

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025 г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
доктор медицинских наук, доцент

Валиев Тимур Теймуразович
Савельева Марина Ивановна

Официальные оппоненты:

Кантемирова Бэла Исмаиловна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Алешина Ольга Александровна, кандидат медицинских наук, заведующий отделом клеточной и иммунной терапии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «15» мая 2025 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — наиболее распространенный вид злокачественных новообразований (ЗНО) у детей, на который приходится около 30% всех ЗНО. Ряд исследователей отметили значительную межиндивидуальную вариабельность токсичности лекарственных средств и исходов заболевания, обнаружив роль фармакогенетики (ФГ) в выявлении полиморфизмов генов-кандидатов для оптимизации терапевтических подходов [Evans W.E., 2004 г., Crews K.R., 2020 г., Schulte R. R., 2021 г., Lopez-Lopez E., 2013 г., Treviño L.R., 2009 г.].

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 [Коркина Ю.С., 2023 г.]. На каждом этапе становления протоколов терапии ОЛЛ, включения новых препаратов (метотрексата (МТХ), 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 профессоров отечественной школы детских онкогематологов [Махонова Л.А., 2011 г., Румянцев А.Г., 2018 г.], а современные режимы химиотерапии были проанализированы с точки зрения эффективности и токсичности [Валиев Т.Т., 2021 г., 2022 г.]. Сравнительные результаты терапии ОЛЛ группы высокого риска у детей по протоколам МБ-2002 и МБ-2008 представлены в работах, в которых также упоминается актуальность ФГ тестирования для разработки лечебной тактики [Литвинов Д.В., 2023 г.].

К настоящему времени в РФ не проводилось изучение эффективности и токсичности лечения детей с ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009 с акцентом на фармакогенетическое исследование полиморфизмов генов белков-переносчиков лекарственных средств. Для выявления возможных ассоциаций полиморфных

вариантов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с фармакокинетикой (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.

Методология и методы исследования

Основа данной работы — база данных, сформированная согласно полученным результатам лечения пациентов детского возраста. Генотипирование полиморфных маркеров *ABCB1* C3435T (rs1045642), C1236T (rs1128503), G2677T (rs2032582) и *SLCO1B1* T521C (rs4149056) проводилось методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Для статистической обработки результатов использовали программу IBM SPSS Statistics 26.0 (США). Анализ выживаемости проводился методом Каплана-Мейера. При проверке статистических гипотез нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости менее 0,05. Для формирования математических прогностических моделей применялся метод построения логистической функции с помощью бинарной логистической регрессии с пошаговым отбором факторов и проведением, при необходимости, дополнительного построения ROC-кривых с последующим ROC-анализом. Достоверными считали различия при $p < 0,05$; при $p \geq 0,05$ различия считали маловероятными и статистически недостоверными.

Научная новизна

В настоящей работе впервые в отечественной онкогематологии у детей с острым лимфобластным лейкозом изучена частота встречаемости генетических полиморфизмов белков-транспортеров метотрексата *ABCB1* и *SLCO1B1*. Определены ассоциативные связи между токсическими нежелательными лекарственными реакциями (≥ 3 степеней выраженности) высокодозного метотрексата, неблагоприятными исходами терапии и носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* у детей с острым лимфобластным лейкозом. 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

В результате проведенного исследования расширены представления о частоте встречаемости и структуре нежелательных лекарственных реакций на высокодозный метотрексат. 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.

Личный вклад

Участие в обследовании и проведении терапии больных по протоколу ALL IC-BFM 2009. Сбор информации о пациентах, анализ истории болезни и катамнестического анамнеза. Создание и обработка электронной базы данных, статистический анализ полученных результатов. Поиск и анализ современной отечественной и зарубежной литературы. Представление результатов в печатном виде.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует 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».

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.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты исследования об эффективности и безопасности терапии метотрексатом на основе фармакогенетического тестирования при остром

лимфобластном лейкозе у детей внедрены в практическую деятельность научно-исследовательского института детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения в практику от 18.09.2024 г.). В клинической деятельности используются разработанные практические рекомендации по проведению фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей генотипов СС гена *ABCB1* rs1128503, GG гена *ABCB1* rs203258, ТТ гена *ABCB1* rs4148738, ТТ гена *SLCO1B1* T521C rs4149056, и 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 ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

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 детей 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.

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).

