных генов у пациентов с ОЛЛ нередко возникают рецидивы в центральной нервной системе (ЦНС) [73].

На рисунке 2 представлено большинство известных генов белков-транспортеров, участвующих в ФК МТХ.



Транспортеры со сходной функцией сгруппированы по форме. Цветовая схема для транспортеров отражает количество исследований, в которых была обнаружена значимая ассоциация с воздействием MTX.

MTX – метотрексат, CSF – цереброспинальная жидкость, ГЭБ - гематоэнцефалический барьер, ABC - АТФ-связывающая кассета; SLC - переносчик органических анионов растворенного вещества. Белки-переносчики, участвующие в элиминации MTX из организма почками - *SLC22A6*, *SLC22A8*, *SLC19A1*, *ABCG2*, *ABCC2*, *ABCC4*. Белки-переносчики, влияющие на абсорбцию MTX в ЖКТ - *SLC19A1*, *SLC46A1*. Переносчики семейства ABC, транспортирующие молекулы MTX из энтероцитов в просвет ЖКТ - *ABCC2*, *ABCB1*, *ABCG2*, и в кровь - *ABCC3* и *ABCC4*. В процессе системного выведения MTX за счет клубочковой фильтрации и активной секреции из клеток почечных канальцев участвуют белки - *SLC22A6*, *SLC22A8*, *SLC19*.

Рисунок 2 - Гены белков-транспортеров, участвующие в ФК MTX [3]

Ассоциация полиморфизмов гена *ABCB1* с ФК MTX была изучена в пяти различных рандомизированных проспективных клинических исследованиях. Наиболее часто изучаемым SNP был rs1045642, в четырех исследованиях было выявлено снижение клиренса MTX, связанное с этим генотипом [35, 36, 54, 60], а генотипы *ABCB1* rs1045642 СТ и ТТ имели статистически значимую корреляцию с БСВ ($p < 0,05$, $p < 0,05$, соответственно) [36], в другом исследовании не было

обнаружено ассоциации SNP с БСВ [37]. Кроме того, была установлена статистически значимая ($p < 0,05$) ассоциация между нейтропенией (абсолютное количество нейтрофилов < 500 кл/мкл) и носительством полиморфизмов генов *ABCB1* rs1045642 (OR=5,174; 95% ДИ: 1,674-15,989) и *ABCB1* rs1128503 (OR=3,364; 95% ДИ: 1,257-9,004), соответственно [61].

Аномальная функция любого из ферментов и транспортеров в фолатном метаболическом пути (ФМП), обусловленная генетическими абберациями, может влиять на эффективность и токсичность препарата МТХ и приводить к нежелательным реакциям [54, 55]. Фармакогеномика изучает влияние индивидуального генетического профиля на терапевтический ответ пациента [56]. Было обнаружено, что многочисленные варианты генов-кандидатов связаны с ответом на терапию МТХ, прогнозом при ОЛЛ и вероятностью токсических явлений. В нескольких исследованиях было установлено, что полиморфизмы в *DHFR*, *MTHFR*, *TYMS*, *SLC19A1* и *SLCO1B1* значимо ассоциированы с показателями БСВ при ОЛЛ [12-13]. Пациенты с полиморфизмами в гене, кодирующем фермент МТНFR также подвержены высокому риску развития лекарственно-индуцированного поражения печени, вызванного даже низкими дозами МТХ [74, 75]. В таблице 2 представлены характеристики и предполагаемые эффекты SNPs в функциях и транспорте МТХ. Далее описаны не менее важные гены ферментов и их значение в ФК МТХ.

Таблица 2 - Характеристики и предполагаемые эффекты SNPs в транспорте МТХ [44]

Гены	Локализация	Хрома*	rs	Алели	Регион (изменения аминокислоты)	Функции и транспорт МТХ	Ссылки
<i>SLC16A</i>	Почки	12	rs3763980	A>T	Экзон (Thr445Ser)	ТТ: ↓ приток	[144]

Продолжение таблицы 2

			rs1087733 3	T>G	Интрон	†	[145]
<i>SLC19A1</i>	Повсеместно	21	rs7499	G>A	3'-UTR	†	[146]
			rs1051266	G>A	Экзон (Arg27His)	AA: ↑ приток	[147]
			rs1131596	T>C	5'-UTR	CC: ↓ приток	[147]
			rs2838956	A>G	Интрон	†	[145]
			rs3788200	G>A	Интрон	†	[145]
<i>SLC22A6</i>	Почки	11	rs1156862 6	C>T	Экзон (Arg50His)	TT: ↓ приток	[148]
<i>SLC22A8</i>	Почки	11	rs4556603 9	C>A	Экзон (Arg149Ser)	AA: ↓приток	[149]
<i>SLC22A1</i>	Почки	11	rs1123180 9	T>A	Интрон	AA: ↑ клиренс	[149]
<i>SLC46A1</i>	Кишечник	17	rs2239907	G>A	3'-UTR	†	[145]
<i>SLCO1A2</i>	Почки	12	rs1084179 5	T>C	Экзон (Ile13Thr)	CC: ↑ приток	[150]
<i>SLCO1B1</i>	Печень	12	rs2306283	A>G	Экзон (Asn130Asp)	GG: ↑ приток	[79]
			rs4149056	T>C	Экзон (Val174Ala)	CC: ↓ приток и клиренс	[79]
			rs5638722 4	A>G	Экзон (Asn432As)	GG: ↓ приток	[151]
<i>SLCO1B3</i>	Печень	12	†	NA	NA	NA	[150]
<i>FOLR1</i>	Везде	11	†	NA	NA	NA	[145]

Продолжение таблицы 2

<i>ABCB1</i> <i>ABC20;</i>	Кишечник печень	7	rs1045642	C>T	Экзон (Ile1145Ile)	ТТ: ↓ отток	[152]	
	почки		rs1128503	C>T	Экзон (Gly412Gly)	†	[145]	
			rs2032582	G>A /T	Экзон (Ala899Ser/ Thr)	A/T аллели: ↓ отток	[142]	
<i>ABCC1</i>	Кишечник	16	rs35592	T>C	Инtron	†	[150]	
			rs246240	A>G	Инtron	†	[145]	
			rs2074087	G>C	Инtron	†	[145]	
			rs2230671	C>G	Экзон (Ser1334Ser)	GG: ↑ отток	[150]	
			rs3784864	G>A	Инtron	†	[145]	
<i>ABCC2</i>	Кишечник печень	10	rs717620	G>A	5'-UTR	AA: ↑ клиренс	[144]	
			rs2273697	G>A	Экзон (Val417Ile)	AA: ↑ отток	[144]	
			rs4148396	C>T	Инtron	†	[145]	
<i>ABCC3</i>	Кишечник печень	17	rs4793665	C>T	5'-UTR	ТТ: ↓ отток	[44]	
<i>ABCC4</i>	Печень, Почки	13	Нет данных					[44]
<i>ABCG</i> 2	Кишечник печень, почки	4	rs2231142	C>A	Экзон	AA: ↓	[136]	
			rs13120400	T>C	(Gln141Lys)	отток	[145]	
			rs17731538	G>A	Инtron Инtron	† †	[145]	

Продолжение таблицы 2

ABCG 2	Кишечник печень, почки	4	rs2231142	C>A	Экзон	AA: ↓	[136]
			rs13120400	T>C	(Gln141Lys)	отток	[145]
			rs17731538	G>A	Интрон Интрон	† †	[145]

Обозначения: * хромосома; † неизвестно; ↑ повышение; ↓ снижение; ABC: АТФ-связывающая кассета; NA (Not assigned) - нет данных; OAT - транспортер органических анионов; OATP - полипептид, транспортирующий органические анионы; PCFT - протон-связанный транспортер фолата.

В таблице 3 представлены основные гены фолатного пути, значимо влияющие на ФК МТХ.

Таблица 3 - Гены фолатного пути, значимо влияющие на фармакокинетику МТХ [3]

Ген	SNP	Эффект на ФК МТХ	Ссылки
<i>ARID 5B</i>	rs4948496	↑	[5]
<i>GGH</i>	rs3758149	↑	[97,85,68]
<i>FPGS</i>	rs1544105	↓	[86, 99, 100, 101]
<i>MTHF D1</i>	rs2236225	↓	[101, 102,89]
<i>MTHF R</i>	rs18011 33	↑ ↓ *	[103, 90, 104, 105, 91, 82, 106, 18, 88, 96*, 89*]
<i>TYMS</i>	rs2790	↓	[95]
<i>TYMS</i>	rs34743033	↓	[77, 93, 94, 95, 96]

Обозначения: в подчеркнутых ссылках обнаружена значимая ассоциация между SNP гена белка-переносчика и воздействием метотрексата; * - указывает на исследования, показавшие снижение эффективности МТХ при наличии противоречивых данных о варианте SNP гена белка-переносчика; ↑ указывает на то, что вариант ассоциирован с повышением токсического воздействия МТХ; ↓ указывает на то, что данный вариант связан с уменьшением токсического воздействия МТХ.

ATIC

Ген 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид трансформилазы (*ATIC*) кодирует бифункциональный фермент, катализирующий два последних этапа пуринового пути *de novo* [77]. В трех исследованиях геномных ассоциаций, связанных с клиренсом МТХ [60, 78, 79], не было обнаружено значения *ATIC*. Одно исследование, посвященное полиморфизму аллеля *ATIC* 347 C > G, представило вывод о нулевом влиянии вариантов на более высокие концентрации препарата через 48 часов от введения [80].

ARID5B

ARID5B кодирует член семейства ДНК-связывающих белков с доменом взаимодействия AT-rich (*ARID*). Этот белок широко экспрессируется в большинстве типов тканей и, в основном, связан с адипогенезом [77]. Выполняет функцию транскрипционного модулятора и регулирует экспрессию генов [82]. *ARID5B* также участвует в росте и дифференцировке клеток-предшественниц В-лимфоцитов и ассоциирован с развитием и рецидивом ОЛЛ. Однако основные механизмы, посредством которых ген *ARID5B* влияет на результаты лечения, остаются неясными. В настоящее время предполагается, что результат лечения связан с чувствительностью опухолевой клетки к антиметаболитам, включая 6-меркаптопурин и МТХ. Пять исследований включали SNPs в *ARID5B* [5,82, 60, 78, 79], и только два из этих исследований показали, что SNPs достигли порога статистической значимости.

DHFR

Исследования GWAS [49-51, 17, 54, 81] не выявили доказательств того, что полиморфизмы *DHFR* связаны с ФК МТХ. При анализе полиморфизмов в промоторной области гена *DHFR* показано, что дети с ОЛЛ, носители генотипа -680AA (rs442767), чаще имели эпизоды тяжелой нейтропении и, соответственно, перерывы в лечении в сравнении с носителями CC и CG генотипов на этапе поддерживающей терапии [41].

GGH

Гамма-глутамил гидролаза (ГГГ) – это лизосомальная пептидаза, которая гидролизует гамма-связанные полиглутаматы на производные фолата, превращая длинноцепочечные полиглутаматы МТХ в короткоцепочечные. Таким образом, модуляция *GGH* может влиять на химиочувствительность бластных клеток, а экзогенные уровни фолатов могут дополнительно изменять этот эффект [77]. В четырех GWAS - исследованиях изучались пять полиморфизмов *GGH* (rs11545078, rs11545077, rs1800909, rs11545076, rs3758149) в контексте ФК МТХ [20,67,68,83]. Отмечена достоверная ассоциация аллеля ТТ полиморфизма rs3758149 со снижением клиренса МТХ в сравнении с диким типом СС [20,67].

FPGS

Ген *FPGS* кодирует фермент фолилполиглутамат синтетазу (ФПГС), которая отвечает за превращение МТХ в МТХПГ. Потеря его функции ведет к снижению внутриклеточной концентрации МТХПГ и приводит к лекарственной устойчивости [84]. В трех исследованиях [83, 85,70] сообщалось, что генотип GG варианта rs1544105 ассоциирован с незначительным снижением концентрации МТХ в сыворотке крови через 24 часа по сравнению с генотипами AA и AG. Исследование Huang Z. [83] показало, что генотип rs1544105 значительно влияет на концентрацию МТХ через 24 часа после начала инфузии HD-МТХ. При этом эффективность химиотерапии оказалась выше у пациентов с генотипом AA, для которого характерен более высокий уровень МТХ [83].

MTHFD1

Ген трифункционального фермента метилентетрагидрофолат дегидрогеназы (*MTHFD1*) активно экспрессируется в гепатоцитах [77]. Фермент катализирует восстановление тетрагидрофолата в трех последовательных реакциях, все три производных входят в одноуглеродный пул фолата и необходимы для биосинтетических процессов [87]. Полиморфизм rs2236225 ассоциируется с ФК МТХ, но результаты исследований были противоречивыми [5, 88, 89].

MTHFR

Фермент метилтетрагидрофолат редуктаза (*MTHFR*) необходим для преобразования токсичного гомоцистеина в метионин. Ген этого фермента экспрессируется в большинстве клеток человека, но он не принимает непосредственного участия в транспорте МТХ [77]. Была выдвинута гипотеза, что снижение экспрессии гена *MTHFR* связано с токсичностью МТХ у пациентов с ОЛЛ, но клинические исследования показывают противоречивые результаты [90]. Аллель Т в SNP rs1801133 вызывает замену аланина на валин в белке, что приводит к снижению активности фермента *MTHFR*. Второй наиболее изученный SNP, rs1801131, был включен в 17 исследований генов-кандидатов, но ни одно из этих исследований не выявило клинически значимой ассоциации между элиминацией МТХ и этим SNP [45, 46, 57, 59, 84, 85].

MTR

5-метилтетрагидрофолат (5-метил-ТНФ) - витамин В12-зависимый фермент, также вовлечен в процесс элиминации фолатов. Он катализирует метилирование гомоцистеина до метионина с одновременным превращением 5-метилтетрагидрофолата (5-метил-ТГФ) в тетрагидрофолат (ТГФ) [77]. Ранее считалось, что вариант rs1805087 гена *MTR* ассоциирован с МТХ-токсичностью. Однако ни одно из представленных исследований GWAS не смогло установить ассоциацию между *MTR* и ФК МТХ.

MTRR

5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин метилтрансфераза - редуктаза (*MTRR*) участвует в метилировании гомоцистеина до метионина [77]. Было исследовано семь вариантов гена *MTRR*. В исследовании Den Hoed et al. показано, что варианты rs1801394 (AG и GG) связаны со значительно более низкими концентрациями МТХ через 24 часа после введения препарата по сравнению с диким типом AA [91]. Исследование не выявило различий в концентрации МТХ через 48 ч, предполагая, что аллель G варианта rs1801394 остается связанной с повышенным клиренсом МТХ. Метаанализ Maagdenberg H. et al. показал, что

полиморфизм *MTRR* с.66A>G ассоциирован с развитием мукозита у пациентов, получавших терапию MTX [90].

TYMS

Фермент тимидилат синтаза (*TYMS*) необходим для производства пуринов при синтезе ДНК [93]. *MTHFR* ингибирует этот фермент и тем самым предотвращает перенос одного углерода от 5,10-метилентетрагидрофолата к дезоксиуридинмонофосфату (dUMP) при образовании дезокситимидинмонофосфата (dTMP). Низкая экспрессия гена *TYMS* в бластных клетках связана со снижением антилейкемического эффекта MTX и повышением риска рецидива [94]. *TYMS* повсеместно экспрессируется в тканях человека, считается, что он важен для основных клеточных функций, но непосредственно в транспорте MTX не участвует [77]. Сочетание повышенной экспрессии *TYMS* (тандемный повтор x 3) и сниженной функции *MTHFR* (гомозиготного по аллелю 677T) было связано с повышенным риском гематологической токсичности, вызванной MTX, но не с концентрацией MTX в плазме [89]. Только в двух исследованиях была обнаружена ассоциация между SNPs в *TYMS* и выведением MTX [95, 96].

1.4 Нежелательные и токсические реакции при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей

Исследователи Taylor Z.L., Vang J., Lopez-Lopez E., et al. отмечают значительную межиндивидуальную вариабельность лекарственной токсичности и исходов заболевания, что определяет роль ФГ в выявлении полиморфизмов генов-кандидатов (SNP) для оптимизации лечения ОЛЛ [3, 8].

Основной механизм развития токсичности MTX обусловлен его неизбирательным воздействием на клетки организма. Действие на ферменты-участники фолатного цикла ингибирует синтез нуклеиновых кислот, необходимых для пролиферации не только опухолевых, но и нормальных клеток,

что оказывает негативный эффект преимущественно на те органы и ткани, для которых характерна высокая пролиферативная активность. Это способствует развитию кожной токсичности, мукозитов, гепатотоксичности, цитопении [11, 12, 13, 44].

Длительная терапия и кумулятивная доза МТХ способствуют накоплению внутриклеточных метаболитов МТХ в печени, что вызывает окислительный стресс (ОС), воспаление и фиброз [71]. Полиглутаматные формы МТХ являются активными метаболитами, которые запускают процессы ОС за счет активации перекисного окисления липидов. Избыток свободных радикалов вызывает дегенерацию клеточной мембрану гепатоцитов и высвобождение внутриклеточного содержимого во внеклеточное пространство, что может объяснять МТХ-индуцированную гепатотоксичность, проявляющуюся повышением АСТ и АЛТ в сыворотке крови [20]. Поэтому мониторинг уровня МТХПГ рассматривается как потенциальный маркер для исследования токсичности, вызванной МТХ [69].

Вариабельность проявлений токсических эффектов МТХ у разных пациентов может быть обусловлена полиморфизмами белков-переносчиков в различных тканях, которые отвечают за транспорт МТХ через клеточную мембрану и его элиминацию. От скорости этих процессов может зависеть продолжительность экспозиции МТХ в клетке и, как следствие, выраженность проявлений токсичности [25]. Вклад в развитие токсичности может также вносить различная активность ферментов, вовлеченных в метаболизм МТХ, или его производных (подробнее описанных ранее: АТIC, DHFR, FPGS, GGN, MTHFR, MS, MSP, TYMS). Одним из наиболее важных ферментов является MTHFR. Нарушение соотношения различных производных фолиевой кислоты вследствие изменения активности MTHFR, в частности неполное превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, может влиять на устойчивость клеток к действию МТХ и повышать риск развития токсичности [6, 18].

Помимо гастроинтестинальной токсичности, гематологическая токсичность (ГемТ) является одной из наиболее часто регистрируемых НЛР, связанных с применением МТХ. Возможным объяснением этого является то, что МТХ, регулируя сигнальный путь Wnt/ β -катенин, индуцирует дифференцировку мезенхимальных клеток в адипоциты, способствуя развитию ГемТ. Миссенс-мутации в *MTHFR* (С677Т и А1298С) ассоциируются со снижением активности фермента [81]. Пациенты детского возраста с генотипом С677Т имеют риск развития гематологической токсичности примерно в шесть раз выше, чем с другими вариантами гена [94].

Мукозит также является частым токсическим проявлением, вызванным МТХ. Патофизиологические механизмы развития мукозита сложны, но, известно, что агенты, повреждающие ДНК, такие как химиотерапия и ионизирующее излучение, индуцируют апоптотические факторы транскрипции, включая p53, NF- κ B и Wnt51, которые приводят к активации апоптоза и, следовательно, могут сопровождаться токсичностью со стороны слизистых оболочек [91, 92, 161].

Среди всех токсических эффектов почечная токсичность имеет наименьшую распространенность вследствие быстрого клиренса МТХ почками [159]. Кроме того, это объясняется тем, что большинство пациентов одновременно получают другие препараты, включая цисплатин, пенициллины, нестероидные противовоспалительные средства и сульфаниламиды, которые снижают канальцевую секрецию лекарственных препаратов [160].

Систематический анализ Gharibi S. et al. показал, что ГепТ является наиболее частой НЛР, вызванной МТХ, что не согласуется с данными других исследований [162, 13, 97, 109]. В работах, проведенных Kotur N. et al. [54] и Esmaili M.A. et al. [13], было показано, что ГепТ является частой МТХ-обусловленной токсичностью, и высказано предположение, что мутация в гене *SLC19A1* увеличивает вероятность ее развития. Данная мутация влияет на транспорт МТХ, поэтому препарат накапливается внутри клетки и усиливает

ГепТ [13,54]. Результаты исследования Gharibi S. et al. показали, что мукозит, нейро-, нефро- и почечная токсичности были дозозависимыми [162].

В настоящее время проводится большое число исследований для поиска лабораторных и молекулярных биомаркеров МТХ-индуцированной токсичности [12,13,15-19]. В ряде исследований изучалась концентрация МТХ в плазме крови как суррогатный маркер токсичности МТХ в связи с вариантами генов белков-транспортеров МТХ, не принимая во внимание клинические признаки токсичности, связанной с МТХ [16,18]. Другие исследования касались лабораторных и клинических особенностей пациентов для определения тяжести токсичности МТХ, большинство из которых включали небольшое число пациентов с ОЛЛ. Мета-анализы, включавшие варианты фармакогенов *MTHFR*, *TYMS* и *SLC19A1* [20-23, 53], не могли достоверно опровергнуть или подтвердить связь анализируемых вариантов в качестве фармакогеномных маркеров МТХ и токсичности при лечении ОЛЛ.

1.5 Перспективы использования фармакогенетического тестирования при лечении острого лимфобластного лейкоза

Современные программы лечения ОЛЛ у детей являются высокоэффективными, но сопровождаются развитием токсических реакций. В результате анализа GWAS (Genome Wide Association Studies) генов-кандидатов было выявлено множество наследственных генетических вариантов, связанных с межиндивидуальной вариабельностью токсичности и исходами лечения ОЛЛ. GWAS подразумевает полногеномное исследование ассоциаций, анализ частоты встречаемости аллелей различных генов, если при сравнении полиморфизмов генов внутри выборки некоторые аллели встречаются у людей с исследуемым фенотипом значительно чаще, чем другие, именно их считают «ответственными» за проявление этого фенотипа (при этом значение p -value должно быть очень низким, ориентировочно 10^{-7} – 10^{-8}) [11].