Результаты диссертации доложены на всероссийских и международных конференциях: на Российской зимней школе молодых ученых и врачей по фармакогенетике, фармакогеномике и персонализированной терапии (2 февраля 2022 г., г. Москва), II Мультицентровой встрече «Российской группы ВФМ» (11–12 ноября 2022 г.), на научно-практической конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (21 октября 2022 г., 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).

Публикации

Основные результаты диссертационного исследования представлены в 3 публикациях, из них 2 статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований.

Объём и структура работы

Диссертационная работа состоит из 3 глав, введения, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендации, списка сокращений и

условных обозначений, приложений и списка литературы, включающего 152 литературных источника. Объем работы составляет 129 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 17 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клиническая часть работы проведена на базе НИИ детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 15.03.2016 г. по 29.11.2022 г. Проведен 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. 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 протоколов терапии оценивалась согласно критериям шкалы CTCAE v5.0 2018 года, нежелательные реакции (НЛР) со степенью тяжести ≥ 3 определялись как токсические. Изучалась взаимосвязь НЛР, у пациентов, получавших высокодозный МТХ 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 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. Критерии отбора однонуклеотидных полиморфизмов были следующими: частота минорных аллелей $>5\%$, гены, соответствовавшие равновесию Харди–Вайнберга (HWE) и уровень доказательности ранее опубликованных исследований.

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).

Набор материала для исследования проводился в период с 2021 по 2022 гг. Медиана наблюдения 42 месяца (минимальный срок наблюдения 5 месяцев, максимальный - 90). Проведен проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного одноцентрового исследования, дизайн которого представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 - Схема дизайна диссертационного исследования

Исследованы образцы периферической крови 124 пациентов: соотношение пациентов мужского ($n = 70$) и женского ($n = 54$) пола составило 1,2/1, медиана возраста - 7 лет. 106 пациентов проходили обследование и лечение по программе ALL IC-BFM 2009, 18 - по программе ALL REZ BFM 2002. Демографические и клинические данные детей с ОЛЛ представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Обобщенные демографические и клинические данные детей с ОЛЛ, получивших метотрексат ($n=124$)

Характеристика	Индикатор, единицы измерения	Значение переменной
Демографические данные	Медиана возраста, Ме (Q1-Q3), лет	7 (4-11)
	Возраст <1 года, n (%)	5 (4)
	Возраст 1-3 года, n (%)	16 (13)
	Возраст 4-5 лет, n (%)	34 (27,4)
	Возраст 6-12 лет, n (%)	42 (33,9)
	Возраст 13-18 лет, n (%)	27 (21,8)
Иммуноподвариант ОЛЛ	В-линейный, n (%)	84 (67,7)
	T-линейный, n (%)	40 (32,3)
Группы риска	Стандартный риск, n (%)	9 (7,2)
	Средний риск, n (%)	50 (40,3)
	Высокий риск, n (%)	55 (44,4)
Доза метотрексата	1г/м ² , n (%)	19 (15,3)
	2г/м ² , n (%)	41 (33,1)
	5г/м ² , n (%)	64 (51,6)
	Время выведения МТХ, Ме (Q1-Q3), ч	48 (48-54)
Статус токсичности	Гепатотоксичность 0-2 ст., n (%)	67 (54)
	Гепатотоксичность 3-4 ст., n (%)	57 (46)
	Нефротоксичность 0 ст., n (%)	120 (96,8)
	Нефротоксичность 1 ст., n (%)	3 (2,4)
	Нефротоксичность 2 ст., n (%)	1 (0,8)
	Гематотоксичность 1-2 ст., n (%)	15 (12,1)
	Гематотоксичность 3-4 ст., n (%)	109 (87,9)
	Нейротоксичность 0 ст., n (%)	81 (65,3)
	Нейротоксичность 1 ст., n (%)	23 (18,5)
	Нейротоксичность 2 ст., n (%)	11 (8,9)
	Нейротоксичность 3 ст., n (%)	6 (4,8)
	Нейротоксичность 4 ст., n (%)	3 (2,4)
	Орофарингеальный мукозит 0-2 ст., n (%)	60 (48,4)
	Орофарингеальный мукозит 3-4 ст., n (%)	64 (51,6)
	Инфекционные осложнения 0-2 ст., n (%)	81 (65,4)
	Инфекционные осложнения 3-5 ст., n (%)	43 (34,6)

Продолжение таблицы 1

Исходы лечения	Событие, n (%)	35 (28,2)
	Рецидив, n (%)	25 (20,2)
	Рефрактерное течение/вторая опухоль	6 (4,8)
	Смерть, n (%)	16 (12,9)
	Ремиссия, n (%)	108 (87,1)

Результаты исследования

В анализируемой группе больных из 124 пациентов с ОЛЛ 12,9% умерли, 87,1% находятся в полной 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), 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 2.