Для воспроизведения некоторых результатов необходимы дальнейшие исследования, а для внедрения этих тестов в клиническую практику требуется более тесная совместная работа молекулярных биологов, генетиков и онкологов/гематологов. Несмотря на все имеющиеся рекомендации и руководства, доказательства клинической пользы, ФГ-тестирования при ОЛЛ у детей еще не скоро войдет в рутинную диагностику. Препятствиями на пути к практическому применению ФГ-тестирования служат низкая информированность врачей о методике, высокая стоимость исследований, необходимость высококвалифицированных кадров и одобрение метода протокольными комитетами, поскольку терапия ОЛЛ у детей проводится по утвержденным в лечебной организации протоколам. Тем не менее, практическая значимость ФГ-тестирований очевидна – от индивидуального дозирования лекарственных препаратов (с учетом полиморфизмов генов, определяющих метаболизм и клиренс цитостатиков) до направленного предварительного сопроводительного лечения ожидаемой токсичности.

Подобный подход принят рядом академических клиник США (St. Jude) [52] и в настоящее время проводится крупномасштабное мультицентровое исследование в Европе [54]. Научная группа из Детского исследовательского госпиталя Святого Иуды (St. Jude Children's Research Hospital) разработала системный подход к терапии ОЛЛ и включила ФГ-тестирование полиморфизмов генов *TPMT*, *CYP2D6*, *SLCO1B1* и *CYP2C19* в последнюю модификацию протокола терапии ОЛЛ (PG4KDS), продемонстрировав возможность и необходимость применения ФГ-тестов в клинической практике [14, 52].

Управление по контролю за продуктами и лекарствами (Food and Drug Administration, FDA) и Консорциум по внедрению клинической фармакогенетики (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC) рекомендуют проводить генетическое тестирование *TPMT* всем пациентам, которые будут получать лечение высокими дозами МТХ и 6-МР, чтобы предотвратить

выраженную гематологическую токсичность путем своевременного титрования дозировок данных препаратов [53].

Также следует отметить, что протокол ALL IC-BFM 2009 (пункт 1.3.1, Appendix 5) предполагает проведение исследований полиморфизмов генов с целью возможной модификации терапии. В настоящее время существует достаточно данных для двух генов, участвующих в метаболизме тиопуринов - тиопуринметилтрансферазы (TPMT) и нудикс-гидролазы 15 (NUDT15) – для принятия решений о дозировке препаратов.

Среди препятствий, которые мешают внедрению ФГ-тестирования в России, – недостаточное признание клинической эффективности, высокая стоимость молекулярно-генетических исследований, опасения по поводу этических последствий, а также технические трудности и доступность тестов. Безусловно, одной лишь фармакогеномики недостаточно для объяснения всей вариабельности эффектов химиотерапии, однако нет сомнений в необходимости инновационных подходов для дальнейшего повышения выживаемости пациентов при одновременном снижении неблагоприятных последствий противоопухолевого лечения [9, 10].

Тем не менее, ученые всегда обращали внимание, что пациенты с одинаковым диагнозом, соматическим статусом, получавшие одинаковую дозировку МТХ, имели различные токсические эффекты и степень их проявлений. По мере развития цитогенетических, молекулярно-генетических основ изучения фармакологических эффектов МТХ, стало понятно, что в основе межиндивидуальной вариабельности токсических эффектов лежат полиморфизмы генов белков-транспортёров, преимущественно фолатного пути. Проводимые исследования, направленные на выявление полиморфизмов и коррекцию нежелательных реакций чрезвычайно редки, особенно в Российской Федерации, и оценивают, в большей степени, взрослую когорту больных. В связи с чем крайне важны исследования, анализирующие ФГ основы токсичности МТХ у детей с целью дальнейшей индивидуализации лечения и снижения побочных эффектов

терапии высокодозным МТХ. Подобные исследования могут привести к улучшению терапевтических результатов путем внесения изменений в клинические протоколы или разработке инструментов поддержки принятия клинических решений [16].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование выполнено на базе НИИ детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова (НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Протокол лечения ОЛЛ ALL IC-BFM 2002 является клинической рекомендацией Минздрава России. Протокол ALL IC-BFM 2009 широко применяется в странах Европы, Азии и Латинской Америки, утвержден на заседании Ученого совета и Протокольного комитета НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Протокол анализа фармакогенетических параметров токсичности утвержден на заседании Ученого совета НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол №4 от 17.11.2021г). Все процедуры проводились с учетом национального законодательства (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика»), правил Качественной Клинической Практики (Good Clinical Practice — GCP) и международных этических норм (Хельсинкская Декларация Всемирной Медицинской Ассоциации, последние изменения внесены на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г).

2.1 Критерии отбора и общие клинико-терапевтические характеристики участников исследования

Набор клинического материала проводился на базе НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Определение полиморфизмов генов-транспортеров выполнялось на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Критерии отбора SNPs были следующими: частота минорных аллелей >5%, гены, соответствовавшие равновесию Харди–Вайнберга (HWE) и уровень доказательности ранее опубликованных исследований (Таблица 4).

Таблица 4 - Распределение генотипов изученных полиморфных вариантов генов у пациентов с расчетом соответствия равновесию Харди-Вайнберга (n=124)

Полиморфизмы гена	Генотип	Абс.знач.	%	Хи-квадрат	p
<i>ABCBI</i> C3435T rs1045642	CC	35	28,2	2,0645	0,1508
	TC	54	43,5		
	TT	35	28,2		
rs1128503	TT	28	22,6	2,6828	0,1014
	CT	52	41,9		
	CC	44	35,5		
rs2032582	GG	51	41,1	8,8569	0,0029
	GT	44	35,5		
	TT	29	23,4		
rs4148738	TT	52	41,9	9,8428	0,0017
	CT	43	34,7		
	CC	29	23,4		
<i>SLCO1B1</i> T521C rs4149056	TT	92	74,2	0,1543	0,6944
	TC	29	23,4		
	CC	3	2,4		

При отборе пациентов для исследования были сформулированы критерии включения и невключения.

Критерии включения в исследование: дети (возраст от 7 месяцев до 18 лет) с ОЛЛ, получившие терапию препаратом МТХ в рекомендованных терапевтических дозировках согласно протоколу ALL IC-BFM 2009 (*Приложение*

1) на базе НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Критерии исключения: выраженная соматическая патология (печени, почек, сердечно-сосудистой и нервной систем), препятствующая проведению программной химиотерапии; психотическое состояние или тяжелое психическое заболевание в анамнезе (шизофрения, эпилепсия, биполярное расстройство и т.п.), способное влиять на согласие и возможность больного участвовать в исследовании; одновременный прием препаратов, влияющих на фармакокинетику и/или фармакодинамику МТХ (аспирин, пенициллины, пробеницид, тимидин, дазатиниб, иматиниба мезилат, омепразол, триметоприм, вальпроат). При оценке значимых межлекарственных взаимодействий с МТХ использовался бесплатный сервис www.drugs.com.

Период включения в исследование пациентов с установленным диагнозом ОЛЛ в НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 15 марта 2021 г. по 29 ноября 2022 г., наблюдение завершено 13 сентября 2023г. Медиана наблюдения 42 месяца (минимальный срок наблюдения 5 месяцев, максимальный 90). Проводился анализ данных анамнеза, первичных осмотров, дневников клинического наблюдения за больными, результатов лабораторных и диагностических исследований (общий, биохимический анализ крови, коагулограмма, сывороточная концентрация МТХ), проведенной лекарственной терапии, результатов лечения и рекомендаций на амбулаторном этапе, отраженных в выписных эпикризах (Таблица 5).

Диагноз ОЛЛ был установлен в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2016г [2] и критериями протокол ALL IC-BFM 2009 (Приложение 1).

В ходе проведения исследования была проанализирована 131 история болезни пациентов, получавших терапию по протоколу ALL IC-BFM 2009 на базе НИИ ДОиГ им. Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Таблица 5 - Клинические и терапевтические характеристики пациентов, вошедших в исследование

Параметр	Число пациентов (n=124)	
	Абс.знач.	%
Пол: женский мужской	54 70	43,5 56,5
Возраст (медиана, лет)	7	
Иммуноподвариант ОЛЛ В-линейный Т-линейный	84 40	67,7 32,3
Группы риска: Стандартная Средняя Высокая	9 60 55	7,2 48,4 44,4
Гиперлейкоцитоз: есть нет	22 102	17,7 82,3
ЦНС-1 статус ЦНС-2 статус ЦНС-3 статус	108 6 10	87,1 4,8 8,1
Цитогенетическое исследование: не проводилось без стратифицирующих аберраций t(12;21)(p13;q22) гиперплоидный клон <i>MLL (KMT2A)</i> - ассоциированные аберрации t(9;22) (q34;q11) Ph-like (перестройки гена <i>CRFL2</i>) перестройка гена <i>ETV6</i> t(6;11)(q27;q23) t(11;19)(q23; p13.3) перестройка гена <i>NTRK3</i> t(10;11)(p12;q14) с перестройкой гена <i>PICALM</i> t(1;14)(p32;q13) делеция 3'-конца гена <i>LMO2</i> перестройка гена <i>TCRb</i>	41 48 10 5 5 2 3 2 1 1 1 2 1 1 1 1	33,1 38,7 8,1 4 4 1,6 2,4 1,6 0,8 0,8 0,8 1,6 0,8 0,8 0,8

Продолжение таблицы 5

Статус ремиссии на 33 день терапии		
не достигнута	21	17
клинико-гематологическая	53	42,7
полная (МОБ-негативная)	50	40,3
Доза МТХ		
1 г/м ²	18	14,5
2 г/м ²	41	33,1
5 г/м ²	65	52,4
Результаты терапии в группе пациентов с рецидивом ОЛЛ (n=18)		
алло-ТГСК	11	61
смерть:	9	50
- после ТГСК	3	16,6
- прогрессия	6	33,4
ремиссия	9	50
Результаты терапии в группе первичных пациентов (n=106)		
алло-ТГСК	13	12,2
смерть:	7	6,6
- прогрессия	3	2,8
- от несвязанных с ОЛЛ причин	4	3,7
рецидив	7	6,6
рефрактерное течение	6	5,6
вторая опухоль (ОЛЛ про-В	1	0,9
иммуноподвариант 2014 г., ОЛЛ пре-пре-В		
иммуноподвариант, Ph-like в 2021 г.)	99	93,4
ремиссия		
Результаты терапии во всей выборке пациентов (n=124)		
ремиссия	108	87,1
событие	36	29
рецидив	25	20,2
рефрактерное течение	6	5
вторая опухоль	1	0,8
смерть:	16	12,9
- из них после рецидива	12	9,7
- от несвязанных с рецидивом причин	4	3,2

Согласно критериям исследования, 7 (5,3%) пациентам было выполнено ПЦР исследование периферической крови для выявления полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1*, но пациенты были исключены из исследования, в связи с изменением тактики терапии (иммунохимиотерапия препаратом блинатумомаб в группе среднего риска) и вступлением в другое пилотное исследование после завершения этапа индукции по протоколу ALL IC-BFM 2009. Таким образом, 7 (5,3%) больных не получили терапию HD-MTX.

2.2 Дизайн исследования

Проведен проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках поискового обсервационного одноцентрового исследования, дизайн которого представлен на рисунке 3.



Рисунок 3 - Схема дизайна диссертационного исследования

2.3 Критерии и определения осложнений, включенных в анализ токсичности при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу ALL IC-BFM 2009

Профиль токсичности на этапах терапии с включением HD-MTX по протоколу ALL IC-BFM 2009 был определен у 124 пациентов. Для определения степеней нежелательных лекарственных реакций (НЛР) применялись оценка состояния больного с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) боли и лабораторные методы с использованием шкалы NCI (CTCAE v5.0 2018 года; таблица 6 [88]).

В анализ гематологической токсичности (ГемТ) были включены: нейтропения (нейтрофилы $< 1 \times 10^9/\text{л}$) - миелотоксический агранулоцитоз (МТА) и анемия (гемоглобин < 80 г/л) 3-4 степени, тромбоцитопения (тромбоциты - $< 25 \times 10^9/\text{л}$) 4 степени согласно NCI CTCAE (CTCAE v5.0 2018 года).

Гепатотоксичность (ГепТ) была диагностирована с помощью исследования биохимического анализа крови, при повышении АЛТ и/или АСТ в 1,5 и более раз от верхней границы нормы (ВГН): 1 степень 1,5-3 нормы от ВГН. 2 степень 3-5 норм от ВГН, и/или щелочной фосфатазы. 3 степень 5-20 норм от ВГН. 4 степень > 20 норм от ВГН, общего билирубина - в 1 и более раз от ВГН: 1 степень 1-1,5 нормы от ВГН, 2 степень 1,5-3 норм от ВГН, 3 ст. 3-10 норм от ВГН, 4 степень > 10 норм от ВГН.

Почечная токсичность (ПТ) так же определялась с помощью исследования биохимического анализа крови, при повышении креатинина в 1,5 и более раз от ВГН: 1 степень - 1,5 нормы от ВГН, 2 степень - 1,5 – 3,0 нормы от ВГН. Более тяжелых проявлений нефротоксичности не отмечалось.

Нейротоксичность (НТ) диагностировалась физикально, при наличии парестезий, ослабления сухожильных рефлексов, нарушения равновесия, изменения походки и инструментально, по данным магнитно-резонансной томографии - манифестация лейкоэнцефалопатии, снижение слуха,

подтвержденное аудиометрией, только при условии появления этих симптомов, не связанных с введением винкристина, высокодозного цитарабина и исключенных других причинах, не связанных с действием лекарственных препаратов.

Токсичность со стороны слизистых оболочек оценивалась клинически (Таблица 6) и с помощью ВАШ (визуально-аналоговой шкалы) боли.

В исследование были включены все лабораторно подтвержденные инфекционные осложнения (ИО), которые были диагностированы у больных на всех этапах лечения по протоколу ALL IC-BFM 2009 (подробно указаны в Таблице 6).

Таблица 6 - Критерии токсичности NCI CTCAE v5.0 (изученные в исследовании) [88]

Показатель	Степени токсичности				
	1	2	3	4	5
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ					
Гемоглобин	НГН* – 100 г/л	100 – 80 г/л	79 – 65 г/л	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть
Нейтрофилы	НГН – 1,5 x 10 ⁹ /л	1,5 – 1,0 x 10 ⁹ /л	1,0 – 0,5 x 10 ⁹ /л	<0,5 x 10 ⁹ /л	Смерть
Фебрильная нейтропения			АЧН ** <1000/мкл с однократным подъемом температуры >38,3°C или стойкая лихорадка ≥38°C более 1 часа	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть

Продолжение таблицы 6

Тромбоциты	НГН – 75,0 x 10 ⁹ /л	75,0–50,0 x 10 ⁹ /л	50,0 – 25,0 x10 ⁹ /л	<25,0 x 10 ⁹ /л	Смерть
* НГН – нижняя граница нормы					
** АЧН – абсолютное число нейтрофилов					
ЛАБОРАТОРНЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ, ПЕЧЕНОЧНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ					
Щелочная фосфатаза	ВГН* – 2,5 x ВГН	2,5 – 5,0 x ВГН	5,0 – 20,0 x ВГН	>20,0 x ВГН	–
Билирубин	ВГН – 1,5 x ВГН	1,5 – 3,0 x ВГН	3,0 – 10,0 x ВГН	>10,0 x ВГН	–
АСТ	ВГН – 3,0 x ВГН	3,0 – 5,0 x ВГН	5,0 – 20,0 x ВГН	>20,0 x ВГН	–
*энтероколит, парапроктит, аппендицит, бактериемия, цистит, остеомиелит, бронхит, катетер-ассоциированные инфекции кровотока, конъюнктивит, увеит, реактивация цитомегаловирусной инфекции, энцефалит, менингит, эндокардит, эндофтальмит, реактивация Эпштейна-Барр вирусной инфекции, фолликулит, фунгемия, вирусный гепатит, реактивация вируса простого герпеса, ларингит, хейлит, пневмония, лимфаденит, отит, папуло-пустулезная сыпь, паронихия, фарингит, плеврит, ринит, орхит, сепсис, опоясывающий лишай, синусит, кандидоз, кариес, трахеит, инфекция верхних дыхательных путей, инфекция мочевыводящих путей, раневая инфекция.					
НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ					
Отек головного мозга	–	–	Манифеста- ция либо ухудшение в сравнении с исходным состоянием	Жизнеугро- жающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть
Энцефалопатия	Невыраженные симптомы; лечение не проводится	Умеренные симптомы, ограничение БА**	Выраженные симптомы, ограничение ЕА*	Жизнеугро- жающие осложнения, необходима неотложная терапия	

Продолжение таблицы 6

Головная боль	–	Умеренная боль, ограничение БА	Выраженная боль, ограничение ЕА	–	–
Парестезии	Невыраженные симптомы	Умеренные симптомы, ограничение БА	Выраженные симптомы, ограничение ЕА	–	–
АЛТ	ВГН – 3,0 x ВГН	3,0 – 5,0 x ВГН	5,0 – 20,0 x ВГН	>20,0 x ВГН	–
ГГТ (гамма-глутамил-транспептидаза)	ВГН – 2,5 x ВГН	2,5 – 5,0 x ВГН	5,0 – 20,0 x ВГН	>20,0 x ВГН	–
*ВГН – верхняя граница нормы «–» данная степень тяжести отсутствует среди возможных степеней тяжести токсического явления					
ЛАБОРАТОРНЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ, ПОЧЕЧНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ					
Креатинин	ВГН – 1,5 x ВГН	1,5 – 3,0 x ВГН	3,0 – 6,0 x ВГН	>6,0 x ВГН	–
* ВГН – верхняя граница нормы ** ВГН креатинина в сыворотке крови в зависимости от возраста (адаптировано из протокола ALL IC-BFM 2009 [19]). Новорожденные ВГН < 106 ммоль/л, с 1 месяца до 5 лет < 44 ммоль/л, с 6 до 10 лет < 88 ммоль/л, старше 10 лет < 106 ммоль/л.					
ТОКСИЧНОСТЬ СО СТОРОНЫ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК					
Орофарингеальный мукозит	Симптомы не выражены; вмешательство не требуется	Умеренная боль или язвы, не влияющие на потребление пищи, необходимо изменение диеты	Выраженная боль, влияющая на потребление пищи	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	–
ИНФЕКЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ					

Продолжение таблицы 6

Инфекционные осложнения *	Местная терапия	Пероральные антибиотики, противогрибковые средства	Внутривенная противомикробная терапия	Жизнеугрожающие осложнения, неотложная терапия	Смерть
Периферическая моторная нейропатия	Асимптоматическая; клиническое наблюдение	Умеренные симптомы, ограничение БА	Выраженные симптомы, ограничение ЕА	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть
Периферическая сенсорная нейропатия	Асимптоматическая	Умеренные симптомы, ограничение БА	Выраженные симптомы, ограничение ЕА	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть
Судороги	Кратковременные парциальные без потери сознания	Кратковременные генерализованные	Множественные (парциальные или генерализованные) судороги, несмотря на медицинское вмешательство	Жизнеугрожающие осложнения, необходима неотложная терапия	Смерть
Тремор	Невыраженные симптомы	Умеренные симптомы, ограничение БА	Выраженные симптомы, ограничение ЕА	—	—
Парез глазодвигательного нерва	Невыраженные симптомы; наблюдение, вмешательство не требуется	Умеренные симптомы, ограничение БА	Выраженные симптомы, ограничение ЕА	—	—

Снижение слуха	Смещение порога потери слуха >20 дБ (т. е. потеря слуха 25 дБ или выше); нейросенсорная тугоухость выше 4 кГц (т.е. 6 или 8 кГц) по крайней мере в одном ухе	Смещение порога потери слуха >20 дБ; нейросенсорная тугоухость в диапазоне от 2 - 4 кГц по крайней мере в одном ухе	Потеря слуха, достаточная для показания к терапевтическому вмешательству, включая слуховые аппараты; смещение порога >20 дБ на частотах от 2 до <4 кГц по крайней мере в одном ухе	—	—
<p>*ЕА – ежедневная активность (самообслуживание: одевание, купание, прием лекарств);</p> <p>** БА – бытовая активность (приготовление пищи, использование телефона)</p> <p>«—» данная степень тяжести отсутствует среди возможных степеней тяжести токсического явления</p>					

Оценка элиминации МТХ в сыворотке крови измерялась на 42, 48 и 54 часы (последующие определения концентрации проводились в случае задержки выведения, каждые 6 ч до уровня $\leq 0,25$ мкмоль/л) после начала введения МТХ и определялась методом гомогенного иммуноферментного анализа в клинической лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Одна десятая общей дозы МТХ вводилась в течение получаса в соответствии с протоколом ALL IC-BFM, остальная часть - в виде 23,5-часовой непрерывной внутривенной инфузии независимо от дозировки МТХ (2 или 5 г/м²). Группа из 18 пациентов, с подтвержденным рецидивом ОЛЛ согласно критериям протокола ALL REZ BFM 2002, получала МТХ в дозировке 1 г/м² в виде 36-часовой

непрерывной внутривенной инфузии. Антидотная терапия фолинатом кальция проводилась в дозировке 15 мг/м² на 42, 48, 54 часы от начала инфузии МТХ 2 или 5 г/м² и на 48, 54 часы при дозе МТХ 1 г/м². Задержка элиминации определялась при значении >1,0 мкмоль/л на 48 час и > 0,25 мкмоль/л на 54 час. В случае выявления концентрации МТХ на 42 час или позже > 5 мкмоль/л, доза лейковорина рассчитывалась по формуле: лейковорин [мг] = концентрация МТХ в плазме [мкмоль/л] x масса тела [кг]. Антидотная терапия проводилась до тех пор, пока концентрация МТХ в плазме не снизится до 0,25 мкмоль/л.

2.4 Определение полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1*

Исследования проводились на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. Методология проведения генотипирования подробно описана в научной статье Кофиади И.А. «Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой» в рецензируемом издании «Генетика» в 2006 году [152].

Биологическим материалом, для экстракции геномной ДНК, являлось 4-6 мл венозной крови, забор которой осуществлялся из локтевой вены в вакуумную пробирку VACUETTE® (GreinerBio-One, Австрия), содержащую ЭДТА-К2 или ЭДТА-К3. Образцы хранились при -80°C вплоть до момента экстракции ДНК. Выделение геномной ДНК из цельной крови осуществлялось с помощью набора реагентов S-Сорб для выделения ДНК на кремниевом сорбенте (ООО «Синтол», Россия). Концентрация экстрагированной ДНК определялась с помощью спектрофотометра для микрообъёмов NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, NY, USA).