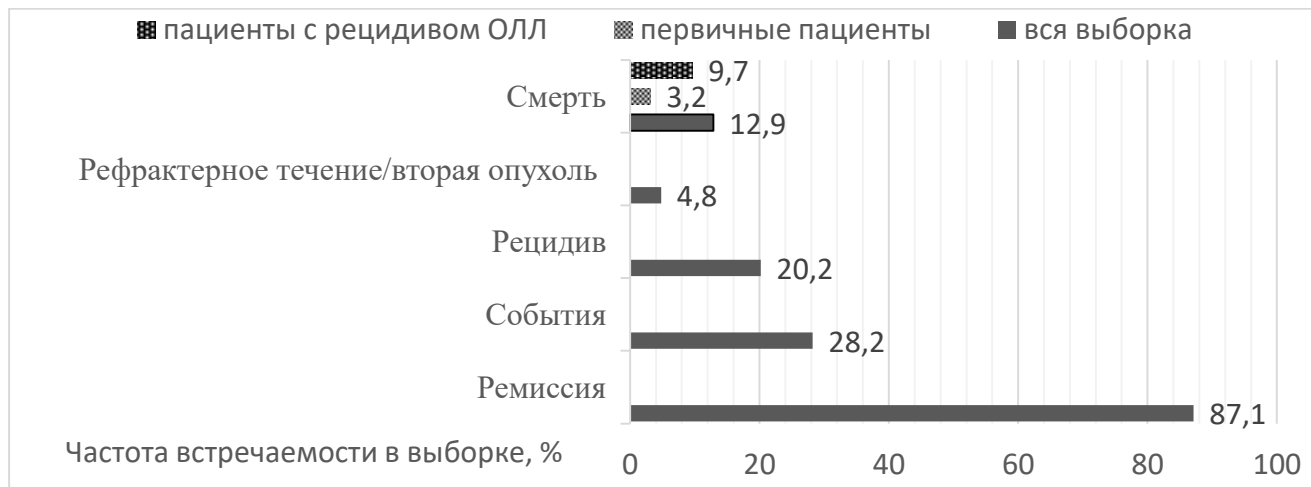


Рисунок 2 - Графическое изображение частоты встречаемости исходов лечения детей с ОЛЛ в исследуемой выборке (n=124)

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. Согласно полученным данным, у носителей генотипа GG полиморфного варианта *ABCB1* rs2032582

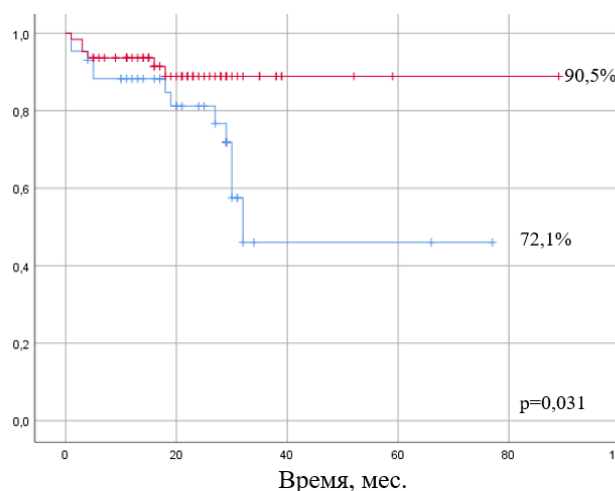
выявлен повышенный риск развития событий (рецидив, смерть) ($p=0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)). Кроме того, это подтверждено при группировке данных пациентов-носителей генотипа GG «дикий тип» rs2032582 в сравнении с генотипами GT и TT, где также был повышен риск развития событий в отсроченном периоде ($p=0,023$, ОШ: 2,5 (95% ДИ: 1,12-5,5)). Также отмечено, что у пациентов с генотипом TT *ABCB1* rs4148738 повышен риск развития того или иного события ($p=0,031$, ОШ: 2,4 (95% ДИ: 1,07-5,3)). Кроме того, отмечена тенденция к снижению риска возникновения летального исхода при наличии генотипа СТ *ABCB1* rs4148738 ($p=0,087$). Результаты терапии МТХ ОЛЛ у 106 больных, с первичным установленным диагнозом ОЛЛ, получивших МТХ в дозе 2000 мг/м² и 5000 мг/м² в зависимости от мутационного статуса генов *ABCB1* и *SLCO1B1* и дозировки МТХ, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Показатели бессобытийной выживаемости больных ОЛЛ в зависимости от полиморфных вариантов генов белков-транспортёров *ABCB1* и *SLCO1B1* и дозировки метотрексата

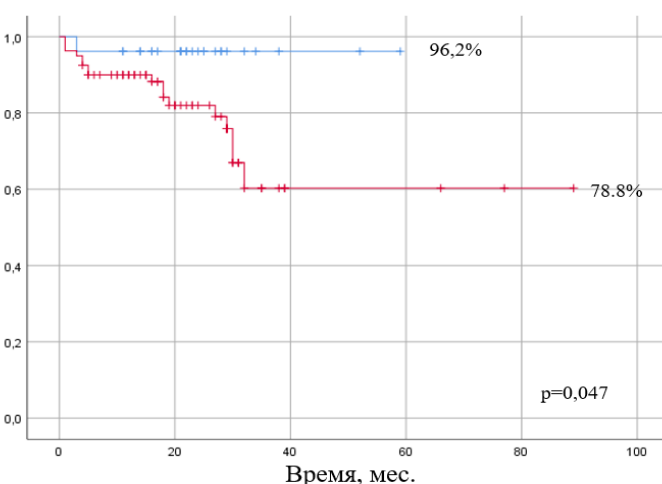
Выжи- ваемость	Фактор	%	Медиана (Me) *, 75% квартиль (месяцы)	p-value
БСВ	<i>ABCB1</i> C3435T rs1045642:			
	СС «дикий тип»	83,3	32 ± 5	0,845
	группа TT и TC	82,9	30 ± 0,7	
	rs1128503: СС «дикий тип»	74,3	29 ± 5,7	0,278
	группа TT и TC	87,3	30 ± 1,6	
	rs2032582: GG «дикий тип»	72,1	32*	0,031
группа TT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

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 «диким» типом GG достоверно различался: 90,5% (n=63) и 72,1% (n=43), $p = 0,031$ (Рисунок 3 А). Показатель пятилетней БСВ у больных с генотипами ТТ и ТС гена *ABCB1* rs4148738 и «диким» типом СС достоверно различался: 78,8% (n=80) и 96,2% (n=26), $p = 0,047$ (Рисунок 3 Б). Среди других полиморфных вариантов и «диких» типов генов белков-транспортеров достоверных различий при оценке выживаемости (в том числе ОВ, БРВ) не получено.



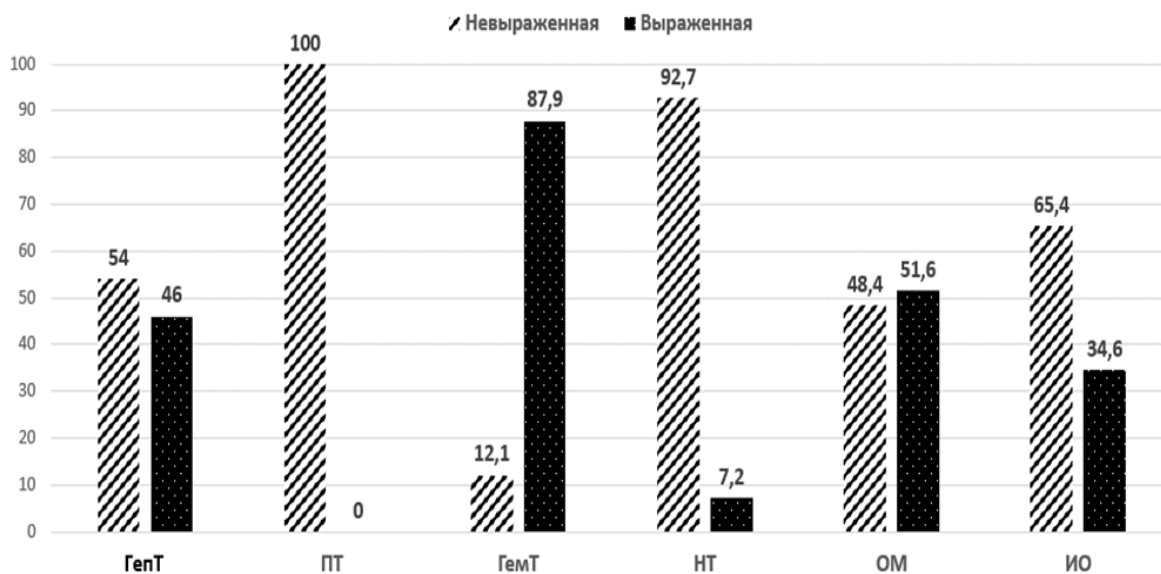
А - Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1* rs2032582 (красный цвет – БСВ пациентов с генотипами GT и ТТ, синий цвет - БСВ пациентов с «диким» типом GG)