Носительство полиморфных маркеров *ABCB1* C3435T (rs1045642), C1236T (rs1128503), G2677T (rs2032582) и *SLCO1B1* T521C (rs4149056) определялось с помощью коммерческих наборов реагентов для определения соответствующих

полиморфизмов (ООО «Синтол», Россия). Определение однонуклеотидных генетических полиморфизмов проводилось методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 Touch Real Time System с программным обеспечением CFX Manager версии 3.0 (BioRad, США). Согласно инструкции производителя в каждую пробу вносилось: 2.5×Реакционная смесь – 10 мкл, 2.5×Разбавитель – 10 мкл, Taq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл – 0,5 мкл и по 5 мкл ДНК исследуемого образца.

Программа амплификации включала в себя этап инкубации при 95°C в течение 3 минут, затем денатурация при 95°C - 15 секунд и отжиг при 63°C - 40 секунд в течение 39 циклов. Сигнал флуоресценции развивался по соответствующему каналу: FAM и HEX.

Носительство полиморфного маркера гена *ABCB1* (C>T rs4148738) определялось с помощью коммерческого набора «TaqMan®SNP Genotyping Assays» и TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, США). Согласно инструкции производителя, применялся «TaqMan®SNP Genotyping Assays» 0,5 мкл в 40-кратном разведении в 10 мкл TaqMan Universal Master Mix II, no UNG и 9,5 мкл воды, свободной от РНКаз. В каждую пробирку вносилось по 5 мкл ДНК исследуемых образцов. Для определения однонуклеотидного генетического полиморфизма использовался метод ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch Real Time System с ПО CFX Manager версии 3.0 (BioRad, США). Программа амплификации включала в себя этап инкубации при 95°C в течение 10 минут, затем денатурация при 95°C - 15 секунд и отжиг при 60°C - 1 минута в течение 49 циклов. Сигнал флуоресценции развивался по соответствующему каналу: FAM и VIC.

2.5 Статистическая обработка результатов

При статистической обработке результатов использовали программу IBM SPSS Statistics 26.0 (США). Расчет объема выборки производился по методу К.А.

Отдельной (исследование средней точности при статистической мощности 80%). Проверка нормальности распределения проводилась методом Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Количественный показатель представлялся в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (25-75%Q) при ненормальном распределении данных. Межгрупповые различия оценивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнительный анализ независимых категориальных переменных использовался с применением χ^2 Пирсона, либо точного теста Фишера с использованием post-hoc анализа, сила взаимосвязи оценена с помощью критерия V Крамера, для таблиц большей размерности в качестве меры связи - отношение шансов с соответствующим 95% доверительным интервалом. Номинальный показатель представлялся абсолютным числом наблюдений, приведена процентная доля признака в подгруппах. Для построения прогностических моделей применялся метод бинарной логистической регрессии с корректировкой точки cut-off при помощи ROC-анализа.

Анализ выживаемости проводился методом Каплана-Мейера только в группе с первично-установленным диагнозом ОЛЛ (n=106). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости принимали $p < 0,05$. При анализе ОВ временной интервал отсчитывался от даты начала терапии до даты смерти, даты последнего контакта с пациентом либо даты выполнения алло-ТГСК (цензурирование). При анализе БСВ временной интервал отсчитывался от даты начала лечения до даты первого неблагоприятного события (рецидив, прогрессирование, смерть) или даты последнего контакта (цензурирование). При анализе БРВ временной интервал отсчитывался от даты наступления ремиссии до даты первого неблагоприятного события (рецидив) или даты последнего контакта с больным (цензурирование).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты лечения и нежелательные лекарственные реакции, обусловленные применением метотрексата в рамках протокола ALL IC-BFM 2009

Обобщенные данные исследуемой выборки, касающиеся демографических и клинических характеристик, включая различные степени выраженности нежелательных лекарственных реакций (НЛР) на применение метотрексата (МТХ) в виде токсических реакций со стороны органов и систем организма, а также исходы лечения представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Обобщенные демографические и клинические данные детей с ОЛЛ, получивших метотрексат (n=124)

Характеристика	Индикатор, единицы измерения	Значение переменной абс.знач., (%)
Демографические данные	Медиана возраста, Me (Q1-Q3), лет	7 (4-11)
	Возраст <1 года	5 (4)
	Возраст 1-3 года	16 (13)
	Возраст 4-5 лет	34 (27,4)
	Возраст 6-12 лет	42 (33,9)
	Возраст 13-18 лет	27 (21,8)
Иммуноподвариант ОЛЛ	В-линейный	84 (67,7)
	Т-линейный	40 (32,3)
Группы риска	Стандартный риск	9 (7,2)
	Средний риск	50 (40,3)
	Высокий риск	55 (44,4)

Продолжение таблицы 7

Доза метотрексата	1000 мг/м ²	18 (14,5)
	2000 мг/м ²	41 (33,1)
	5000 мг/м ²	65 (52,4)
	Время выведения, Me (Q1-Q3), ч	48 (48-54)
Статус токсичности	Гепатотоксичность 0 ст.	6 (4,8)
	Гепатотоксичность 1 ст.	18 (14,5)
	Гепатотоксичность 2 ст.	43 (34,7)
	Гепатотоксичность 3 ст.	32 (25,8)
	Гепатотоксичность 4 ст.	25 (20,2)
	Гепатотоксичность 0-2 ст.	67 (54)
	Гепатотоксичность 3-4 ст.	57 (46)
	Нефротоксичность 0 ст.	120 (96,8)
	Нефротоксичность 1 ст.	3 (2,4)
	Нефротоксичность 2 ст.	1 (0,8)
	Гематотоксичность 1 ст.	4 (3,2)
	Гематотоксичность 2 ст.	11 (8,9)
	Гематотоксичность 3 ст.	22 (17,7)
	Гематотоксичность 4 ст.	87 (70,2)
	Гематотоксичность 1-2 ст.	15 (12,1)
	Гематотоксичность 3-4 ст.	109 (87,9)
	Нейротоксичность 0 ст.	81 (65,3)
	Нейротоксичность 1 ст.	23 (18,5)
	Нейротоксичность 2 ст.	11 (8,9)
	Нейротоксичность 3 ст.	6 (4,8)
	Нейротоксичность 4 ст.	3 (2,4)
	Орофарингеальный мукозит 0 ст.	5 (4)
	Орофарингеальный мукозит 1 ст.	22 (17,7)
	Орофарингеальный мукозит 2 ст.	33 (26,6)
Орофарингеальный мукозит 3 ст.	59 (47,6)	

Продолжение таблицы 7

Статус токсичности	Орофарингеальный мукозит 4 ст.	5 (4)
	Орофарингеальный мукозит 0-2 ст.	60 (48,4)
	Орофарингеальный мукозит 3-4 ст.	64 (51,6)
	Инфекционные осложнения 0 ст.	17 (13,7)
	Инфекционные осложнения 1 ст.	34 (27,4)
	Инфекционные осложнения 2 ст.	30 (24,2)
	Инфекционные осложнения 3 ст.	22 (17,7)
	Инфекционные осложнения 4 ст.	19 (15,3)
	Инфекционные осложнения 5 ст.	2 (1,6)
	Инфекционные осложнения 0-2 ст.	81 (65,4)
	Инфекционные осложнения 3-5 ст.	43 (34,6)
Исходы лечения в общей группе пациентов	Событие	36 (29)
	Рецидив	25 (20,2)
	Рефрактерное течение вторая опухоль	6 (5) 1 (0,8)
	Смерть	16 (12,9)
	Ремиссия	108 (87,1)

В исследуемой выборке детей с ОЛЛ медиана возраста составила 7 лет. Среди возрастных групп преобладала группа детей 6-12 лет (33,9%), затем в порядке убывания следующие возрастные группы: 4-5 лет (27,4%), 13-18 лет (21,8%), 1-3 года (13%) и менее года (4%).

Среди детей с ОЛЛ преобладал В-линейный иммуноподвариант - 67,7%, по сравнению с Т-линейным вариантом (32,3%). Касательно групп риска, в исследуемой выборке отмечалось незначительное преобладание пациентов группы высокого риска (44,4%) над группой среднего риска (40,3%), тогда как наименьшее число больных были стратифицированы в группу стандартного риска (7,2%). Что касается исходов лечения, то в анализируемой группе больных из 124 пациентов с ОЛЛ 12,9% умерли, 87,1% находятся в ремиссии, у 29% детей

отмечалось событие, включавшее рецидив в 20,2%, из них умерли 9,7% и 3,2% первичных пациента погибли на разных этапах лечения от несвязанных с основным заболеванием причин (тяжелые инфекционные осложнения, бактериально-грибковый сепсис), а у 5% детей отмечалась рефрактерное течение болезни, у 0,8% (1 человек) – вторая опухоль (ОЛЛ, про-В иммуноподвариант в 2014 г.; ОЛЛ, пре-пре-В иммуноподвариант, Ph-like, в 2021 г.), что наглядно представлено на рисунке 4.

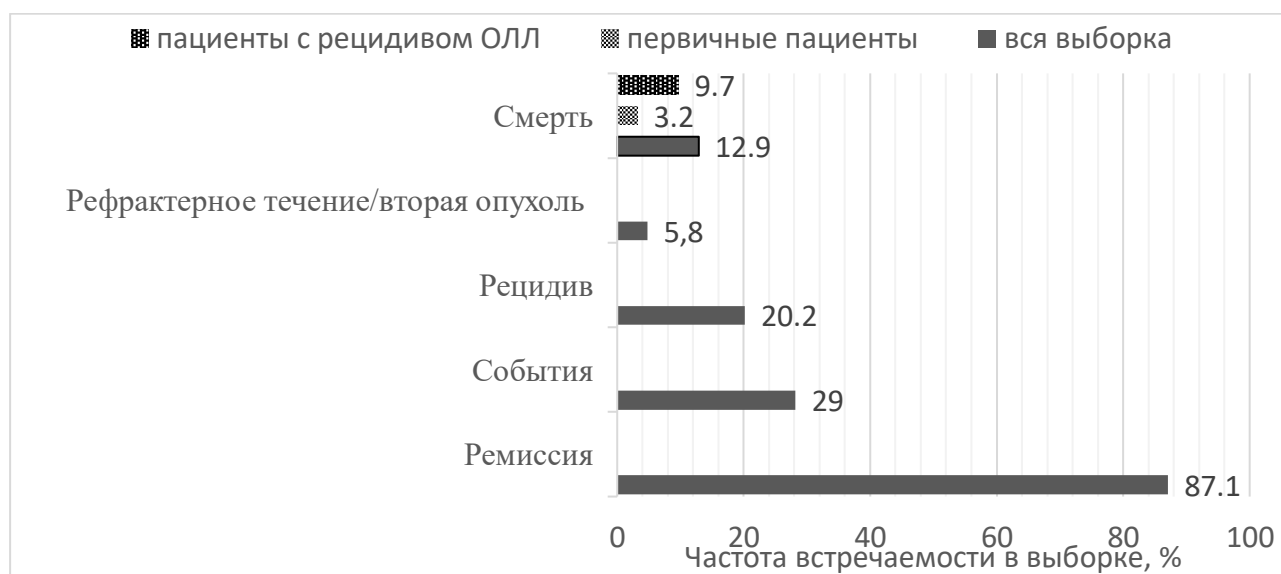


Рисунок 4 - Исходы лечения детей с ОЛЛ в исследуемой выборке (n=124)

Результаты оценки частоты встречаемости НЛР метотрексата по степеням тяжести для удобства анализа были объединены в две подгруппы: невыраженных (0-2 ст.) и выраженных (3 и > ст.) НЛР, сравнение которых наглядно изображено на рисунке 5.

Согласно данным рисунка 5, среди детей с ОЛЛ, получавших МТХ, доминировали выраженные НЛР в виде гематологической токсичности (87,9%), реже отмечались орофарингеальный мукозит (51,6%) и гепатотоксичность (46%), далее – инфекционные осложнения (34,6%), и минимальные показатели были в частоте встречаемости нейротоксичности (7,2%). Следует отметить, что нефротоксичность проявлялась только в виде невыраженных НЛР (100%).

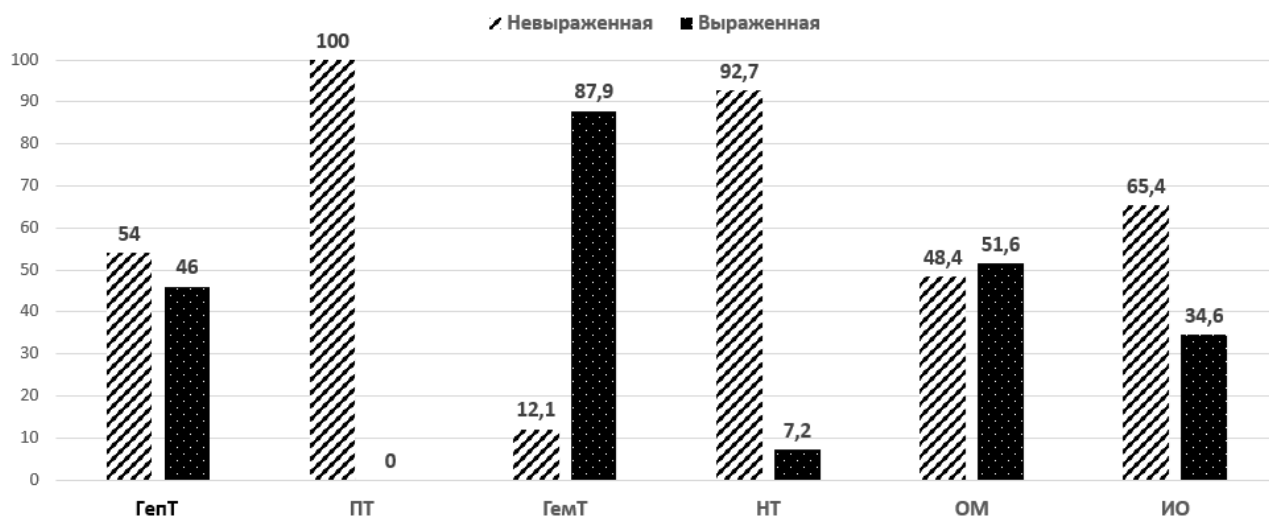


Рисунок 5 - Сравнение невыраженных и выраженных степеней тяжести НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ

Сравнительный анализ НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ проводился с помощью таблиц сопряженности и χ^2 Пирсона и представлен в таблицах 8 – 10.

Согласно полученным данным (Таблица 8), обнаружена статистически значимая закономерность между наличием выраженной инфекции и выраженной ГемТ у детей с ОЛЛ, получавших терапию метотрексатом ($p=0,002$, ОШ: 1,6 (95% ДИ: 1,4-1,9)).

Таблица 8 - Сравнительный анализ частоты встречаемости гематологической токсичности и инфекционных осложнений на терапии МТХ у детей с ОЛЛ

Токсичность	Инфекции		P
	Выраженная, n (%)	Невыраженная, n (%)	
Гематологическая токсичность			
Выраженная, n (%)	41 (37,6)	68 (62,4)	0,002*
Невыраженная, n (%)	0 (0)	15 (100)	

* - связь с предиктором статистически значима ($p<0,05$)

Таблица 9 демонстрирует статистически значимую закономерность между наличием выраженной инфекции и орофарингеальным мукозитом 3-4 ст. у детей с ОЛЛ, получавших терапию метотрексатом ($p=0,003$, ОШ: 3,3 (95% ДИ: 1,5-7,4)).

Таблица 9 - Сравнительный анализ частоты встречаемости орофарингеального мукозита и инфекционных осложнений терапии МТХ у детей с ОЛЛ

Токсичность	Инфекции		p
	Выраженная, n (%)	Невыраженная, n (%)	
Мукозит			0,003*
Выраженный, n (%)	29 (45,3)	35 (54,7)	
Невыраженный, n (%)	12 (20)	48 (80)	

* - связь с предиктором статистически значима ($p<0,05$)

Согласно полученным данным (Таблица 10), обнаружены статистически значимая закономерность между наличием выраженной инфекции и гепатотоксичности 3-4 ст. ($p<0,001$, ОШ: 5,7 (95% ДИ: 2,5-13)).

Таблица 10 - Сравнительный анализ частоты встречаемости гепатотоксичности и инфекционных осложнений терапии МТХ у детей с ОЛЛ

Токсичность	Инфекции		p
	Выраженная, n (%)	Невыраженная, n (%)	
Гепатотоксичность			<0,001*
Выраженная, n (%)	30 (52,6)	27 (47,4)	
Невыраженная, n (%)	11 (16,4)	56 (83,6)	

* - связь с предиктором статистически значима ($p<0,05$)

Таким образом, чем выше частота встречаемости гематологической и гепатотоксичности, а также орофарингеального мукозита > 3ст., тем выше частота инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию метотрексатом.

3.2 Исследование ассоциаций полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с исходами терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей

По результатам фармакогенетического тестирования был проведен анализ частоты встречаемости полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* (Таблица 11), затем оценена эффективность терапии у детей с ОЛЛ, получивших метотрексат, в зависимости от изучаемых генетических полиморфизмов. Для всех исследуемых полиморфизмов статистическая обработка показателей осуществлялась посредством сравнения дикого генотипа с мутантным, поскольку гетерозиготные генотипы могут вносить существенную вариабельность в уровень экспрессии своего гена.

Таблица 11 - Частота встречаемости полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с ОЛЛ, получавших терапию метотрексатом

Полиморфизм	Генотип	Число пациентов	
		Абс. знач.	%
<i>ABCB1</i> rs4148738 C>T	CC	29	23,4
	CT	43	34,7
	TT	52	41,9
	Группа TT, CT	95	76,6
	CC «дикий тип»	29	23,4
rs2032582 G>T	GG	51	41,1
	GT	44	35,5
	TT	29	23,4

Продолжение таблицы 11

rs2032582 G>T	Группа GT, TT	73	58,9
	GG «дикий тип»	51	41,1
rs1128503 C>T	CC	44	35,5
	CT	52	42
	TT	28	22,6
	Группа CT, TT	80	64,5
	CC «дикий тип»	44	35,5
C3435T rs1045642 C>T	CC	35	28,2
	TC	54	43,5
	TT	35	28,2
	Группа TT, TC	89	71,8
	CC «дикий тип»	35	28,2
<i>SLCO1B1</i> T521C rs4149056 T>C	TT	92	74,2
	CC	3	2,4
	TC	29	23,4
	Группа TC, CC	32	25,8
	TT «дикий тип»	92	74,2

Оценку эффективности терапии метотрексатом при ОЛЛ проводили на основе поиска ассоциативных связей между изучаемыми полиморфизмами и исходами терапии, а именно наличием события и рецидива, с помощью критерия χ^2 Пирсона, таблиц сопряженности и post-hoc анализа (Таблица 12).

Таблица 12 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCBI* и *SLCO1B1* с наличием события/рецидива при терапии ОЛЛ у детей

Генотип	Событие		p	Рецидив		p
	Наличие (n=36) абс.знач., (%)	Отсутствие (n=88) абс.знач., (%)		Наличие (n=25) абс.знач., (%)	Отсутствие (n=99) абс.знач., (%)	
<i>ABCBI</i> C3435T rs1045642 CC	9 (25,7)	26 (74,3)	0,826	7 (20)	28 (80)	1,000
rs1045642 TC	17 (31,5)	37 (68,4)	0,479	12 (22,2)	42 (77,8)	0,615
rs1045642 TT	9 (25,7)	26 (74,3)	0,826	6 (17,1)	29 (82,9)	0,804
rs1045642 группа CC «дикий тип»	9 (25,7)	26 (74,3)	0,826	7 (20)	28 (80)	1,000
rs1045642 группа TT, TC	26 (29,2)	63 (70,8)	0,826	18 (20,2)	71 (79,8)	1,000
<i>ABCBI</i> rs1128503 TT	5 (17,9)	23 (82,1)	0,233	6 (21,4)	22 (78,4)	0,796
rs1128503 CT	15 (25,5)	38 (74,5)	0,572	9 (17,6)	42 (82,4)	0,560
rs1128503 CC	16 (36,4)	28 (63,6)	0,135	10 (22,7)	34 (77,3)	0,643
rs1128503 группа CT, TT	19 (23,8)	61 (76,3)	0,135	15 (18,8)	65 (81,3)	0,643
rs1128503 группа CC «дикий тип»	16 (36,4)	28 (63,6)	0,135	10 (22,7)	34 (77,3)	0,643
<i>ABCBI</i> rs2032582 GG	20 (39,2)	31 (60,8)	0,023*	13 (25,5)	38 (74,5)	0,216
rs2032582 GT	10 (22,7)	34 (77,3)	0,313	7 (15,9)	37 (84,1)	0,485
rs2032582 TT	5 (17,2)	24 (82,8)	0,162	5 (17,2)	24 (82,8)	0,794
rs2032582 группа GT, TT	15 (20,5)	58 (79,5)	0,023*	12 (16,4)	61 (83,6)	0,216

Продолжение таблицы 12

rs2032582 группа GG «дикий тип»	20 (39,2)	31 (60,8)	0,023*	13 (25,5)	38 (74,5)	0,216
ABCBI rs4148738 TT	20 (38,5)	32 (61,5)	0,031*	13 (25)	39 (75)	0,267
rs4148738 CT	9 (19)	34 (81)	0,104	7 (16,7)	36 (83,3)	0,637
rs4148738 CC	6 (20,7)	23 (79,3)	0,354	5 (17,2)	24 (82,8)	0,794
rs4148738 группа TT, CT	29 (30,5)	66 (69,5)	0,354	20 (21,1)	75 (78,9)	0,794
rs4148738 группа CC «дикий тип»	6 (20,7)	23 (79,3)	0,354	5 (17,2)	24 (82,8)	0,794
SLCO1B1 T521C rs4149056 TT	29 (31,5)	63 (68,5)	0,254	20 (21,7)	72 (78,3)	0,611
rs4149056 TC	6 (20,7)	23 (79,3)	0,354	5 (17,2)	24 (82,8)	0,794
rs4149056 CC	0 (0)	3 (100)	0,558	0 (0)	3 (100)	1,000
rs4149056 группа TT «дикий тип»	29 (31,5)	63 (68,5)	0,254	20 (21,7)	72 (78,3)	0,611
rs4149056 группа TC, CC	6 (18,8)	26 (81,3)	0,254	5 (15,6)	27 (84,4)	0,611

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

Согласно полученным данным, у пациентов-носителей генотипа GG гена *ABCBI* rs2032582 выявлен повышенный риск развития событий в отсроченном периоде ($p=0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)). Кроме того, это подтверждено при группировке данных пациентов-носителей генотипа GG «дикий тип» rs2032582 повышен риск развития событий в отсроченном периоде ($p=0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)).