Б - Бессобытийная выживаемость пациентов в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1* rs4148738 (красный цвет – БСВ пациентов с генотипами ТС и ТТ, синий цвет - БСВ пациентов с «диким» типом СС)

Рисунок 3 – Бессобытийная выживаемость больных ОЛЛ в зависимости от полиморфизмов гена *ABCB1*

Результаты оценки частоты встречаемости НЛР метотрексата по степеням тяжести были объединены в две подгруппы: невыраженные (0-2 ст.) и выраженные (≥ 3 ст.) НЛР, сравнение которых наглядно представлено на рисунке 4.



ГепТ – гепатотоксичность, ПТ – почечная токсичность, ГемТ – гематологическая токсичность, НТ – нейротоксичность, ОМ – орофарингеальный мукозит, ИО – инфекционные осложнения.

Рисунок 4 - Сравнение невыраженных и выраженных степеней тяжести НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ

Ассоциативный анализ полиморфных вариантов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с клиническими и биохимическими нежелательными лекарственными реакциями, а также с временем экскреции метотрексата, отражающим фармакокинетику препарата при ОЛЛ у детей, проводился при помощи критерия χ^2 Пирсона с использованием таблиц сопряженности.

Пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* C3435T rs1045642 имеют повышенный риск развития нейротоксичности ($p=0,041$, ОШ: 2,3 (95% ДИ: 1,02 - 5,12)). Пациенты с генотипом СС гена *ABCB1* rs1128503 имеют повышенный риск развития выраженного орофарингеального мукозита ($p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95% ДИ: 1,01 - 4,55)), а генотип ТТ гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 ассоциирован с повышенным риском развития выраженной инфекции ($p=0,046$, ОШ: 2,7 (95% ДИ: 1,1-7,1)). Другие виды токсических НЛР на МТХ во взаимосвязи с носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* не показали достоверных различий (Рисунок 5).