Также отмечено, что у пациентов с «диким» генотипом ТТ гена *ABCB1* rs4148738 повышен риск развития событий в отсроченном периоде ($p=0,031$, ОШ: 2,4 (95% ДИ: 1,07-5,3)).

Согласно полученным результатам, отмечается значимая тенденция к снижению риска возникновения летального исхода при наличии генотипа СТ гена *ABCB1* rs4148738 ($p=0,087$).

Оценку эффективности терапии метотрексатом при ОЛЛ проводили на основе поиска ассоциативных связей между изучаемыми полиморфизмами и неблагоприятным исходом терапии – смертью, с помощью критерия χ^2 Пирсона, таблиц сопряженности и post-hoc анализа (Таблица 13).

Таблица 13 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с летальным исходом при ОЛЛ у детей

Генотип	Смерть		p
	Наличие (n=16) абс.знач. (%)	Отсутствие (n=108) абс.знач. (%)	
<i>ABCB1</i> C3435T rs1045642 CC	6 (17,1)	29 (82,9)	0,384
rs1045642 CT	4 (7,4)	50 (92,6)	0,176
rs1045642 TT	6 (17,1)	29 (82,9)	0,384
rs1045642 группа CC «дикий тип»	6 (17,1)	29 (82,9)	0,384
rs1045642 группа CT, TT	10 (11,2)	79 (88,8)	0,384
<i>ABCB1</i> rs1128503 TT	5 (21,4)	23 (78,6)	0,355
rs1128503 CT	4 (7,8)	48 (92,2)	0,185
rs1128503 CC	7 (15,9)	37 (84,1)	0,577
rs1128503 группа CT, TT	9 (11,3)	71 (88,8)	0,577
rs1128503 группа CC «дикий тип»	7 (15,9)	37 (84,1)	0,577
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	8 (15,7)	43 (84,3)	0,587
rs2032582 GT	3 (6,8)	41 (93,2)	0,168

rs2032582 TT	5 (17,2)	24 (82,8)	0,526
rs2032582 группа GT, TT	8 (11)	65 (89)	0,587
rs2032582 группа GG «дикий тип»	8 (15,7)	43 (84,3)	0,587
ABCB1 rs4148738 TT	8 (15,4)	44 (84,6)	0,590
rs4148738 CT	2 (4,8)	41 (95,2)	0,087
rs4148738 CC	6 (20,7)	23 (79,3)	0,203
rs4148738 группа TT, CT	10 (10,5)	85 (89,5)	0,203
rs4148738 группа CC «дикий тип»	6 (20,7)	23 (79,3)	0,203
SLCO1B1 T521C rs4149056 TT	14 (15,2)	78 (84,8)	0,237
rs4149056 TC	2 (6,9)	27 (93,1)	0,356
rs4149056 CC	0 (0)	3 (100)	1,000
rs4149056 группа TT «дикий тип»	14 (15,2)	78 (84,8)	0,237
rs4149056 группа TC, CC	2 (6,3)	30 (93,8)	0,237

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

Таким образом, результаты проведенного ассоциативного анализа по оценке эффективности терапии метотрексатом у детей с ОЛЛ в зависимости от носительства ряда полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* свидетельствуют о необходимости проведения фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей генотипов GG «дикий тип» гена *ABCB1* rs2032582 и TT гена *ABCB1* rs4148738 для определения группы пациентов с повышенным риском развития событий в отсроченном периоде.

3.3 Результаты терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей в зависимости от мутационного статуса генов *ABCB1* и *SLCO1B1* и дозировки метотрексата

Для оценки взаимосвязи эффективности терапии ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009 с полиморфизмами генов белков-транспортеров были

проанализированы показатели бессобытийной, безрецидивной и общей выживаемости 106 больных, с первичным установленным диагнозом ОЛЛ, получивших МТХ в дозе 2000 мг/м² и 5000 мг/м², в соответствии с протоколом ALL IC-BFM 2009, результаты анализа по методу Калана-Мейер представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Показатели выживаемости больных ОЛЛ в зависимости от полиморфизмов генов белков-транспортеров *ABCB1* и *SLCO1B1* и дозировки метотрексата

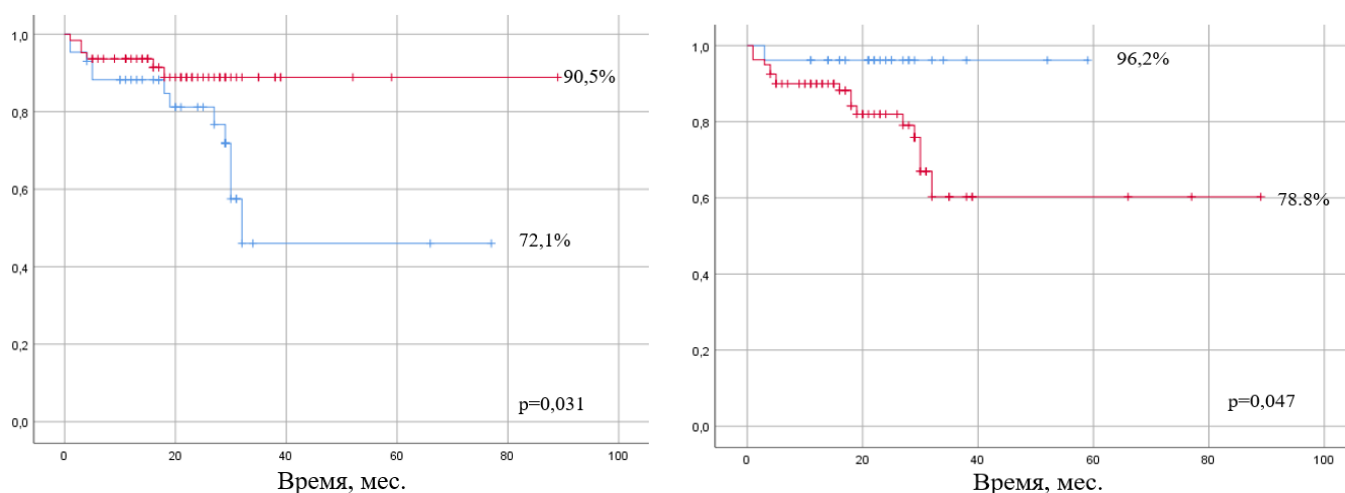
Выживаемость	Фактор	%	Медиана (Me) *, 75% квартиль (месяцы)	p-value
БСВ	<i>ABCB1</i>			
	C3435T rs1045642:			
	СС «дикий тип»	83,3	32 ± 5	0,845
	группа ТТ и ТС	82,9	30 ± 0,7	
	rs1128503:			
	СС «дикий тип»	74,3	29 ± 5,7	0,278
	группа ТТ и ТС	87,3	30 ± 1,6	
	rs2032582:			
GG «дикий тип»	72,1	32*	0,031	
группа ТТ и GT	90,5	-		
rs4148738:				
СС «дикий тип»	96,2	-	0,047	
группа ТТ и ТС	78,8	30 ± 5,8		
<i>SLCO1B1</i>				
T521C rs4149056:				
ТТ «дикий тип»	81	30 ± 1,4	0,551	
группа СС и ТС	88,9	-		

БСВ	Дозировка МТХ:			
	2000 мг/м ²	85,4	30	0,449
	5000 мг/м ²	81,5	32 ± 10	
БРВ	ABCBI			
	C3435T rs1045642:			
	СС «дикий тип»	89,7	-	0,557
	группа ТТ и ТС	93,4	43 ± 14,3	
	rs1128503:			
	СС «дикий тип»	85,3	43 ± 12,6	0,187
	группа ТТ и ТС	95,8	-	
	rs2032582:			
	GG «дикий тип»	85,7	43 ± 14,4	0,069
	группа ТТ и GT	96,8	-	
rs4148738:				
СС «дикий тип»	96,2	-		
группа ТТ и ТС	91,1	43 ± 14,1	0,411	
SLCO1B1				
T521C rs4149056:				
ТТ «дикий тип»	92,3	43	0,8	
группа СС и ТС	92,6	-		
Дозировка МТХ:				
2000 мг/м ²	90,2	-		
5000 мг/м ²	93,8	43 ± 12,6	0,678	
ОВ	ABCBI			
	C3435T rs1045642:			
СС «дикий тип»	90	32	0,344	
группа ТТ и ТС	94,7	-		

ОВ	rs1128503:			
	СС «дикий тип»	88,6	-	0,203
	группа ТТ и ТС	95,8	-	
	rs2032582:			
	GG «дикий тип»	88,4	-	0,103
	группа ТТ и GT	96,8	-	
	rs4148738:			
	СС «дикий тип»	96,2	-	0,454
	группа ТТ и ТС	92,5	-	
	<i>SLCO1B1</i>			
	T521C rs4149056:			
	ТТ «дикий тип»	92,4	-	0,499
группа СС и ТС	96,3	-		
Дозировка МТХ:				
2000 мг/м ²	97,6	-	0,144	
5000 мг/м ²	90,8	-		

Обозначения: * медиана; «-» не достигнута медиана и 75% квартиль; без пометки - 75% квартиль.

Показатель пятилетней БСВ у больных с генотипами ТТ и GT гена *ABCB1* rs2032582 и «дикиим» типом GG достоверно различался: 90.5% (n=63) и 72.1% (n=43), $p = 0,031$ (Рисунок 6 А). Показатель пятилетней БСВ у больных с генотипами ТТ и ТС гена *ABCB1* rs4148738 и «дикиим» типом СС достоверно различался: 78.8% (n=80) и 96.2% (n=26), $p = 0,047$ (Рисунок 6 Б). Среди других полиморфизмов и «диких» типов генов белков-транспортеров достоверных различий при оценке выживаемости не получено.



А

Б

А - Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1* rs2032582 (красный цвет – БСВ пациентов с генотипами GT и TT, синий цвет - БСВ пациентов с «диким» типом GG); Б - Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1* rs4148738 (красный цвет – БСВ пациентов с генотипами TC и TT, синий цвет - БСВ пациентов с «диким» типом CC)

Рисунок 6 – Бессобытийная выживаемость больных ОЛЛ в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1*

3.4 Исследование ассоциаций полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с клиническими и биохимическими нежелательными лекарственными реакциями, а также с временем экскреции метотрексата, при остром лимфобластном лейкозе у детей

Ассоциативный анализ полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ проводился при помощи критерия χ^2 Пирсона с использованием таблиц сопряженности.

Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с гепато- и гематологической токсичностями МТХ представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с гепато- и гематологической токсичностями МТХ

Генотипы	Гепатотоксичность		p	Гематотоксичность		p
	3 – 5 ст. абс.знач., (%)	1 – 2 ст. абс.знач., (%)		3 – 5 ст. абс.знач., (%)	1 – 2 ст. абс.знач., (%)	
<i>ABCB1</i> C3435T rs1045642 CC	18 (51,4)	17 (48,6)	0,671	30 (85,7)	5 (14,3)	0,771
rs1045642 TC	27 (50)	27 (50)	0,856	47 (87)	7 (13)	1,000
rs1045642 TT	15 (42,9)	20 (57,1)	0,550	31 (88,6)	4 (11,4)	1,000
rs1045642 группа CC «дикий тип»	17 (50)	17 (50)	0,825	30 (88,2)	4 (11,8)	1,000
rs1045642 группа TT, TC	43 (47,8)	47 (52,2)	0,843	78 (86,7)	12 (13,3)	1,000
<i>ABCB1</i> rs1128503 TT	11 (39,3)	17 (60,7)	0,273	23 (82,1)	5 (17,9)	0,355
rs1128503 CT	24 (45,1)	28 (54,9)	0,540	44 (86,3)	7 (13,7)	1,000
rs1128503 CC	25 (58,6)	19 (43,2)	0,164	40 (90,9)	4 (9,1)	0,413
rs1128503 группа CT, TT	37 (44,6)	46 (55,4)	0,227	71 (85,5)	12 (14,5)	0,576
rs1128503 группа CC «дикий тип»	23 (56,1)	18 (43,9)	0,227	37 (90,2)	4 (9,8)	0,576
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	29 (56,9)	22 (43,1)	0,114	45 (88,2)	6 (11,8)	0,793
rs2032582 GT	19 (43,2)	25 (56,8)	0,390	39 (88,6)	5 (11,4)	0,786
rs2032582 TT	12 (41,4)	17 (58,6)	0,388	24 (82,8)	5 (17,2)	0,526
rs2032582 группа GG, TT	31 (42,5)	42 (57,5)	0,114	63 (86,3)	10 (13,7)	0,793
rs2032582 группа GG «дикий тип»	29 (56,9)	22 (43,1)	0,114	45 (88,2)	6 (11,8)	0,793
<i>ABCB1</i> rs4148738 TT	29 (55,8)	23 (44,2)	0,203	46 (88,5)	6 (11,5)	0,790
rs4148738 CT	18 (40,5)	25 (59,5)	0,207	36 (85,7)	6 (14,3)	0,781
rs4148738 CC	13 (44,8)	16 (55,2)	0,661	25 (86,2)	4 (13,8)	1,000

Продолжение таблицы 15

rs4148738 группа ТТ, СТ	46 (48,9)	48 (51,1)	0,829	83 (88,3)	11 (11,7)	0,534
rs4148738 группа СС «дикий тип»	14 (46,7)	16 (53,3)	0,829	25 (83,3)	5 (16,7)	0,480
SLCO1B1 T521C rs4149056 ТТ	45 (48,9)	47 (51,1)	0,842	81 (88)	11 (12)	0,556
rs4149056 ТС	15 (51,7)	14 (48,3)	0,681	24 (82,8)	5 (17,2)	0,526
rs4149056 СС	0 (0)	3 (100)	0,245	3 (100)	0 (0)	1,000
rs4149056 группа ТТ «дикий тип»	46 (50,5)	45 (49,5)	0,424	80 (87,9)	11 (12,1)	0,762
rs4149056 группа ТС, СС	14 (42,4)	19 (57,6)	0,424	28 (84,8)	5 (15,2)	0,653

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

Согласно полученным данным, у пациентов с генотипом СС *ABCBI* rs1128503 наблюдается повышенный риск развития выраженного (3-4ст.) орофарингеального мукозита ($p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95% ДИ:1,01-4,55)). Что также подтверждено и при группировке пациентов: с «диким типом» СС rs1128503 повышен риск выраженного орофарингеального мукозита ($p=0,026$, ОШ: 2,4 (95% ДИ:1,1-5,2)) (Таблица 16). Кроме того, у пациентов с «диким» генотипом ТТ гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 наблюдается повышенный риск развития выраженных (3-5ст.) инфекционных осложнений ($p=0,046$, ОШ: 2,7 (95% ДИ: 1,1-7,1)). Другие виды токсических НЛР на МТХ во взаимосвязи с носительством полиморфизмов генов *ABCBI* и *SLCO1B1* не показали достоверных различий.

Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCBI* и *SLCO1B1* с орофарингеальным мукозитом и инфекционными осложнениями после терапии МТХ представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCBI* и *SLCO1B1* с орофарингеальным мукозитом и инфекционными осложнениями после терапии МТХ

Генотипы	Мукозит		p	Инфекция		p
	3 - 4 ст. (n=64) абс.знач., (%)	1 - 2 ст. (n=60) абс.знач., (%)		3 -5 ст. (n=41) абс.знач., (%)	1 - 2 ст. (n=83) абс.знач., (%)	
<i>ABCBI</i> C3435T	20 (57,1)	15 (42,9)	0,440	10 (28,6)	25 (71,4)	0,505
rs1045642 CC						
rs1045642 CT	27 (50)	27 (50)	0,752	19 (35,2)	35 (64,8)	0,659
rs1045642 TT	17 (48,6)	18 (51,4)	0,671	12 (34,3)	23 (65,7)	0,856
rs1045642 группа CC	20 (57,1)	15 (42,9)	0,440	10 (28,6)	25 (71,4)	0,505
«дикий тип»						
rs1045642 группа CT, TT	44 (49,4)	45 (50,6)	0,440	31 (34,8)	58 (64,4)	0,505
<i>ABCBI</i> rs1128503 TT	12 (42,9)	16 (57,1)	0,292	7 (25)	21 (75)	0,366
rs1128503 CT	24 (45,1)	28 (54,9)	0,225	16 (29,4)	36 (70,6)	0,470
rs1128503 CC	28 (63,6)	16 (36,4)	0,047*	18 (40,9)	26 (59,1)	0,168
rs1128503 группа CT, TT	36 (45)	44 (55)	0,047*	23 (28,7)	57 (71,3)	0,168
rs1128503 группа CC	28 (63,6)	16 (36,4)	0,047*	18 (40,9)	26 (59,1)	0,168
«дикий тип»						
<i>ABCBI</i> rs2032582 GG	30 (58,8)	21 (41,2)	0,179	18 (35,3)	33 (64,7)	0,659
rs2032582 GT	20 (45,5)	24 (54,5)	0,309	15 (34,1)	29 (65,9)	0,857
rs2032582 TT	14 (48,3)	15 (51,7)	0,681	8 (27,6)	21 (72,4)	0,509
rs2032582 группа GT, TT	34 (46,6)	39 (53,4)	0,179	23 (31,5)	50 (68,5)	0,659
rs2032582 группа GG	30 (58,8)	21 (41,2)	0,179	18 (35,3)	33 (64,7)	0,659
«дикий тип»						
<i>ABCBI</i> rs4148738 TT	31 (59,6)	21 (40,4)	0,130	18 (34,6)	34 (65,4)	0,755

Продолжение таблицы 16

rs4148738 CT	18 (40,5)	25 (59,5)	0,076	14 (31)	29 (69)	0,928
rs4148738 CC	15 (51,7)	14 (48,3)	0,989	9 (31)	20 (69)	1,000
rs4148738 группа TT, CT	51 (54,3)	43 (45,7)	0,681	32 (34)	62 (66)	1,000
rs4148738 группа CC «дикий тип»	14 (48,3)	15 (51,7)	0,681	9 (31)	20 (69)	1,000
SLCO1B1 T521C rs4149056 TT	51 (55,4)	41 (44,6)	0,149	35 (38)	57 (62)	0,046*
rs4149056 TC	13 (44,8)	16 (55,2)	0,404	6 (20,7)	23 (79,3)	0,117
rs4149056 CC	0 (0)	3 (100)	0,110	0 (0)	3 (100)	0,550
rs4149056 группа TT «дикий тип»	48 (52,7)	43 (47,3)	0,675	29 (31,9)	62 (68,1)	0,434
rs4149056 группа TC, CC	16 (48,5)	17 (51,5)	0,675	13 (39,4)	20 (60,6)	0,434

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с нефро- и нейротоксичностью после терапии МТХ представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с нефро- и нейротоксичностью после терапии МТХ

Генотипы	Нефротоксичность		p	Нейротоксичность		p
	1-2ст. (n=4) абс.знач., (%)	Нет (n=120) абс.знач., (%)		Наличие (n=43) абс.знач., (%)	Отсутствие (n=81) абс.знач., (%)	
ABCB1 C3435T rs1045642 CC	0 (0)	35 (100)	0,576	11 (31,4)	24 (68,6)	0,634

Продолжение таблицы 17

rs1045642 CT	1 (1,9)	53 (98,1)	0,632	15 (27,8)	39 (72,2)	0,156
rs1045642 TT	3 (8,6)	32 (91,4)	0,035 *	17 (48,6)	18 (51,4)	0,041*
rs1045642 группа CC «дикий тип»	0 (0)	35 (100)	0,576	11 (31,4)	24 (68,6)	0,634
rs1045642 группа CT, TT	4 (4,4)	85 (95,5)	0,576	32 (36)	57 (64)	0,634
ABCBI rs1128503 TT	1 (3,6)	27 (96,4)	1,000	9 (32,1)	19 (67,9)	0,824
rs1128503 CT	3 (5,9)	49 (94,1)	0,162	19 (35,3)	33 (64,7)	1,000
rs1128503 CC	0 (0)	44 (100)	0,296	15 (34,1)	29 (65,9)	0,919
rs1128503 группа CT, TT	4 (5)	76 (95)	0,296	28 (35)	52 (65)	0,919
rs1128503 группа CC «дикий тип»	0 (0)	41 (100)	0,301	15 (34,1)	29 (65,9)	0,919
ABCBI rs2032582 GG	0 (0)	51 (100)	0,143	15 (29,4)	36 (70,6)	0,303
rs2032582 GT	3 (6,8)	41 (93,2)	0,127	17 (38,6)	27 (61,4)	0,492
rs2032582 TT	1 (3,4)	28 (96,6)	1,000	11 (37,9)	18 (62,1)	0,674
rs2032582 группа GT, TT	4 (5,5)	69 (94,5)	0,143	28 (38,4)	45 (61,6)	0,303
rs2032582 группа GG «дикий тип»	0 (0)	51 (100)	0,143	15 (29,4)	36 (70,6)	0,303
ABCBI rs4148738 TT	0 (0)	52 (100)	0,139	16 (30,8)	36 (69,2)	0,437
rs4148738 CT	2 (4,8)	41 (95,2)	0,604	14 (31)	29 (69)	0,533
rs4148738 CC	2 (6,9)	27 (93,1)	0,233	13 (44,8)	16 (55,2)	0,189
rs4148738 группа TT, CT	2 (2,1)	93 (97,9)	0,236	31 (32,6)	64 (67,4)	0,386

Продолжение таблицы 17

rs4148738 группа CC	2 (6,9)	27 (93,1)	0,236	12 (41,4)	17 (58,6)	0,386
SLCO1B1 T521C rs4149056 TT	3 (3,3)	89 (96,7)	1,000	35 (38)	57 (62)	0,182
rs4149056 TC	0 (0)	29 (100)	0,572	7 (24,1)	22 (75,9)	0,173
rs4149056 CC	1 (33,3)	2 (66,7)	0,094	1 (33,3)	2 (66,7)	1,000
rs4149056 группа TT	4 (4,4)	87 (95,6)	0,573	34 (37,4)	57 (62,6)	0,297
rs4149056 группа TC, CC	0 (0)	33 (100)	0,573	9 (27,3)	24 (72,7)	0,297

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

Согласно полученным результатам, у пациентов с генотипом TT гена *ABCB1* C3435Trs1045642 определяется повышенный риск развития нефротоксичности ($p=0,035$, ОШ: 8,3 (95% ДИ: 0,83,-82,2) и нейротоксичности ($p=0,041$, ОШ: 2,3 (95% ДИ: 1,02,-5,12).

Кроме ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с НЛР для оценки безопасности терапии метотрексатом проведен поиск взаимосвязей полиморфизмов изучаемых нами генов с задержкой элиминации МТХ на 54 час и более. При сравнении времени экскреции МТХ в зависимости от генотипов CC и TC гена *SLCO1B1* T521Crs4149056 статистически значимых различий получено не было ($p=1$ и $0,304$, соответственно).

Полученные результаты оказались статистически не значимыми, представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Результаты ассоциативного анализа полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с наличием или отсутствием экскреции МТХ на 54 час

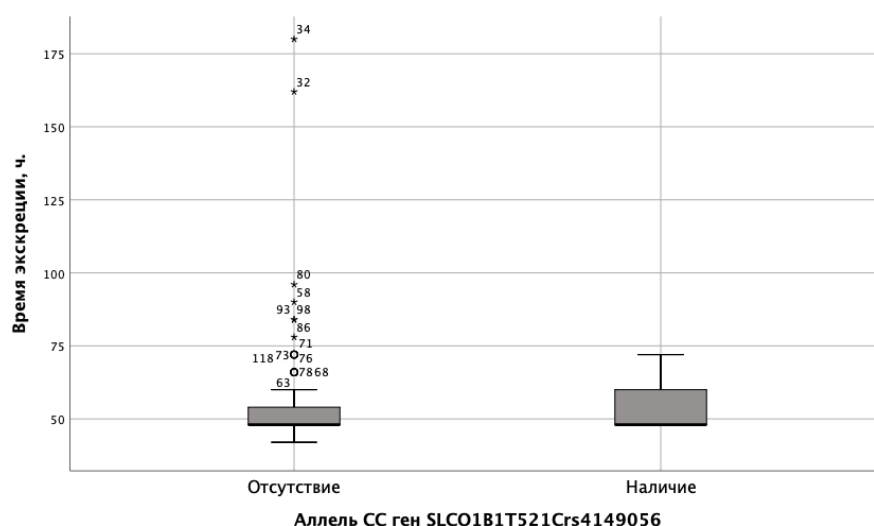
Генотипы	Экскреция на 54 час и более		p
	Наличие (n=53) абс.знач., (%)	Отсутствие (n=71) абс.знач., (%)	
<i>ABCB1</i> C3435T rs1045642 CC	16 (45,7)	19 (54,3)	0,675
rs1045642 CT	23 (42,6)	31 (57,4)	0,976
rs1045642 TT	14 (40)	21 (60)	0,840
rs1045642 группа CC «дикий тип»	16 (45,7)	19 (54,3)	0,675
rs1045642 группа CT, TT	37 (41,6)	52 (58,4)	0,675
<i>ABCB1</i> rs1128503 TT	8 (28,6)	20 (71,4)	0,085
rs1128503 CT	23 (45,1)	29 (54,9)	0,658
rs1128503 CC	22 (50)	22 (50)	0,226
rs1128503 группа CT, TT	31 (38,8)	49 (61,3)	0,226
rs1128503 группа CC «дикий тип»	22 (50)	22 (50)	0,226
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	22 (43,1)	29 (56,9)	0,941
rs2032582 GT	22 (50)	22 (50)	0,226
rs2032582 TT	9 (31)	20 (69)	0,145
rs2032582 группа GT, TT	22 (43,1)	29 (56,9)	0,941
rs2032582 группа GG «дикий тип»	22 (43,1)	29 (56,9)	0,941
<i>ABCB1</i> rs4148738 TT	23 (44,2)	29 (55,8)	0,776
rs4148738 CT	19 (45,2)	24 (54,8)	0,688
rs4148738 CC	11 (37,9)	18 (62,1)	0,550
rs4148738 группа TT, CT	42 (44,2)	53 (55,8)	0,550
rs4148738 группа CC «дикий тип»	11 (37,9)	18 (62,1)	0,550

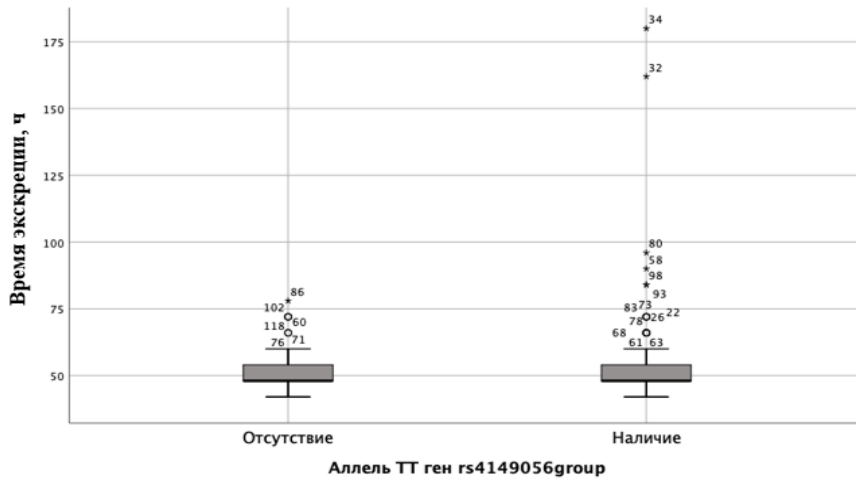
Продолжение таблицы 18

<i>SLCO1B1</i> T521C rs4149056 ТТ	42 (45,7)	50 (54,3)	0,267
rs4149056 TC	10 (34,5)	19 (65,5)	0,304
rs4149056 CC	1 (33,3)	2 (66,7)	1,000
rs4149056 группа ТТ «дикий тип»	42 (45,7)	50 (54,3)	0,267
rs4149056 группа TC, CC	11 (34,4)	21 (65,6)	0,267

* - связь с предиктором статистически значима ($p < 0,05$)

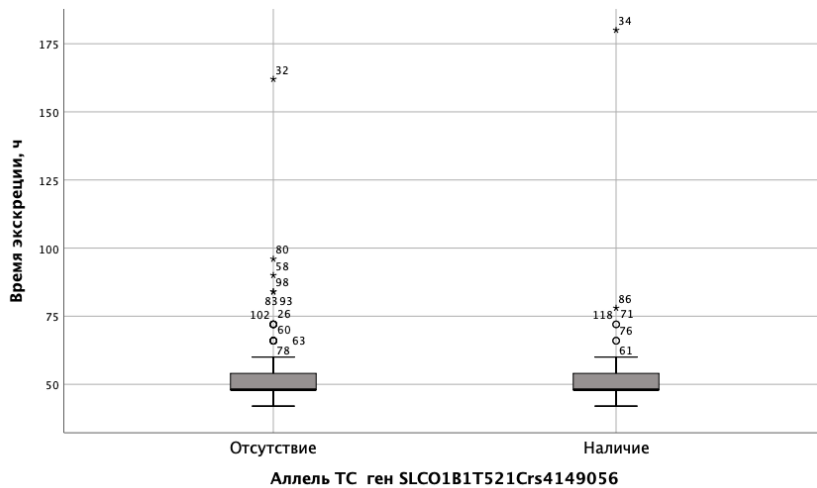
Время экскреции МТХ у пациентов с генотипами CC, TC гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 отличалось незначимо (медианы составляли 48ч). При сравнении времени экскреции в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия генотипа ТТ гена rs4149056 статистически значимых различий получено не было ($p=0,267$). Время экскреции МТХ в группе пациентов с генотипом ТТ rs4149056 не отличалось от пациентов с другими аллелями гена (медианы составляли 48 и 48ч, соответственно), представлено на рисунке 7А-В.

А - Медианы времени экскреции МТХ в зависимости от генотипа CC *SLCO1B1*



Б

Б - Медианы времени экскреции МТХ в зависимости от генотипа ТТ «дикий тип» *SLCO1B1*



В

В - медианы времени экскреции МТХ в зависимости от генотипа TC *SLCO1B1*

Рисунок 7 - Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от генотипа пациентов

Для проверки гипотезы о том, что выраженность токсических реакций на МТХ у детей с ОЛЛ зависит от фармакокинетики препарата, был осуществлён поиск взаимосвязей между выраженными НЛР и временем экскреции МТХ, отражающим фармакокинетику препарата. Проведено сравнение медианы времени экскреции МТХ при проявлении выраженной токсичности того или иного вида с медианой времени экскреции препарата при отсутствии тяжелых НЛР.

При сравнении тяжести орофарингеального мукозита в зависимости от времени экскреции МТХ (Таблица 19) были получены статистически значимые различия ($p < 0,001$).

Таблица 19 - Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости проявлений выраженного орофарингеального мукозита

Показатель	Выраженный мукозит				p
	Наличие		Отсутствие		
	Me	Q ₁ -Q ₃	Me	Q ₁ -Q ₃	
Время экскреции, ч	54	48-66	48	48-54	<0,001

Время экскреции препарата у пациентов с выраженным орофарингеальным мукозитом было существенно выше, чем среди пациентов без выраженного мукозита (медианы составляли 54 и 48 ч, соответственно), представлено на рисунке 8.

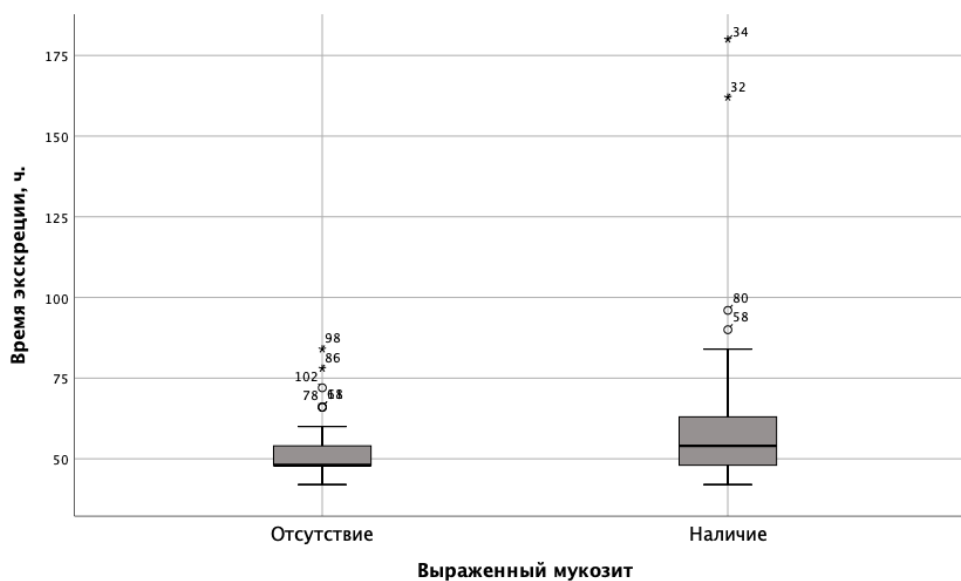


Рисунок 8 - Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженного орофарингеального мукозита у детей с ОЛЛ

При сравнении степени выраженности гепатотоксичности в зависимости от времени экскреции МТХ были получены статистически значимые различия ($p < 0,001$), (Таблица 20).

Таблица 20 - Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от проявлений выраженной гепатотоксичности

Показатель	Выраженная гепатотоксичность				p
	Наличие		Отсутствие		
	Me	Q ₁ -Q ₃	Me	Q ₁ -Q ₃	
Время экскреции, ч	54	48-66	48	48-48	<0,001

Время экскреции у пациентов с выраженной гепатотоксичностью было существенно выше, чем среди пациентов без выраженной гепатотоксичности (медианы составляли 48 и 54 ч, соответственно), представлено на рисунке 9.

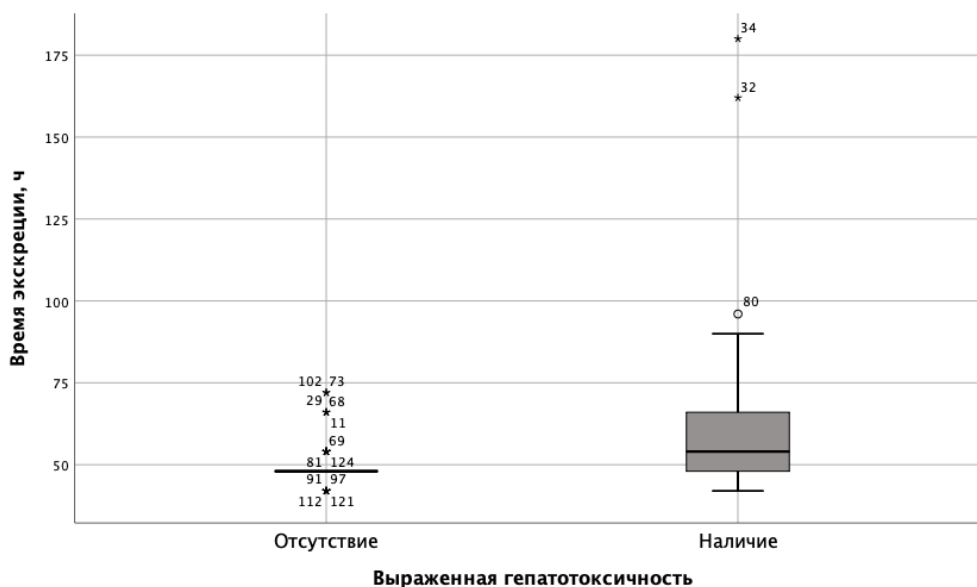


Рисунок 9 - Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженной гепатотоксичности у детей с ОЛЛ

Доказано, что чем выше время экскреции МТХ у детей с ОЛЛ ($p < 0,001$), как показателя, отражающего фармакокинетику препарата, тем выше степень выраженности таких токсических НЛР, как орофарингеальный мукозит и гепатотоксичность. Выраженных нефро- и нейротоксичности в исследуемой популяции больных не отмечалось, анализ с временем экскреции не проводился. Гематологическая токсичность 3 – 4 степени, как известно, всегда наблюдается при терапии HD-МТХ.

Пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* C3435Trs1045642 имеют повышенный риск развития нефро- и нейротоксичности. Пациенты с генотипом СС *ABCB1* rs1128503 имеют повышенный риск развития выраженного орофарингеального мукозита, а с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженной инфекции. Другие виды токсических НЛР на МТХ во взаимосвязи с носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* не показали достоверных различий.

3.5 Прогностическое значение клинических и генетических факторов при терапии метотрексатом острого лимфобластного лейкоза у детей

Нами было разработано несколько актуальных прогностических моделей, описывающих взаимосвязь между клиническими и генетическими факторами и исходами терапии ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009 с включением HD-МТХ.

Прогностическая модель №1 для определения вероятности развития любого терминального события в зависимости от различных аллелей генов и клинических данных. В результате пошагового отбора факторов методом исключения была получена логистическая функция (1), включающая 8 предикторов:

$$P = \frac{1}{(1+e^{-z})} \times 100\%$$

$$z = -5,2 - 1,82 * X_{ABCB1C3435Trs1045642_{CC}} - 1,68 * X_{ABCB1rs1128503_{CC}} + 4,99 * X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 1,46 * X_{ABCB1rs2032582_{GT}} + 4,515 * X_{метотрексат_{доза} 1000\text{мг/м}^2} + 1,11 * X_{мукозит_выраж} + 0,97 * X_{инф_выраж} + 1,63 * X_{наличие_нейротоксичности} \quad (1)$$

где P – вероятность события (в долях единицы), $X_{ABCB1C3435Trs1045642_{CC}}$ – генотип CC *ABCB1* C3435Trs1045642 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs1128503_{CC}}$ – генотип CC *ABCB1*rs1128503 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs2032582_{GG}}$ – GG *ABCB1*rs2032582 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs2032582_{GT}}$ – GT *ABCB1*rs2032582 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{доза метотрексата } 1000 \text{ мг/м}^2}$ – дозировка метотрексата 1000 мг/м² (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{мукозит_выраженный}}$ – выраженный мукозит (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{инф._выраженная}}$ – наличие выраженных инфекционных осложнений (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{наличие_нейротоксичности}}$ – наличие нейротоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие).

Полученная прогностическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в ее состав предикторы составляют 61,4% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную.

Исходя из значений коэффициентов регрессии и p-value, такие предикторы, как, генотип GG и GT гена *ABCB1* rs2032582, дозировка метотрексата 1000 мг/м², наличие нейротоксичности увеличивают вероятность развития события в отдаленном периоде, а предиктор - генотип CC *ABCB1* C3435T rs1045642 уменьшает вероятность развития события (Рисунок 10).

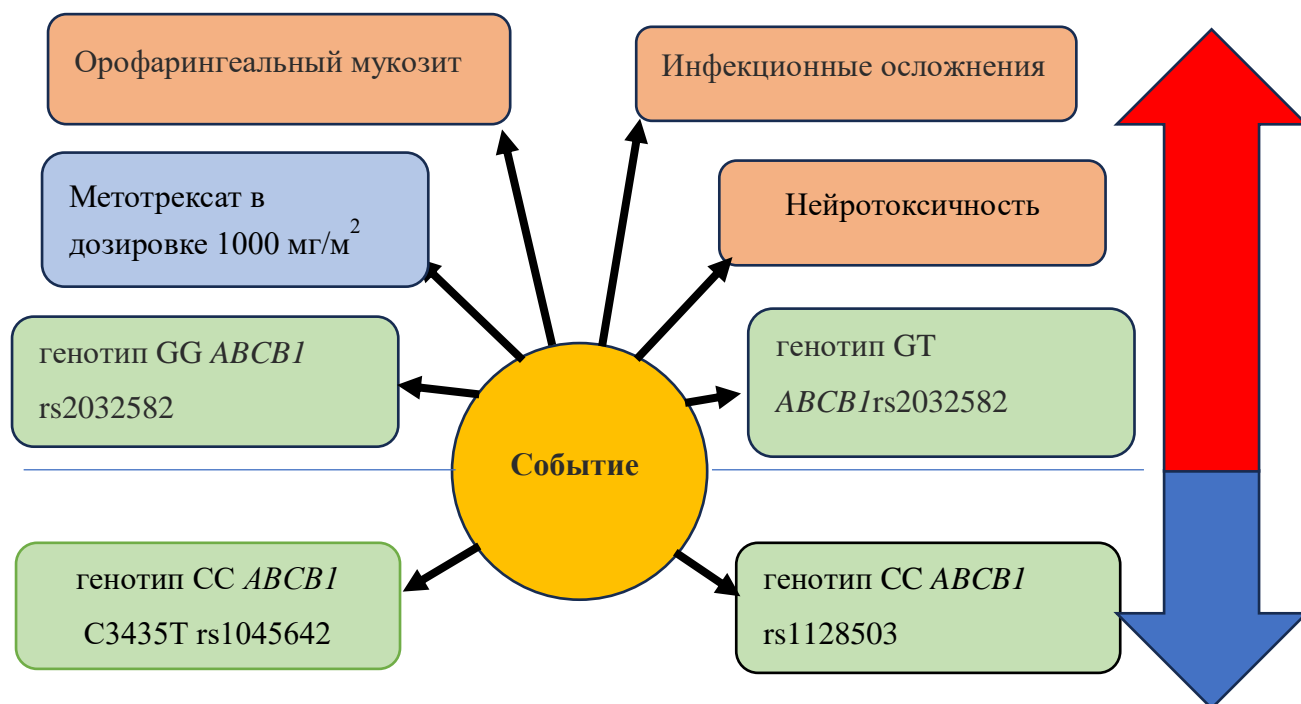


Рисунок 10 - Схематическое изображение прогностической модели развития **события** в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получающих терапию HD-MTX

С помощью мультивариабельного анализа определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами события (Таблица 21).

Таблица 21 - Оценка связи предикторов модели (1) с шансами развития события

Предиктор	COR (95% CI)	p	AOR (95% CI)	p
<i>ABCB1</i> C3435T rs1045642 CC	0,84 (0,35-2,03)	0,697	0,16 (0,033-0,79)	0,025*
<i>ABCB1</i> rs1128503 CC	1,84 (0,82-4,1)	0,138	0,19 (0,022-1,55)	0,120
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	2,5 (1,12-5,55)	0,025*	146,8 (7,5-2895)	0,001*
<i>ABCB1</i> rs2032582 GT	0,65 (0,28-1,5)	0,315	4,29 (0,55-33,5)	0,165
MTX 1000 мг/м ²	41 (8,7-193,6)	<0,001*	91,4 (13,2-633,6)	<0,001*
Выраженный мукозит	3,88 (1,6-9,2)	0,002*	3,03 (0,84-10,9)	0,09

Продолжение таблицы 21

Выраженная инфекция	4,1 (1,8-9,3)	0,001*	2,6 (0,8-8,8)	0,113
Наличие нейротоксичности	2,3 (1-5,2)	0,044*	5,1 (1,5-18,3)	0,012*

*- связь с предикторами статистически значима

Чувствительность разработанной модели №1 составила 88,6% (31 верных прогнозов из 35 случаев события), специфичность составила 85,4 % (76 верных прогнозов из 89 случаев отсутствия события). Общая диагностическая эффективность 86,3%. С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции P. Полученная кривая представлена на рисунке 11. Площадь под ROC-кривой составила $0,918 \pm 0,032$ (95% ДИ: 0,855-0,982). Значение логистической функции P в точке cut-point составило 0,271.