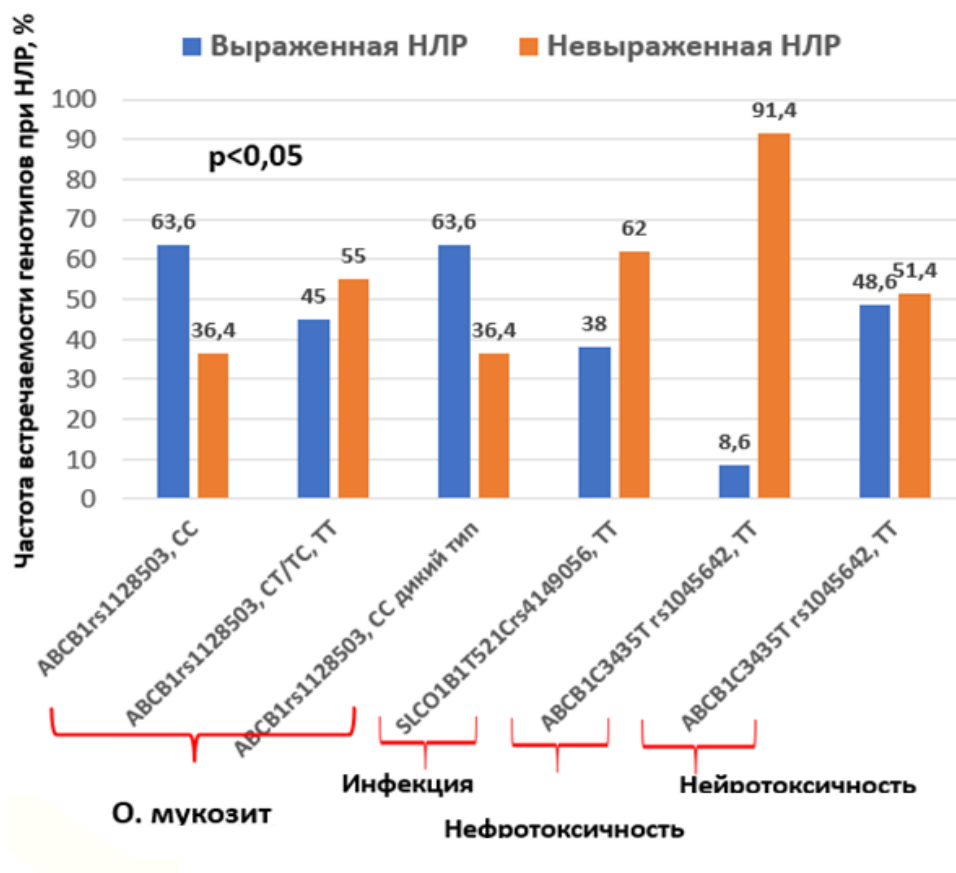
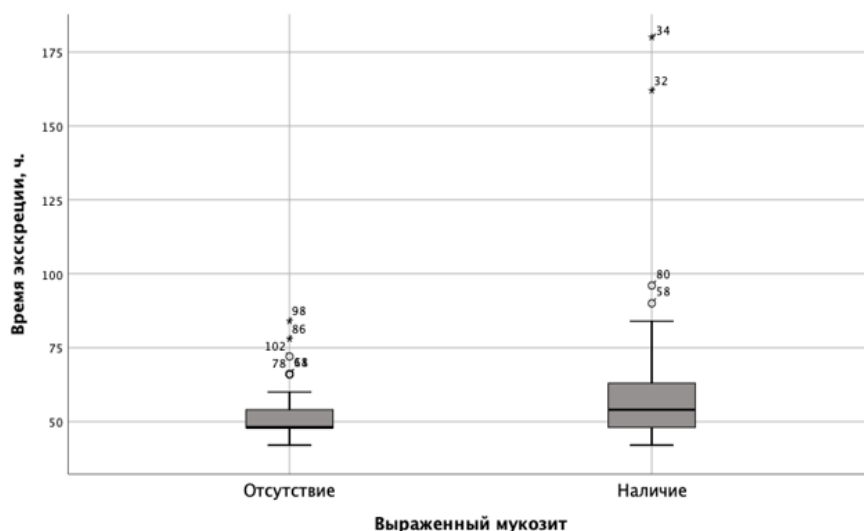
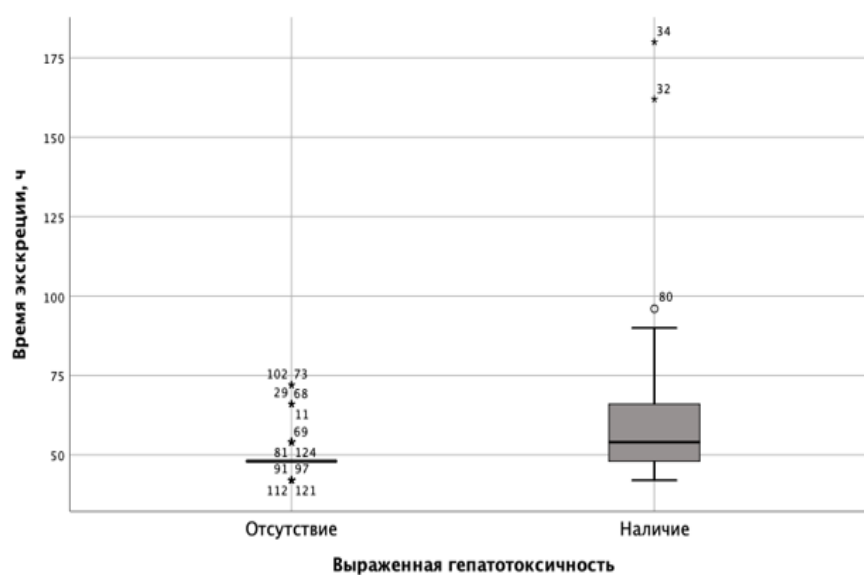


Рисунок 5 - Графическое изображение результатов ассоциативного анализа полиморфных вариантов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с нежелательными лекарственными реакциями

При сравнении времени экскреции МТХ в зависимости от генотипов СС и ТС гена *SLCO1B1* T521C rs4149056 статистически значимых различий получено не было ($p=1$ и $0,304$, соответственно). Однако, доказано, что чем выше время экскреции МТХ у детей с ОЛЛ ($p < 0,001$), тем выше степень выраженности таких токсических НЛР, как орофарингеальный мукозит и гепатотоксичность (Рисунок 6).