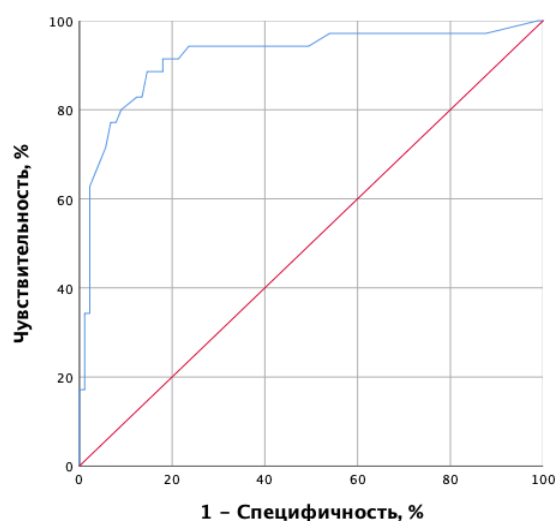


Рисунок 11 - ROC-кривая, отражающая зависимость прогноза падения вероятности наступления события от значения логистической функции P

Прогностическая модель №2 для определения вероятности развития рецидива в зависимости от различных аллелей генов и клинических данных. В результате пошагового отбора факторов методом исключения была получена логистическая функция (2), включающая 4 предиктора:

$$P = \frac{1}{(1 + e^{-z})} \times 100\%$$

$$z = -5,18 - 2,51 \times X_{ABCB1rs1128503_{CC}} + 3,82 \times X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 7,12 \times X_{\text{дозировка метотрексата } \frac{1000 \text{ мг}}{\text{м}^2}} + 2,62 \times X_{\text{нейротоксичность}} \quad (2),$$

где P – вероятность рецидива (в долях единицы), $X_{ABCB1rs1128503_{CC}}$ – генотип CC *ABCB1* rs1128503 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs2032582_{GG}}$ – генотип GG *ABCB1* rs2032582 (0 – отсутствие, 1 – наличие) $X_{\text{дозировка метотрексата } 1000 \text{ мг/м}^2}$ – дозировка метотрексата 1000 мг/м² (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{наличие нейротоксичности}}$ – наличие нейротоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие).

Полученная прогностическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в ее состав предикторы составляют 74,3% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную (Рисунок 12).

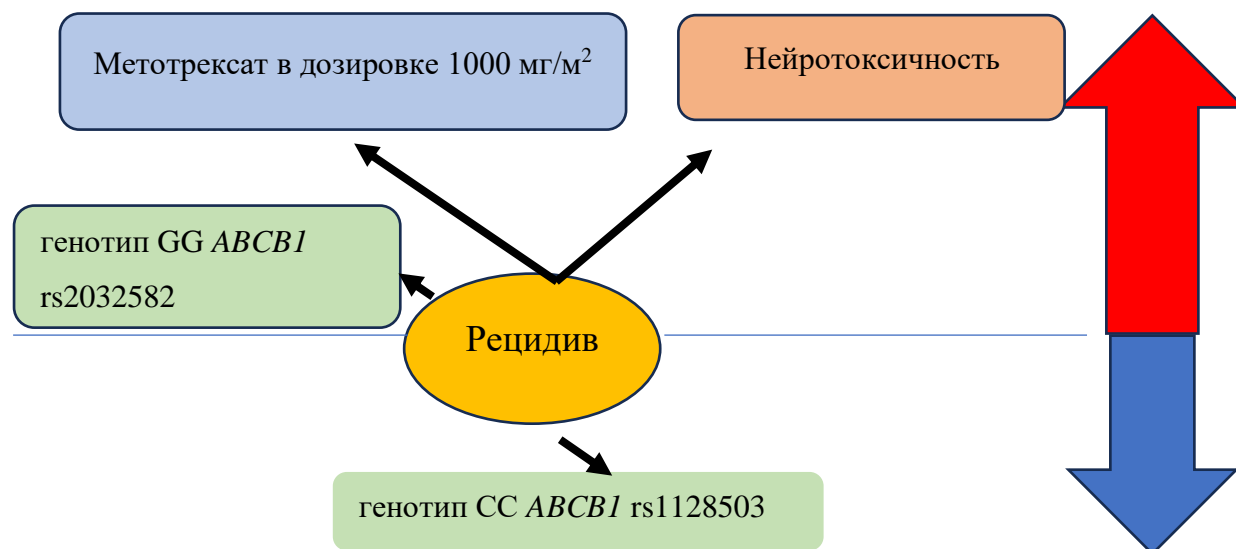


Рисунок 12 - Схематическое изображение прогностической модели развития **рецидива** в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получавших терапию метотрексатом

Исходя из значений коэффициентов регрессии и p-value, наличие генотипа *CC ABCB1*rs1128503 уменьшает вероятность развития рецидива. В свою очередь, другие предикторы (генотип *GG ABCB1* rs2032582; дозировка метотрексата 1000 мг/м²; наличие выраженной нейротоксичности) увеличивают вероятность развития рецидива в отдаленном периоде.

С помощью мультивариабельного анализа были определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами рецидива (Таблица 22).

Таблица 22 - Оценка связи предикторов модели (2) с шансами рецидива

Предиктор	COR (95%CI)	p	AOR (95% CI)	p
<i>ABCB1</i> rs1128503 <i>CC</i>	1,3 (0,52-3,14)	0,643	0,08 (0,006-1,13)	0,06*
<i>ABCB1</i> rs2032582 <i>GG</i>	1,7 (1,0-4,21)	0,216	45,7 (2,8-776)	0,008*
Метотрексат 1000 мг/м ²	252 (29-2173)	<0,001*	1234 (64-23735)	<0,001*
Наличие нейротоксичности	2,1 (0,83-4,9)	0,158	13,74 (1,5-125,6)	0,02*

*- связь с предикторов статистически значима

С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции Р. Площадь под ROC-кривой составила 0,967±0,015 (95% ДИ: 0,939-0,996). Значение логистической функции Р в точке cut-point составило 0,21. Чувствительность разработанной модели (2) составила 88,9% (22 верных прогнозов из 25 случаев рецидива), специфичность составила 89,9 % (89 верных прогнозов из 99 случаев отсутствия рецидива). Общая диагностическая эффективность 89,5%. Полученная кривая представлена на рисунке 13.

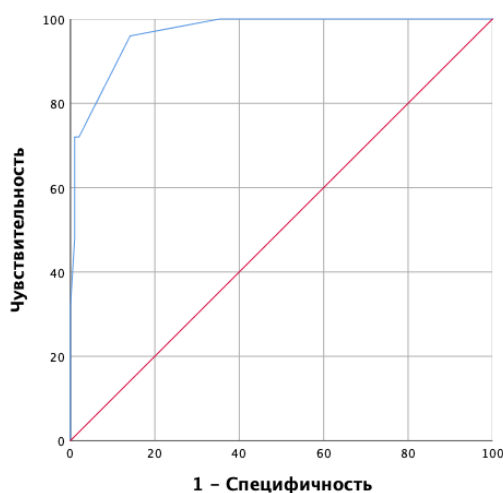


Рисунок 13 - ROC-кривая, характеризующая зависимость прогноза падения развития рецидива от значения логистической функции P

Прогностическая модель №3 для определения вероятности смерти в зависимости от различных аллелей генов и клинических данных. В результате пошагового отбора факторов методом исключения была получена логистическая функция (3), включающая 5 предикторов:

$$P = \frac{1}{(1 + e^{-z})} \times 100\%$$

$$z = -4 + 0,79 * X_{ABCB1rs1128503_{TT}} + 1,22 * X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 2,28 \\ * X_{метотрексат_{доза}1000\text{мг/м}^2} + 1,25 \\ * X_{наличие_нейротоксичности} + 2,34 \\ * X_{наличие_нефротоксичности} \quad (3)$$

где P – вероятность смерти (в долях единицы), $X_{ABCB1rs1128503_{TT}}$ – генотип *ABCB1rs1128503* (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs2032582_{GG}}$ – генотип *GG ABCB1rs2032582* (0 – отсутствие, 1 – наличие) $X_{доза\ метотрексата\ 1000\ \text{мг/м}^2}$ – дозировка метотрексата 1000 мг/м² (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{наличие\ нейротоксичности}$ – наличие нейротоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{наличие\ нефротоксичности}$ – наличие нефротоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие).

Полученная прогностическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в ее состав предикторы составляют 30,7% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. Исходя из значений коэффициентов регрессии и p -value, дозировки метотрексата 1000 мг/м² увеличивает вероятность смерти в отдаленном периоде (Рисунок 14).

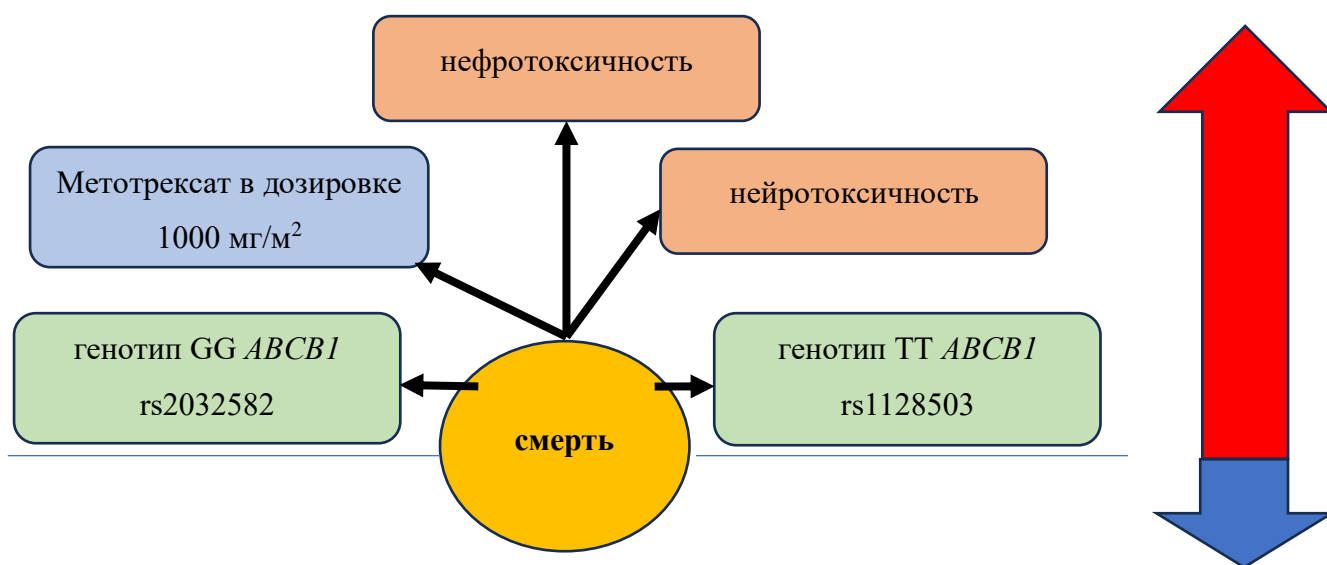


Рисунок 14 - Схематическое изображение прогностической модели развития **смерти** в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получающих терапию метотрексатом

С помощью мультивариабельного анализа были определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами наступления смерти (Таблица 23).

Таблица 23 - Оценка связи предикторов модели (3) с шансами наступления смерти

Предиктор	COR (95% CI)	p	AOR (95% CI)	p
<i>ABCB1</i> rs1128503 TT	1,7 (0,53-5,3)	0,378	2,21 (0,48-10,4)	0,315
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	1,5 (0,5-4,3)	0,442	3,4 (0,8-14,4)	0,098

Продолжение таблицы 23

Метотрексат 1000 мг/м2	8,82 (2,7-28,2)	<0,001*	9,73 (2,6-35,1)	0,001*
Наличие нейротоксичности	2,8 (0,96-8,14)	0,059	3,5 (0,98-12,3)	0,054
Наличие нефротоксичности	7,6 (0,99-58,1)	0,052	10,4 (0,98-111,2)	0,052

*- связь с предикторов статистически значима

С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции Р. Полученная кривая представлена на рисунке 15.

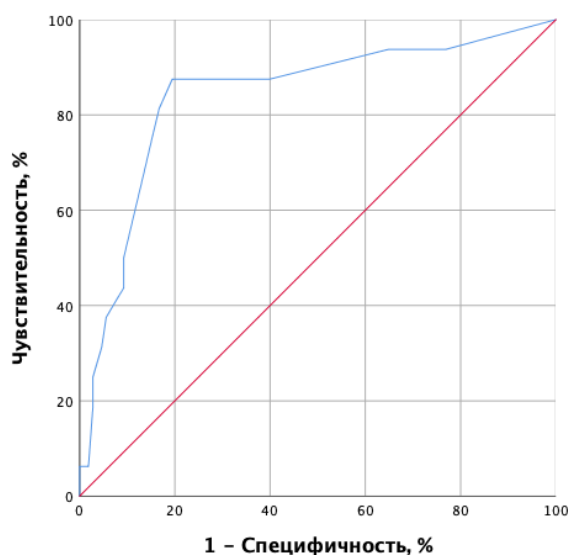


Рисунок 15 - ROC-кривая, характеризующая зависимость прогноза падения развития смерти от значения логистической функции Р

Площадь под ROC-кривой составила $0,840 \pm 0,059$ (95% ДИ: 0,724-0,956). Значение логистической функции Р в точке cut-point составило 0,164.

Чувствительность разработанной модели (3) составила 81,3% (13 верных прогнозов из 16 случаев смерти), специфичность составила 83,3 % (90 верных прогнозов из 108 случаев ремиссии). Общая диагностическая эффективность 83,1%.

Прогностическая модель №4 для определения вероятности задержки элиминации МТХ более 54 часа в зависимости от различных аллелей генов и клинических данных. В результате пошагового отбора факторов методом исключения была получена логистическая функция (4), включающая 7 предикторов:

$$P = \frac{1}{(1+e^{-z})} \times 100\%$$

$$z = -3,76 + 3,75 \times X_{ABCB1rs1128503_{CC}} + 1,29 \times X_{ABCB1rs1128503_{CT}} - 2,76 \times X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 2,24 \times X_{\text{гепатотоксичность}} + 1,6 \times X_{\text{гематотоксичность}} + 1,23 \times X_{\text{нейротоксичность}} - 1,017 \times X_{\text{инф_выраж}} \quad (4),$$

где P – вероятность экскреции более 54ч (в долях единицы); $X_{ABCB1rs1128503_{CC}}$ – генотип CC *ABCB1*rs1128503 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs1128503_{CT}}$ – генотип CT *ABCB1*rs1128503 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{ABCB1rs2032582_{GG}}$ – GG генотип *ABCB1*rs2032582 (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{ГепГ выраженная}}$ – наличие выраженной гепатотоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{ГемГ выраженная}}$ – наличие выраженной гематологической токсичности (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{наличие нейротоксичности}}$ – наличие нейротоксичности (0 – отсутствие, 1 – наличие); $X_{\text{ИЮ}}$ – наличие выраженной инфекции (0 – отсутствие, 1 – наличие).

Полученная прогностическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в ее состав предикторы составляют 42% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную.

Исходя из значений коэффициентов регрессии и p-value, наличие генотипа GG *ABCB1*rs2032582 уменьшает вероятность экскреции МТХ более 54 часа. В свою очередь, другие факторы (генотипы CC *ABCB1*rs1128503 и CT *ABCB1*rs1128503; наличие выраженных гепатотоксичности и нейротоксичности)

увеличивают вероятность задержки элиминации МТХ более 54 часа в отдаленном периоде (Рисунок 16).

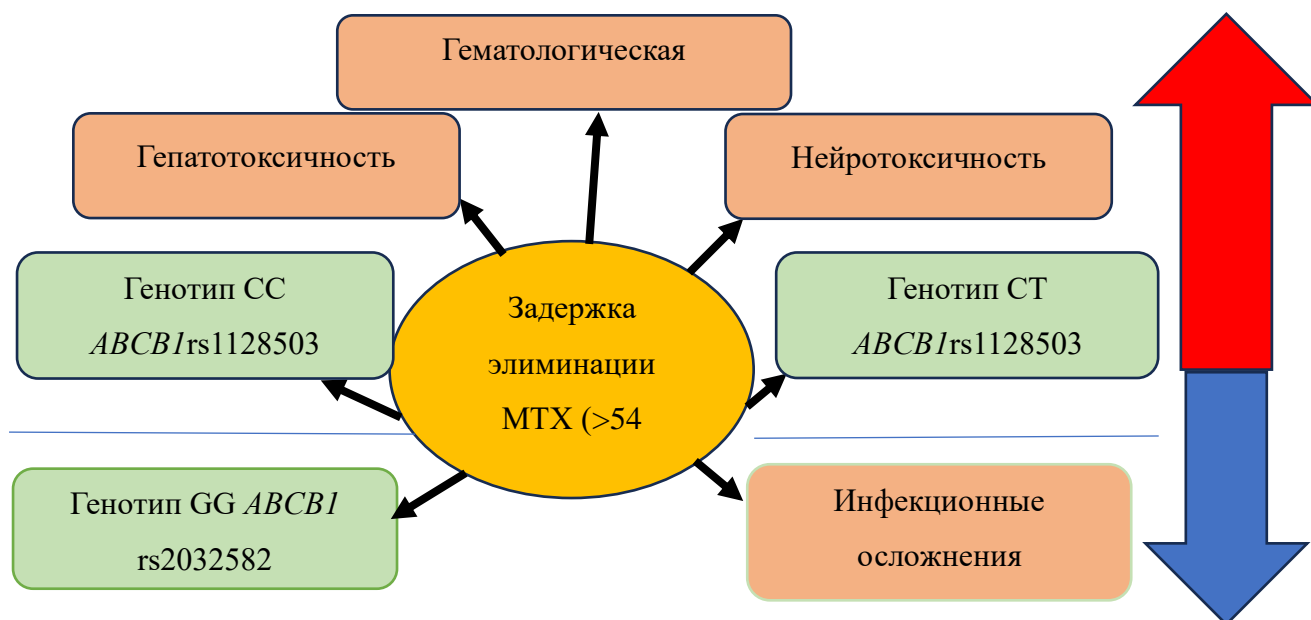


Рисунок 16 - Схематическое изображение прогностической модели развития задержки элиминации МТХ более 54 часа в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получавших терапию HD-MTX

В таблице 24 с помощью мультиварибельного анализа определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами вероятности экскреции МТХ >54ч.

Таблица 24 - Оценка связи предикторов модели (4) с шансами вероятности экскреции МТХ >54 часа

Предиктор	COR (95% CI)	p	AOR (95% CI)	p
<i>ABCB1</i> rs1128503 CC	1,58 (0,75-3,3)	0,226	42,5 (2,5-729)	0,01*
<i>ABCB1</i> rs1128503 CT	1,17 (0,6-2,4)	0,658	3,6 (1,1-12,8)	0,044*
<i>ABCB1</i> rs2032582 GG	1,03 (0,5-2,2)	0,941	0,063 (0,005-0,8)	0,033*
Наличие выраженной гепатотоксичности	6,6 (3-14,7)	<0,001*	9,4 (3,3-26,9)	<0,001*

Продолжение таблицы 24

Наличие выраженной гематологической токсичности	6,26 (1,4-28,9)	0,013*	4,95 (0,9-27,2)	0,065
Наличие нейротоксичности	3,57 (1,6-7,75)	0,001*	3,4 (1,3-8,9)	0,012*
Наличие выраженных инфекционных осложнений	1,5 (0,74-3,3)	0,242	0,36 (0,12-1,1)	0,066

*- связь с предикторов статистически значима

С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции P. Полученная кривая представлена на рисунке 17. Площадь под ROC-кривой составила $0,833 \pm 0,036$ (95% ДИ: 0,762-0,905). Значение логистической функции P в точке cut-point составило 0,35. Чувствительность разработанной модели (4) составила 77,4% (41 верных прогнозов из 53 случаев экскреции более 54ч), специфичность составила 73,2 % (52 верных прогнозов из 71 случая экскреции MTX до 54ч). Общая диагностическая эффективность 75%.

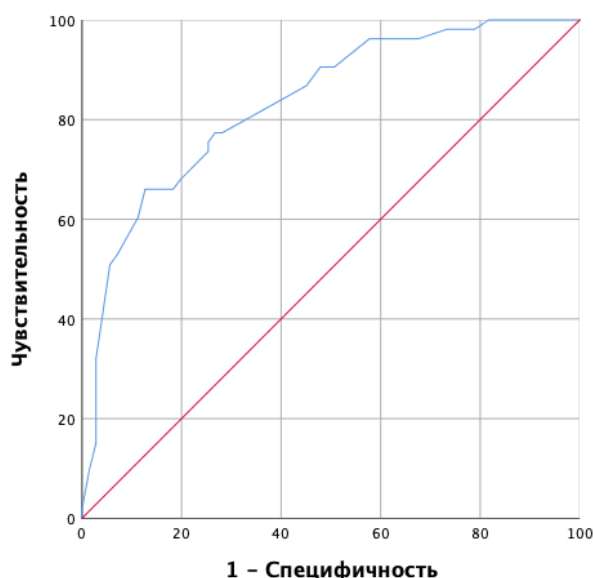


Рисунок 17 - ROC-кривая, характеризующая зависимость прогноза падения вероятности задержки элиминации MTX (более 54 часа) от значения логистической функции P

Получены 4 достоверных ($p < 0,001$) прогностических модели с высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью ($>70\%$, соответственно), демонстрирующие взаимосвязи клинических и генетических факторов, влияющих на неблагоприятные исходы терапии метотрексатом детей с ОЛЛ. Наиболее чувствительной (88,9%, 22 верных прогнозов из 25 случаев рецидива) и специфичной (89,9 %, 89 верных прогнозов из 99 случаев отсутствия рецидива) оказалась модель 2 (определения вероятности развития рецидива в зависимости от различных аллелей генов и клинических данных), её общая диагностическая эффективность - 89,5%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования эффективности и токсичности HD-MTX с точки зрения полиморфизмов генов белков-переносчиков появились сравнительно недавно. В данной работе мы оценили ассоциации некоторых полиморфизмов с токсичностью HD-MTX, исходами терапии и прогнозом. Анализ результатов настоящего исследования подтверждает важность стратификации больных на группы риска с учетом инициальных клинико-лабораторных параметров и выявления ряда полиморфизмов гена *ABCB1*.

Пациенты со злокачественными новообразованиями, получавшие HD-MTX, имели тяжелые токсические реакции значительно чаще, чем при использовании низких доз MTX [74, 160].

В систематическом обзоре и мета-анализе, представленном коллективом авторов под руководством Song Z., рассмотрены и исследованы генетические полиморфизмы всего пути метаболизма лекарственных средств [127]. Оказалось, что ген *ABCB1* 3435C>T rs1045642 оказывает значимое влияние на повышение риска гепатотоксичности, что соответствует результатам предыдущих исследований других научных групп [128 - 130]. Однако, в нашей работе пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* 3435C>T rs1045642 имели повышенный риск развития нейротоксичности ($p=0,041$, ОШ: 2,3 (95% ДИ: 1,02,-5,12)), связи полиморфизмов с ГепТ 3-4ст. не обнаружено.