А



Б

Рисунок 6 - Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженных орофарингеального мукозита (А) и гепатотоксичности (Б) у детей с ОЛЛ

Нами было разработано четыре актуальные прогностические модели, описывающие взаимосвязь между клиническими и генетическими факторами и исходами терапии ОЛЛ по протоколу ALL IC-BFM 2009 с включением высокодозного МТХ. Наблюдаемая зависимость описывается единым уравнением для всех пяти логистических функций:

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

Различия зависят от переменной z , которая для каждой функции вычислялась по отдельной формуле.

1) Прогностическая модель для определения вероятности развития **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:

$$z = -5,2 - 1,82 * X_{ABCB1C3435Trs1045642_{CC}} - 1,68 * X_{ABCB1rs1128503_{CC}} +$$

$$4,99 * X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 1,46 * X_{ABCB1rs2032582_{GT}} + 4,515 * X_{метотрексат_доза\ 1/м2} + 1,11 * X_{мукозит_выраж} + 0,97 * X_{инф_выраж} + 1,63 * X_{наличие_нейротоксичности} \quad (1)$$

В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в состав модели предикторы составляют 61,4% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. Исходя из значений коэффициентов регрессии и p -value, такие предикторы, как, генотипы GG и GT *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.

2) Прогностическая модель 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: $z = -5,18 - 2,51 \times X_{ABCB1rs1128503_{CC}} + 3,82 \times X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 7,12 \times X_{доза\ метотрексата\ \frac{1}{м2}} + 2,62 \times X_{нейротоксичность} \quad (2)$

В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в состав модели предикторы составляют 74,3% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. 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.

3) Прогностическая модель 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: $z = -4 + 0,79 * X_{ABCB1rs1128503_{TT}} + 1,22 * X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 2,28 * X_{метотрексат_доза\ 1/м2} + 1,25 * X_{наличие_нейротоксичности} + 2,34 * X_{наличие_нефротоксичности}$ (3)

В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в состав модели предикторы составляют 30,7% факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. Исходя из значений коэффициентов регрессии и p-value, метотрексат в дозировке 1000 мг/м² увеличивает вероятность смерти в отдаленном периоде.

4) Прогностическая модель 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: $z = -3,76 + 3,75 * X_{ABCB1rs1128503_{CC}} + 1,29 * X_{ABCB1rs1128503_{CT}} - 2,76 * X_{ABCB1rs2032582_{GG}} + 2,24 * X_{гепатотоксичность} + 1,6 * X_{гематотоксичность} + 1,23 * X_{нейротоксичность} - 1,017 * X_{инф_выраж}$ (4)

В соответствии с коэффициентом детерминации R^2 Найджелкерка, вошедшие в состав модели 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. Все четыре прогностические модели были высоко эффективными (>75%), статистически значимыми (p <0,001) и подтвердились наглядными ROC-кривыми (Рисунок 7), дополнительно проведенного ROC-анализа.