В нашем исследовании в группе пациентов-носителей «дикого» генотипа СС rs1128503 в 2,1 раз повышен риск развития орофарингеального мукозита 3-4 степени относительно пациентов с мутантными генотипами этого SNP $p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95% ДИ:1,01-4,55)). По сообщению группы авторов под руководством Liu S., не было обнаружено полиморфизма, ассоциированного с орофарингеальным мукозитом, хотя он чаще встречался у пациентов с генотипами СС и ТС гена *ABCB1* rs1128503, чем у тех, кто имел генотип ТТ (ОШ 2,009, 95% ДИ 0,987-4,090, $p = 0,054$) [136].

Что касается прогноза, то в двух исследованиях Ma et al. и Esmaili et al. только генотипы СТ и ТТ *ABCB1* rs1045642 имели статистически значимую корреляцию с БСВ ($p < 0,05$, $p < 0,05$, соответственно) [132, 133]. В нашем исследовании в разработанной прогностической модели (2), наличие генотипа СС гена *ABCB1* C3435T rs1045642 снижает вероятность наступления события.

Zhai et al. проанализировали несколько SNP в отношении БСВ. В исследование было включено 138 детей ханьского происхождения с ОЛЛ. Анализ показал, что пациенты, несущие «дикий» генотип rs2032582 или rs1128503 гена *ABCB1*, имели более низкую БСВ [31].

Мы также оценили терапевтические исходы у детей с ОЛЛ, лечившихся по протоколу ALL IC-BFM 2009, в зависимости от мутационного статуса генов *ABCB1* и *SLCO1B1*. показатели БСВ достоверно выше в группе носителей генотипов ТТ и GT (90.5%) гена *ABCB1* rs2032582, чем в группе носителей GG «дикий тип» (72.1%) ($p = 0,031$), в группе носителей «дикого» генотипа СС гена *ABCB1* rs4148738 выше (96.2%), чем у носителей генотипов ТТ и ТС (78.8%) ($p = 0,047$). В прогностической модели (4), основанной на значениях коэффициента регрессии, наличие генотипа GG гена *ABCB1* rs2032582 (AOR (95% CI) 9,12 (1,43-58,2) $p = 0,019$) и ТТ гена *ABCB1* rs1128503 (AOR (95% CI) 7,2 (1,2-43,4) $p = 0,033$) увеличивало вероятность смерти в отдаленном периоде. В прогностической модели (3) один из предикторов – генотип GG гена *ABCB1* rs2032582 (AOR (95% CI) 0,08 (0,006-1,13) $p = 0,008$) увеличивал вероятность рецидива в отдаленном периоде. Согласно данным, полученным с помощью бинарной логистической регрессии, у пациентов - носителей генотипов GG *ABCB1* rs2032582 ($p = 0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)) и ТТ гена *ABCB1* rs4148738 ($p = 0,031$, ОШ: 2,4 (95% ДИ: 1,07-5,3)) повышен риск развития событий в отсроченном периоде в 2.5 и 2.4 раза, соответственно.

Унивариативный анализ, проведенный Liu S. et al., показал, что *SLCO1B1* rs4149056 достоверно ассоциируется с риском развития событий ($p < 0,001$). По сравнению с пациентами, имеющими генотип ТС или ТТ rs4149056, больные с

генотипом СС имели худший прогноз (5-летняя БСВ $90,5 \pm 1,7$ против $33,3 \pm 19,2\%$). Среди шести пациентов с генотипом rs4149056 СС у троих пациентов отмечен рецидив и один умер от инфекционных осложнений [39]. В нашем исследовании значимых различий не обнаружено, возможно это связано с несоответствием исследуемых генотипов гена *SLCO1B1* rs4149056 в нашей выборке пациентов равновесию Харди-Вайнберга.

В исследовании Нао Q. et al. анализировались ассоциации между концентрацией МТХ в сыворотке крови, задержкой элиминации МТХ и токсичностью, связанной с МТХ, также было показано, что почечная токсичность была значимо ассоциирована с высокой концентрацией МТХ в сыворотке крови и высокой частотой задержки элиминации МТХ, что может быть обусловлено опосредованной эндогенными метаболитами дистанционной связью между белками-транспортерами в печени и почках [140, 136]. Концентрация МТХ в сыворотке крови пациентов с генотипом *SLCO1B1* rs4149056 ТТ через 48 и 72 часа была значительно выше, чем у пациентов с генотипом ТС или СС ($p=0,014$ и $p=0,019$, соответственно). Кроме того, повышенный риск нейтропении был связан с вариантом rs4149056 (генотипы ТС или СС) [140], а в нашем исследовании у пациентов с генотипом ТТ гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ($p=0,046$, ОШ: 2,7 (95% ДИ: 1,7,1)), что также имеет связь с течением агранулоцитоза. В исследовании Yang's F. et al. генотип rs11045879 данного гена был связан с анальным мукозитом, а rs4149056 - с тромбоцитопенией, почечной токсичностью и анальным мукозитом [138].

В исследовании, проведенном Treviño L.R. et al. в рамках геномного анализа два варианта *SLCO1B1*, rs4149081 и rs11045879, также были идентифицированы как ассоциированные с токсичностью, связанной с МТХ и его клиренсом [60]. Ramsey et al. подтвердили, что варианты *SLCO1B1*, rs4149056 и rs2306283, являются предикторами замедленного клиренса МТХ у пациентов с ОЛЛ [79, 122]. В их исследовании были установлены ассоциации между *SLCO1B1*

rs4149056 и сывороточным уровнем МТХ и задержкой его элиминации, что аналогично результатам den Hoed M. A. et al. [142]. Различия в этих результатах указывают на то, что генетические полиморфизмы могут влиять на функцию белка-транспортера *SLCO1B1* одновременно через разные SNP [60]. Вариант *SLCO1B1* rs4149056 был достоверно связан с фармакокинетикой МТХ. В модели мультивариабельной регрессии площадь под кривой "концентрация-время" $(AUC)_{0-48ч}$ МТХ увеличивалась на 26% ($p < 0.01$) в зависимости от аллеля гена *SLCO1B1* rs4149056, $AUC_{0-48ч}$ МТХ являлась значимым предиктором общих токсических нежелательных явлений во время курсов терапии МТХ ($R(2) = 0,043$; $p < ,001$) [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного анализа безопасности и эффективности терапии метотрексатом у детей с ОЛЛ в зависимости от носительства ряда полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* свидетельствуют о необходимости проведения фармакогенетического тестирования с целью выявления аллеля СС «дикий тип» гена *ABCB1* rs1128503 для прогнозирования развития выраженного орофарингеального мукозита, а также аллеля ТТ гена *SLCO1B1* T521Crs4149056 для прогнозирования развития выраженных инфекционных осложнений, выявления носителей «дикого» генотипа GG *ABCB1* rs2032582 и генотипа ТТ *ABCB1* rs4148738 для определения группы пациентов с повышенным риском развития событий (рецидива и смерти) в отсроченном периоде.

В заключение следует отметить, что имеющиеся данные подтверждают наличие ассоциаций между генами *SLCO1B1* и *ABCB1* и повышенным риском токсичности HD-MTX. Многие современные исследования часто не обладают достаточной мощностью и непригодны для изучения ассоциаций полиморфизмов генов бексов-транспортеров с токсичностью, эффективностью и прогнозом, однако их число неуклонно растет.

Таким образом, генотипирование полиморфизмов гена *ABCB1* до начала лечения может быть потенциально полезным с целью индивидуальной адаптации терапии HD-MTX и прогнозирования токсичности у пациентов с ОЛЛ. В дальнейшем необходимо проведение более крупных валидизированных исследований генетических ассоциаций с терапией высокодозным метотрексатом.

ВЫВОДЫ

1. Токсические нежелательные лекарственные реакции (≥ 3 степени выраженности) при терапии высокодозным метотрексатом у детей с острым лимфобластным лейкозом включают: гематологическую токсичность (87,9%), орофарингеальный мукозит (51,6%), гепатотоксичность (46%), инфекционные осложнения (34,6%), нейротоксичность (7,2%).

2. Неблагоприятные исходы терапии с включением высокодозного метотрексата были представлены рецидивом острого лимфобластного лейкоза (20,2%), рефрактерным течением (5%), второй опухолью (0,8%) и летальным исходом (12,9%).

3. При выявлении генотипа СС гена *ABCB1* rs1128503 повышен риск развития выраженного орофарингеального мукозита [$p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95% ДИ:1,01-4,55)]; у пациентов с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженной инфекции [$p=0,046$, ОШ: 2,7 (95% ДИ: 1,-7,1)], а у пациентов с генотипом ТТ *ABCB1* C3435T rs1045642 - нейротоксичности [$p=0,041$, ОШ: 2,3 (95% ДИ: 1,02,-5,12)]. Повышенный риск развития событий (рецидива и смерти) в отсроченном периоде отмечен у носителей генотипа GG гена *ABCB1* rs2032582 [$p=0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)] и ТТ гена *ABCB1* rs4148738 [$p=0,031$, ОШ: 2,4 (95% ДИ: 1,07-5,3)].

4. Степень выраженности орофарингеального мукозита и гепатотоксичности достоверно коррелирует с временем экскреции метотрексата. Полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1* не влияют на время экскреции метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом.

5. Показатели пятилетней бессобытийной выживаемости при остром лимфобластном лейкозе достоверно выше в группе носителей генотипов ТТ и GT, чем в группе носителей GG «дикий тип» гена *ABCB1* rs2032582 (90,5% и 72,1%, соответственно, $p=0,031$), в группе носителей СС «дикий тип» гена *ABCB1*

rs4148738 выше, чем у носителей генотипов TT и TC (96,2% и 78,8%, соответственно, $p=0,047$).

6. Разработанные с учетом фармакогенетических биомаркеров математические модели прогнозирования нежелательных исходов терапии обладают высокой чувствительностью ($>70\%$) и специфичностью ($>80\%$), достоверно ($p<0,001$) демонстрируют взаимосвязи клинических и генетических факторов, выступающих в роли предикторов терминальных событий (рецидив, смерть) при терапии высокодозным метотрексатом детей с ОЛЛ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При лечении острого лимфобластного лейкоза у детей необходимо проведение фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей генотипа GG «дикий тип» полиморфного варианта *ABCB1* rs2032582 и генотипа TT полиморфного варианта *ABCB1* rs4148738 для определения группы пациентов с повышенным риском развития неблагоприятных событий (рецидив, летальный исход) в отсроченном периоде.

2. Необходимо проведение фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей генотипа CC *ABCB1* rs1128503 для определения группы пациентов с повышенным риском развития орофарингеального мукозита 3-4 ст., генотипа TT полиморфного варианта *SLCO1B1* T521C rs4149056 для определения риска развития клинически значимой инфекции 3-5 ст.

3. Токсичность терапии ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009 может быть спрогнозирована в зависимости от мутационного статуса генов белков-переносчиков и скорости элиминации метотрексата.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных стволовых клеток

БРВ – безрецидивная выживаемость

БСВ – бессобытийная выживаемость

ВАШ – визуальная аналоговая шкала

ГемТ – гематологическая токсичность

Ген-кандидат – ген, который может быть связан с проявлением сложного признака либо с возникновением заболевания

ГепТ – гепатотоксичность

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МТХ – метотрексат

МТХПГ – МТХ-полиглутамат

Низкие дозы МТХ $< 50 \text{ мг/м}^2$

НЛР – нежелательных лекарственных реакций

НТ – нейротоксичность

ОВ – общая выживаемость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПТ – почечная токсичность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТГФ – тетрагидрофолат

ФГ – фармакогенетика

ФК – фармакокинетика

АВСВ1 – АТФ-связывающая кассета подсемейства В член 1

ALL IC-BFM 2009 — Acute Lymphoblastic Leukemia International Cooperation
Berlin - Frankfurt - Munster 2009

АТIC – рибонуклеотид трансформилаза

AUC – Area Under Curve, "концентрация-время"

CTCAE – Common Terminology Criteria for adverse events (общие терминологические критерии для нежелательных явлений)

DHFR – дигидрофолатредуктаза

GGH (ГГГ) – γ -глутамил-гидролаза

GWAS – (Genome Wide Association Studies) полногеномное исследование ассоциаций между генотипом и фенотипом

HD-MTX (high doses) MTX > 1000 мг/м²

MDR – белки множественной лекарственной резистентности

MTHFR – метилентетрагидрофолат редуктаза

SLC (solute carrier) – транспортеры (переносчики) растворенных веществ

SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

TYMS – тимидилат синтетаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шервашидзе, М.А. Перспективы оценки минимальной остаточной болезни в постиндукционном периоде при В-линейном остром лимфобластном лейкозе у детей / М.А. Шервашидзе, Т.Т. Валиев, Н.Н. Тупицын // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2020. – Т.7. – №2. – С. 15–22.
2. Валиев, Т.Т. Оценка токсичности терапии острого лимфобластного лейкоза по протоколу ALL IC-BFM 2002 / Т.Т. Валиев, М.А. Шервашидзе, Т.С. Бельшева // Онкогематология. – 2022. – Т.17. – №3. – С. 137–159.
3. Гурьева, О.Д. Генетические основы клинических вариантов токсичности химиотерапии у детей с острым лимфобластным лейкозом (обзор литературы) / О.Д. Гурьева, М.И. Савельева, Т.Т. Валиев // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2021. – Т.8. – №4. – С. 60–70.
4. Гурьева, О.Д. Обзор фармакогенетических аспектов токсичности метотрексата и 6-меркаптопурина при лечении острого лимфобластного лейкоза у детей / О.Д. Гурьева, М.И. Савельева, Т.Т. Валиев // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2021. – Т.8. – №3. – С.79-85.
5. Гурьева, О.Д. Влияние фармакогенетических параметров на клинические варианты токсичности метотрексата при остром лимфобластном лейкозе у детей / О.Д. Гурьева, М.И. Савельева, Т.Т. Валиев // Фарматека. – 2022. – Т.29. – №7. – С.66–70.
6. Роль фармакогенетических факторов в развитии побочных эффектов метотрексата при лечении злокачественных опухолей / Т.Т. Валиев, В.В. Семенова, А.Ю. Иконникова [и др.] // Современная Онкология. – 2021. – Т.23. – №4. – С. 622–627.
7. Шервашидзе, М. А. Совершенствование программ терапии острого лимфобластного лейкоза у детей: акцент на минимальную остаточную болезнь /

М. А. Шервашидзе, Т. Т. Валиев // Онкогематология. – 2020. – Т. 15. – №. 3. – С. 12–26.

8. Лечение острого лимфобластного лейкоза у подростков и молодых взрослых: опыт Москва–Берлин / А. В. Пшонкин, Ю. В. Румянцева, Д. В. Литвинов [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2016. – Т.3. – №1. – С. 35–43.

9. Протокол ALL-IC BFM 2002: результаты лечения острого лимфобластного лейкоза у детей в рамках многоцентрового клинического исследования / Т. Т. Валиев, М. А. Шервашидзе, И. В. Осипова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2022. – Т. 15. – № 2. – С. 119–129.

10. Полиморфизмы генов TPMT, NUDT15 и профиль токсичности 6-меркаптопурина у взрослых больных Rh-негативными острыми лимфобластными лейкозами/лимфомами при лечении по протоколу ОЛЛ-2016 / Е. С. Котова, О. А. Гаврилина, И. А. Якутик [и др.] // Онкогематология. – 2022. – Т. 17. – №3. – С. 98–117.

11. Brown, P. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / P. Brown, H. Inaba, C. Annesley // Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN. – 2020. – Vol. 18. – №1. – P. 81–112.

12. Systematic Review of Pharmacogenetic Factors That Influence High-Dose Methotrexate Pharmacokinetics in Pediatric Malignancies / Z.L. Taylor, J. Vang, E. Lopez-Lopez [et al.] // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – №11. – P.2837.

13. Outcome of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Sixty Years of Progress / E. Demidowicz, M. Pogorzała, M. Łęcka [et al.] // Anticancer research. – 2019. – Vol. 39. – №9. – P. 5203–5207.

14. Results of two consecutive treatment protocols in Polish children with acute lymphoblastic leukemia / Zawitkowska, J., Lejman, M., Romiszewski, M. [et al.] // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10. – №1. – P. 20168.

15. Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia / K. Csordas, O. Lautner-Csorba, A. F. Semsei [et al.] // *British journal of haematology*. – 2014. – Vol.166. – №3. – P. 410–420.
16. Cao, M. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook / M. Cao, M. Guo, D. Q. Wu, L. Meng // *Current drug metabolism*. - 2018. – Vol.19. – №14. – P. 1182–1187.
17. Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia / M. A. Esmaili, A. Kazemi, M. Faranoush [et al.] // *Iranian journal of basic medical sciences*, 2020. – Vol.23. – №6. – P. 800–809.
18. PG4KDS: a model for the clinical implementation of pre-emptive pharmacogenetics / J. M. Hoffman, C. E. Haidar, M. R. Wilkinson [et al.] // *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*. – 2014. – Vol. 166C. – №1. – P. 45–55.
19. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome / M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 347. – № 6220. – P.1260419 (1-9).
20. Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia / E. Lopez-Lopez, I. Martin-Guerrero, J. Ballesteros [et al.] // *Pediatric blood & cancer*. – 2011. – Vol. 57. – №4. – P.612–619.
21. Genetic factors involved in delayed methotrexate elimination in children with acute lymphoblastic leukemia / Y. Cheng, M. H. Chen, Q. Zhuang [et al.] // *Pediatric blood & cancer*. – 2021. – Vol. 68. – №5. – P.28858.
22. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia / N. K. Zgheib, M. Akra-Ismail, C. Aridi [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2014. – Vol. 24. – №8. – P.387–396.

23. ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol from August-14-2009. - URL: http://www.bialaczka.org/wpcontent/uploads/2016/10/ALLIC_BFM_2009.pdf (дата обращения: 20.12.2022). – Текст: электронный.
24. Revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues 2017 (4th edition): lymphoid tumors / I. L. Polyatskin, A. S. Artemyeva, Y. A. Krivolapov // *Arkhiv patologii*. – 2019. – Vol.81. – №3. – P. 59–65.
25. Implementation of Pharmacogenetics to Individualize Treatment Regimens for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia / D. Maamari, H. El-Khoury, O. Saifi [et al.] // *Pharmacogenomics and personalized medicine*. – 2020. – Vol.13. – P. 295–317.
26. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy / L. Mei, E. P. Ontiveros, E. A. Griffiths [et al.] // *Blood reviews*. – 2015. – Vol.29. – №4. – P. 243–249.
27. Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells in vivo / E. Lopez-Lopez, R. J. Autry, C. Smith [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2020. – Vol. 130. – №12. - P. 6600–6615.
28. Enrolling children with acute lymphoblastic leukaemia on a clinical trial improves event-free survival: A population-based study / C. Strahlendorf, J.D. Pole, R. Barber [et al.] // *British journal of cancer*. – 2018. – Vol. 118. – №15. – P. 744–749.
29. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate / S. C. Howard, J. McCormick, C. H. Pui [et al.] // *The oncologist*. 2016. – Vol. 21. – №12. – P. 1471–1482.
30. Widemann, B.C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity / B.C. Widemann, P.C. Adamson // *Oncologist*. – 2006. – Vol. 11. – №6. – P. 694–703.
31. Projected prevalence of actionable pharmacogenetic variants and level a drugs prescribed among us veterans health administration pharmacy users / C.

Chanfreau-Coffinier, L. E. Hull, J. A. Lynch [et al.] // JAMA network open. - 2019. – Vol.2. – №6. – P. e195345 (1-13).

32. Actionable pharmacogenetic variants in Hong Kong Chinese exome sequencing data and projected prescription impact in the Hong Kong population / M.H.C. Yu, M.C.Y. Chan, C.C.Y. Chung [et al.] // PLoS Genetics. – 2021. – Vol. 17. – P. e1009323 (1-15).

33. Results of CoALL 07-03 study childhood ALL based on combined risk assessment by in vivo and in vitro pharmacosensitivity / F. Schramm, U. Zur Stadt, M. Zimmermann [et al.] // Blood advances. – 2019. – Vol.3. – №22. – P. 3688–3699.

34. Polymorphisms on High-Dose Methotrexate Clearance in Children and Young Adults with Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma / R. R. Schulte, L. Choi, N. Utreja [et al.] // Clinical and Translational Science. – 2021. – Vol.14. – №1. – P. 343–353.

35. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia / R. Gorlick, E. Goker, T. Trippett [et al.] // The New England journal of medicine. – 1996. – Vol. 335. – №14. – P. 1041–8.

36. Laverdière, C. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia / C. Laverdière, S. Chiasson, I. Costea // Blood. – 2002. – Vol.100. – №10. – P.3832-4.

37. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia / E. Lopez-Lopez, J. Ballesteros, M.A. Piñan [et al.] // Pharmacogenetics and Genomics. – 2013. – Vol.23, №2. – P. 53-61.

38. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia / S. Radtke, O. Zolk, B. Renner [et al.] // Blood. – 2013. – Vol. 121. – №26. – P. 5145–53.

39. Methotrexate Disposition in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: what have we learnt from the genetic variants of drug transporters / Y. H. Hu, L. Zhou, S. S. Wang [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2019. – Vol. 25. – №6. – P. 627–634.
40. Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia / G. Gervasini, S.G. de Murillo, M. Jiménez [et al.] // *Gene* – 2017. – Vol.10. – №628. – P. 72–77.
41. Gervasini, G. Clinical Implications of Methotrexate Pharmacogenetics in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia / G. Gervasini, S. Mota-Zamorano // *Current drug metabolism*. – 2019. – Vol. 20. – №4. – P. 313–330.
42. PharmGKB summary: methotrexate pathway / T. S. Mikkelsen, C. F. Thorn, J. J. Yang [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2011. – Vol. 21. – № 10. – P. 679–686
43. Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers / A. Lima, H. Sousa, J. Monteiro [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2014. - Vol. 15. – № 12. – P. 1611–1635.
44. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia / E. Lopez-Lopez, I. Martin-Guerrero, J. Ballesteros [et al.] // *The pharmacogenomics journal*. – 2013. – Vol. 13. – №6. – P. 498–506.
45. Polymorphisms of MTHFR associated with higher relapse/death ratio and delayed weekly MTX administration in pediatric lymphoid malignancies / H. Fukushima, T. Fukushima, A. Sakai [et al.] // *Leukemia research and treatment*. – 2013. – Vol. 1. – P. 238528 (1-9).
46. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies / S. Suthandiram, G. G. Gan, S. Zain [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2014. – Vol. 15. – №11. – P. 1479–1494.

47. Association of ABCC2 with levels and toxicity of methotrexate in Malaysian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) / R. H. Razali, M. N. F. Noorizhab, H. Jamari [et al.] // *Pediatric hematology and oncology*. - 2020. – Vol. 37. – №3. – P. 185–197.
48. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia / J. Gregers, H. Gréen, I. J. Christensen [et al.] // *The pharmacogenomics journal*. – 2015. – Vol. 15. – № 4. – P. 372–379.
49. Ezhilarasan, D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms / D. Ezhilarasan // *Toxicology*. – 2021. – Vol. 458. – P. 152840.
50. Genetic variations in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity / S.H. Chen, D. Pei, W. Yang [et al.] // *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2010. – Vol. 88. – № 2. – P. 191-196.
51. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital / C. H. Pui, J. T. Sandlund, D. Pei // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – № 9. – P. 2690–2696.
52. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update / M. V. Relling, M. Schwab, M. Whirl-Carrillo [et al.] // *Clinical pharmacology and therapeutics*. – 2019. – Vol. 105. – №5. – P. 1095–1105.
53. Pharmacogenomic Markers of Methotrexate Response in the Consolidation Phase of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment / N. Kotur, J. B. Lazic, Ristivojevic [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – №4. – P. 468.
54. Assaraf, Y. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis / Y. Assaraf // *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. – 2006. – Vol. 9. – P. 227–246.

55. Rudin, S. The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment / S. Rudin, M. Marable, R. Huang // *Genomics, proteomics & bioinformatics*. – 2017. – Vol. 15. – № 2. – P. 82–93.
56. Niedzielska, E. The influence of genetic RFC1, MS and MTHFR polymorphisms on the risk of acute lymphoblastic leukemia relapse in children and the adverse effects of methotrexate / E. Niedzielska, J. Węclawek-Tompol, A. Matkowska-Kocjan, A. Chybicka // *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*. – 2013. – Vol. 22. – № 4. – P. 579–584.
57. Genetic polymorphisms associated to folate transport as predictors of increased risk for acute lymphoblastic leukemia in Mexican children / A. Reyes-Espinoza, V. Loera-Castañeda, M. Sosa-Macías [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 238.
58. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and the toxicity of methotrexate in childhood malignancies: a meta-analysis / C. Zhu, Y. W. Liu, S. Z. Wang [et al.] // *The pharmacogenomics journal*. – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 450–459.
59. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with Methotrexate pharmacokinetics and clinical effects / L. R. Treviño, N. Shimasaki, W. Yang [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 35. – P. 5972–5978.
60. Association of ABCC2 - 24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia / Y. Liu, Y. Yin, Q. Sheng [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e82681.
61. NUDT15 polymorphism and NT5C2 and PRPS1 mutations influence thiopurine sensitivity in acute lymphoblastic leukaemia cells / S. Somazu, Y. Tanaka, M. Tamai // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 25. – № 22. – P. 10521-10533.

62. Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia / K. Csordas, M. Hegyi, O. T. Eipel [et al.] // *Anticancer Drugs*. – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 2189–97.
63. Association between *SLC19A1* gene polymorphism and high dose methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin malignant lymphoma: introducing a haplotype based approach / B. F. Kotnik, J. Jazbec, P. B. Grabar [et al.] // *Radiology and oncology*. – 2017. – Vol. 51. – № 4. – P. 455–462.
64. Koźmiński, P. Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers / P. Koźmiński, P. K. Halik, R. Chesori // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 10. – P. 3483.
65. Hagner, N. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis / N. Hagner, M. Joerger // *Cancer management and research*. – 2010. – Vol. 2. – P. 293–301.
66. Cronstein, B.N. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis / B.N. Cronstein, T.M. Aune // *Nature reviews. Rheumatology*. – 2020. – Vol. 16. – №3. – P. 145–154.
67. Hou, Z. Biology of the major facilitative folate transporters *SLC19A1* and *SLC46A1* / Z. Hou, L. H. Matherly // *Current topics in membranes*. – 2014. – Vol. 73. – P. 175–204.
68. Methotrexate polyglutamates as a potential marker of adherence to long-term therapy in children with juvenile idiopathic arthritis and juvenile dermatomyositis: an observational, cross-sectional study [et al.] / A.F. Hawwa, A. AlBawab, M. Rooney // *Arthritis research & therapy*. – 2015. – Vol. 17. – P. 295.
69. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation / S.M. Ahmed, L. Luo, A. Namani [et al.] // *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. – 2017. – Vol. 1863. – P. 585–597.

70. Allard, J. Drug-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease / J. Allard, D. Le Guillou, K. Begriche, B. Fromenty // *Advances in pharmacology*. – 2019. – Vol. 85. – P. 75–107.

71. Brisson, G. D. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review / G. D. Brisson, L. R. Alves, M. S. Pombo-De-Oliveira // *Ecancelmedicalsecience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 1–28.

72. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human / M. S. Warren, N. Zerangue, K. Woodford [et al.] // *Pharmacological research*. – 2009. – Vol. 59. – P. 404–413.

73. D'ávila-Fajardo, C.L. Genetic risk factors for drug-induced liver injury in rheumatoid arthritis patients using low-dose methotrexate / C.L. D'ávila-Fajardo, J.J. Swen, J. Cabeza Barrera // *Pharmacogenomics*. – 2013. – Vol. 14. – P. 63–73.

74. Labadie, J. G. Noninvasive Tests to Monitor Methotrexate-Induced Liver Injury / J. G. Labadie, M. Jain // *Clinical liver disease*. – 2019. – Vol. 13. – № 3. – P. 67–71.

75. Inaba, H. Pediatric acute lymphoblastic leukemia / H. Inaba, C. G. Mullighan // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105. – № 11. – P. 2524–2539.

76. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates *SLCO1B1* / L.B. Ramsey, J.C. Panetta, C. Smith [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121. – P. 898–904.

77. Rare versus common variants in pharmacogenetics: *SLCO1B1* variation and methotrexate disposition / L.B. Ramsey, G.H. Bruun, W. Yang [et al.] // *Genome Research*. – 2012. – Vol. 22. – P. 1–8.

78. Park, J.A. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma / J.A. Park, H.Y. Shin // *Blood Research*. – 2016. – Vol. 51. – P. 50–5.

79. Folate pathway genetic polymorphisms modulate methotrexate-induced toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia / A.M. Yousef, R. Farhad, D.

Alshamaseen [et al.] // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2019. – Vol. 83. – P. 755–762.

80. Gharibi, S. Methotrexate-induced toxicities in children with malignancy: a systematic review and meta-analysis / S. Gharibi, A. A. Alizadeh, S. Malehi [et al.] // *World Cancer Research Journal*. – 2021. – Vol. 8. – P. e2041.

81. Effect of the Polymorphism of Folypolyglutamate Synthetase on Treatment of High-Dose Methotrexate in Pediatric Patients with Acute Lymphocytic Leukemia / Z. Huang, H. F. Tong, Y. Li [et al.] // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2016. – Vol. 22. – P. 4967–4973.

82. Lambrecht, L. The role of the MTHFR C677T polymorphism in methotrexate-induced toxicity in pediatric osteosarcoma patients / L. Lambrecht, C. Sleurs, V. Labarque [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2017. – Vol. 18. – P. 787–795.

83. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia / S.M. Wang, L.L. Sun, W.X. Zeng [et al.] // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2014. – Vol. 74. – P. 283–289.

84. Association of folypolyglutamate synthetase (FPGS) gene polymorphism with blood drug concentration as well as adverse reactions of methotrexate in children with acute leukaemia / Z. Huang, H.F. Tong, J.C. Qian [et al.] // *Biomedical Research*. – 2011. – Vol. 28. – P. 478–483.

85. Krajinovic, M. MTHFD1 gene: Role in disease susceptibility and pharmacogenetics / M. Krajinovic // *Pharmacogenomics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 829–832.

86. Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma / K. Goricar, V. Kovac, J. Jazbec [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2014. – Vol. 24. – P. 514–521

87. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia / N. Erculj, B.F.

Kotnik, M. Debeljak [et al.] // *Leukemia & lymphoma*. – 2012. – Vol. 53. – P. 1096–1104.

88. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE. Version 5.0) [Электронный ресурс] // U.S. Department of health and human services National Cancer Institute. – 2017. – URL: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf.

89. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia / M.A. Den Hoed, E. Lopez-Lopez, M.L. te Winkel [et al.] // *The pharmacogenomics journal*. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 248–254.

90. Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis / H. Maagdenberg, N. Oosterom, J. Zanen [et al.] // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2021. – Vol. 161. – P. 103312.

91. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase / N. Horie, H. Aiba, K. Oguro [et al.] // *Cell structure and function*. – 1995. – Vol. 20. – № 3. – P. 191–197.

92. In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile / M. J. Sorich, N. Pottier, D. Pei [et al.] // *PLoS medicine*. – 2008. – Vol. 5. – № 4. – P. e83.

93. Wang, S. M. Genotype and allele frequencies of TYMS rs2790 A > G polymorphism in a Chinese paediatric population with acute lymphoblastic leukaemia / S. M. Wang, W. X. Zeng, W. Wu [et al.] // *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. – 2018. – Vol. 43. – № 4. – P. 507–512.

94. Cwiklinska, M. Polymorphisms of SLC19A1 80 G>A, MTHFR 677 C>T, and Tandem TS repeats influence pharmacokinetics, acute liver toxicity, and vomiting in children with acute lymphoblastic leukemia treated with high doses of methotrexate /

M. Cwiklinska, K. Czogala, A. Kwiecinska [et al.] // *Frontiers in Pediatrics*. – 2020. – Vol. 8. – P. 307.

95. Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma / M. Hegyi, A. Arany, A. F. Semsei [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 6. – P. 9388–9398.

96. Frequency distribution of five SNPs in human GGH gene and their effects on clinical outcomes of Chinese pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia / M. Li, S. M. Wang, W. S. Wu [et al.] // *Die Pharmazie*. – 2020. – Vol. 75. – P. 142-146.

97. Effect of the Polymorphism of Folylpolyglutamate Synthetase on Treatment of High-Dose Methotrexate in Pediatric Patients with Acute Lymphocytic Leukemia / Z. Huang, H. F. Tong, Y. Li [et al.] // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2016. – Vol. 22. – P. 4967–4973.

98. Eradication of leukaemic cells (L1210) by methotrexate and methotrexate plus citrovorum factor / A. Goldin, J. M. Venditti, I. Kline, N. Mantel // *Nature*. – 1966. – Vol. 212. – № 5070. – P. 1548–1550.

99. Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia / K. Csordas, O. Lautner-Csorba, A. F. Semsei [et al.] // *British journal of haematology*. – 2014. – Vol. 166. – P. 410–420.

100. Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma / K. Goricar, V. Kovac, J. Jazbec [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2014. – Vol. 24. – P. 514–521.

101. Influence of pre-hydration and pharmacogenetics on plasma methotrexate concentration and renal dysfunction following high-dose methotrexate therapy / M. Yanagimachi, H. Goto, N. Kaneko [et al.] // *International journal of hematology*. – 2013. – Vol. 98. – P. 702–707.

102. Genetic factors involved in delayed methotrexate elimination in children with acute lymphoblastic leukemia / Y. Cheng, M. H. Chen, Q. Zhuang [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2021. – Vol. 68. – P. e28858

103. Effect of SLCO1B1 Polymorphisms on High-Dose Methotrexate Clearance in Children and Young Adults With Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma / R. R. Schulte, L. Choi, N. Utreja [et al.] // *Clinical and translational science*. – 2021. – Vol. 14. – P. 343–353.

104. Schmiegelow, K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review / K. Schmiegelow // *British journal of haematology*. – 2009. – Vol. 146. – № 5. – P. 489–503.

105. Association of SLCO1B1 gene polymorphisms with toxicity response of high dose methotrexate chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia / J. Li, X. R. Wang, X. W. Zhai [et al.] // *International journal of clinical and experimental medicine*. – 2015. – Vol. 8. – № 4. – P. 6109–6113.

106. SEER Cancer Statistics Review 1975-2016 / N. Howlader, A. M. Noone, M. Krapcho [et al.] // National Cancer Institute. – 2016. – URL: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/index.html (date of reference: 19.02.2022). – Text : electronic.

107. Terwilliger, T. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update / T. Terwilliger, M. Abdul-Hay // *Blood cancer journal*. – 2017. – Vol. 7. – № 6. – P. e577.

108. Inaba, H. Acute lymphoblastic leukaemia / H. Inaba, M. Greaves, C. G. Mullighan // *Lancet*. – 2013. – Vol. 381. – № 9881. – P. 1943–1955.

109. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group / J. M. Hilden, P. A. Dinndorf, S. O. Meerbaum [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – № 2. – P. 441–451.

110. The evolution of clinical trials for infant acute lymphoblastic leukemia / R.S. Kotecha, N.G. Gottardo, U.R. Kees, [et al.] // *Blood cancer journal*. – 2014. – Vol. 4. – № 4. – P. e200.

111. Disseminated lymphoblastic lymphoma in children and adolescents: results of the COG A5971 trial: a report from the Children's Oncology Group / A. M. Termuhlen, L. M. Smith, S. L. Perkins [et al.] // *British journal of haematology*. – 2013. – Vol. 162. – № 6. – P. 792–801.

112. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate / S. C. Howard, J. McCormick, C. H. Pui [et al.] // *Oncologist*. – 2016. – Vol. 21. – № 12. – P. 1471–1482.

113. The population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in infants with acute lymphoblastic leukemia highlight the need for bedside individualized dose adjustment: a report from the Children's Oncology Group / R. J. Beechinor, P. A. Thompson, M. F. Hwang // *Clinical pharmacokinetics*. – 2019. – Vol. 58. – № 7. – P. 899-910.

114. Clinical pharmacokinetics of methotrexate / D. D. Shen, D. L. Azarnoff // *Clinical pharmacokinetics*. – 1978. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–13.

115. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates *SLCO1B1* / L. B. Ramsey, J. C. Panetta, C. Smith [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121. – № 6. – P. 898–904.

116. Influence of human *OATP1B1*, *OATP1B3*, and *OATP1A2* on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice / E. van de Steeg, A. van Esch, E. Wagenaar [et al.] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19. – № 4. – P. 821–832.

117. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? / B. A. Chabner, C. J. Allegra, Q. A. Curt [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 1985. – Vol. 76. – № 3. – P. 907–12.

118. Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia--a logistic regression analysis / C. Rask, F. Albertioni, S. M. Bentzen [et al.] // *Acta Oncologica*. – 1998. – Vol. 37. – № 3. – P. 277–284.

119. Factors influencing methotrexate pharmacokinetics highlight the need for individualized dose adjustment: a systematic review / Y. Yang, Z. Liu, J. Chen [et al.] // *European journal of clinical pharmacology*. – 2024. – Vol. 80. – № 1. – P. 11–37.

120. Simultaneous determination of urine methotrexate, 7-Hydroxy Methotrexate, Deoxyaminopteroic Acid, and 7-Hydroxy Deoxyaminopteroic Acid by UHPLC-MS/MS in patients receiving high-dose methotrexate therapy / S. Mei, Y. Cui, D. Zhang [et al.] // *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 36. – № 12. – P. 1479–1483.

121. The Role of Genetic Polymorphisms in High-Dose Methotrexate Toxicity and Response in Hematological Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis / Z. Song, Y. Hu, S. Liu [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2021 – Vol. 12. – P. 757464.

122. Methotrexate polyglutamates. / Z. Yang, J. Mo, W. Li [et al.] // *Expert review of clinical pharmacology*. – 2024. – Vol. 17. – № 11. – P. 1025–1037.

123. Yang, L. Impact of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms on Methotrexate-Induced Toxicities in Acute Lymphoblastic Leukemia: a Meta-Analysis / L. Yang, X. Hu, L. Xu // *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 33. – № 5. – P. 1445–1454.

124. Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and across Epithelia / R. Zhao, N. Diop-Bove, M. Visentin [et al.] // *Annual review of nutrition*. – 2011. – Vol. 31. – P. 177–201.

125. Kamen, B. Folate and antifolate pharmacology / B. Kamen // *Seminars in oncology*. – 1997. – Vol. 24. – P. 18-39.

126. Ma, C. X. ABCB1 Polymorphisms Correlate with Susceptibility to Adult Acute Leukemia and Response to High-Dose Methotrexate / C. X. Ma, Y. H. Sun, H. Y. Wang // *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 36. – № 10. - P. 7599–7606.

127. Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis / T. Kato, A. Hamada, S. Mori [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2012. – Vol. 27. – № 2. – P. 192–199.

128. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia / S. G. Liu, C. Gao, R. D. Zhang [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 23. – P. 37761–37772.

129. Endogenous metabolites-mediated communication between OAT1/OAT3 and OATP1B1 may explain the association between SLCO1B1 SNPs and methotrexate toxicity / D. Martinez, K. Muhrez, J.B. Woillard [et al.] // *Clinical pharmacology and therapeutics.* – 2018. – Vol. 104. – № 4. – P. 687–698.

130. Effects of SLCO1B1 on elimination and toxicities of high-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia / F. F. Yang, T. L. Xue, C. Gao [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2022. – Vol. 23. – № 15. – P. 821–834.

131. Impact of SLCO1B1 521T > C variant on leucovorin rescue and risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with high-dose methotrexate / H. N. Zhang, X. L. He, C. Wang [et al.] // *Pediatric Blood & Cancer.* – 2014. – Vol. 61. – № 12. – P. 2203–2207.

132. Effects of genetic polymorphisms on methotrexate levels and toxicity in Chinese patients with acute lymphoblastic leukemia / Q. Hao, Y. Song, Q. Fang [et al.] // *Blood Science.* – 2022. – Vol. 5. – № 1. – P. 32–38.

133. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects / L. R. Treviño, N. Shimasaki, W. Yang [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2009. – Vol. 27. – № 35. – P. 5972–5978.

134. Halestrap, A. P. The SLC16 gene family – structure, role and regulation in health and disease / A. P. Halestrap // *Molecular aspects of medicine.* – 2013. – Vol. 34. – № 2–3. – P. 337–349.

135. National Center for Biotechnology Information: dbSNP – Short Genetic Variations: база данных / URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/get_html.cgi?whichHtml=overview (дата обращения 11.10.2023). – Режим доступа: свободный просмотр. – Текст: электронный.
136. Subcellular localization and distribution of the reduced folate carrier in normal rat tissues / M. Hinken, S. Halwachs, C. Kneuer [et al.] // *European journal of histochemistry*. – 2011. – Vol. 55. – P. e3.
137. Baslund, B. Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4+ T cells / B. Baslund, J. Gregers, C. H. Nielsen // *Rheumatology*. – 2008. – Vol. 47. – № 4. – P. 451–453.
138. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines / C. Hilgendorf, G. Ahlin, A. Seithel [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2007. – Vol. 35. – №8. – P. 1333–1340.
139. The human organic anion transporter 3 (OAT3; SLC22A8): genetic variation and functional genomics / A. R. Erdman, L. M. Mangravite, T. J. Urban [et al.] // *American journal of physiology. Renal physiology*. – 2006. – Vol. 290. – № 4. – P. F905–912.
140. Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants / I. Badagnani, R. A. Castro, T. R. Taylor [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – Vol. 318. – № 2. – P. 521–529.
141. Niemi, M. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake / M. Niemi, M. K. Pasanen, P. J. Neuvonen // *Pharmacological reviews*. – 2011. – Vol. 63. – № 1. – P. 157–181.
142. Wang, D. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability / D. Wang, A. D. Johnson, A. C. Papp, W. Sadée // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2005. – Vol. 15. – № 10. – P. 693–704.

143. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine / S. Berggren, C. Gall, N. Wollnitz [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2007. – Vol. 4. – № 2. – P. 252–257.

144. Interindividual variability in hepatic expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2): quantification by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / A. K. Deo, B. Prasad, L. Balogh [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2012. – Vol. 40. – № 5. – P. 852–855.

145. Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver / T. Lang, M. Hitzl, O. Burk [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2004. – Vol. 14. – № 3. – P. 155–164.

146. Fry, D.W. Rapid formation of poly-gamma-glutamyl derivatives of methotrexate and their association with dihydrofolate reductase as assessed by high pressure liquid chromatography in the Ehrlich ascites tumor cell in vitro / D.W. Fry, J. C. Yalowich, I. D. Goldman // *The Journal of biological chemistry*. – 1982. – Vol. 257. – № 4. – P. 1890–6.

147. Andreassi, J. L. 2nd. Mouse foyllypoly-gamma-glutamate synthetase isoforms respond differently to feedback inhibition by foyllypolyglutamate cofactors / J. L. 2nd Andreassi, R. G. Moran // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – № 1. – P. 226-35.

148. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on the outcome of pediatric patients with non-Hodgkin lymphoma treated with high-dose methotrexate / V. D'Angelo, M. Ramaglia, A. Iannotta [et al.] // *Leuk Lymphoma*. – 2013. – Vol. 54. – P. 2639–2644.

149. Acute bone marrow suppression and gastrointestinal toxicity following acute oral methotrexate overdose / K. Z. Isoardi, K. Harris, K. E. Carmichael [et al.] // *Journal of Clinical Toxicology*. – 2018. – Vol. 56. – P. 1204–1206.

150. Luu, B. Does low-dose methotrexate deserve more respect from clinicians? / B. Luu, G. W. Rodway // *AAPA: official journal of the American Academy of Physician Assistants*. – 2017. – Vol. 30. – P. 12–15.

151. Sonis, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis / S. T. Sonis // *Oral Oncology*. – 2009. – Vol. 45. – P. 1015–1020.

152. Кофиади, И.А. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой / И.А. Кофиади, Д.В. Ребриков // *Генетика*. – 2006. – Т. 42. – № 1. – С.22-32.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Рисунок А.1 - Схема протокола ALL IC-BFM 2009. Стратификация на прогностические группы риска