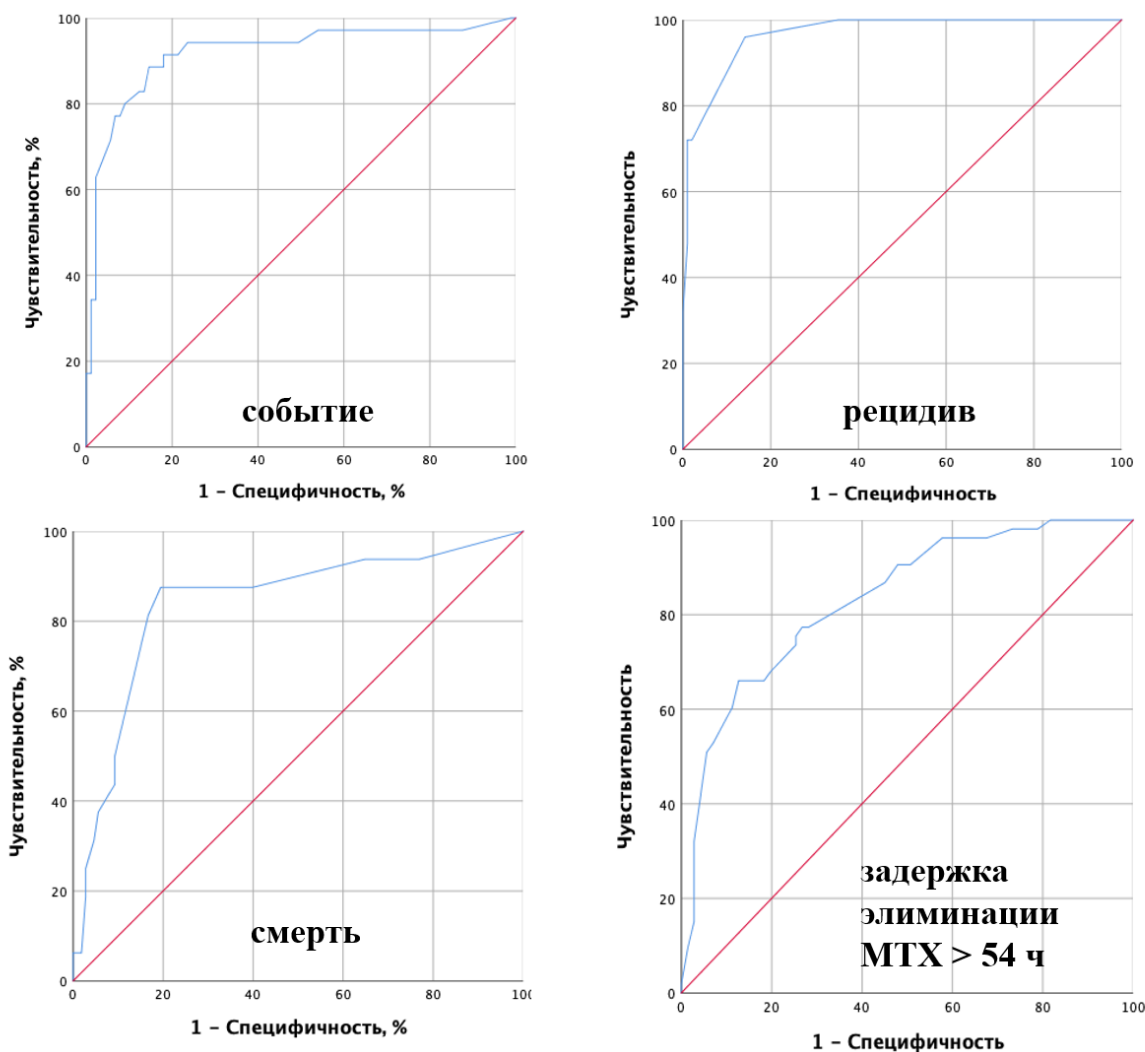


Рисунок 7 - ROC-кривые, характеризующие зависимость прогноза развития исходов терапии от значения логистической функции Р

Таким образом, все представленные факторы, являются доказанными предикторами неблагоприятных исходов терапии метотрексатом детей с ОЛЛ.

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 ТТ и ТС (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.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выявление новых неблагоприятных прогностических факторов развития тяжелых нежелательных реакций и неблагоприятных событий (прогрессирования, рецидива, смерти) требует дальнейшего изучения, необходимого для индивидуализации лечения и снижения побочных эффектов терапии высокодозным метотрексатом. Полученные данные определяют перспективы дальнейшей разработки темы:

- улучшение терапевтических результатов путем выявления новых полиморфных вариантов генов белков-переносчиков лекарственных средств, ассоциированных с предикторами неблагоприятных исходов;

- персонализация лекарственной терапии острого лимфобластного лейкоза, индивидуальное дозирование цитостатиков (с учетом полиморфизмов генов, определяющих метаболизм и клиренс лекарственных средств);

- внесение изменений в клинические протоколы лечения, с учетом анализа фармакогенетических биомаркеров;
- разработка инструментов поддержки принятия клинических решений.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ, ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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. (Журнал ВАК).
2. **Гурьева О. Д.** Взаимосвязь полиморфизмов генов белков-переносчиков *SLCO1B1* и *ABCB1* с клиническими вариантами токсичности метотрексата при терапии острого лимфобластного лейкоза у детей / О. Д. Гурьева, М. И. Савельева, Ж. А. Созаева, Т. Т. Валиев // Российский биотерапевтический журнал. – 2023. – Т. 22. – № 2. – С. 53-59. (Журнал ВАК).
3. Savelyeva, M. I. Pharmacogenetic aspects of efficacy and safety of methotrexate treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia / M. I. Savelyeva, **O. D. Gurieva**, T. T. Valiev, Zh. A. Sozaeva, S. N. Kondratenko, M.V. Ilyin // Drug Metabolism and Personalized Therapy. — 2023. — Vol. 38. — iss:4. - P.349-357.