



Прогностическое влияние клинических и генетических факторов на задержку элиминации метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом

Гурьева О. Д.¹, Савельева М. И.², Валиев Т. Т.^{1,3}, Варфоломеева С. Р.¹, Ильин М. В.²

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Российская Федерация

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Метотрексат (MTX), вводимый в высоких дозах (1000–5000 мг/м²), занимает одно из ведущих мест в современных программах терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей. Благодаря этому препарату, включённому в схемы риск-адаптированной полихимиотерапии, удалось достичь высоких показателей многолетней выживаемости детей с ОЛЛ. Но не менее важной проблемой остаётся токсичность проводимого лечения и прогнозирование его эффективности и безопасности, в связи с чем возрастает роль фармакогенетических исследований в выявлении полиморфизмов в генах-кандидатах, влияющих на фармакокинетику MTX.

Цель исследования. Определить предикторы задержки элиминации метотрексата с использованием фармакогенетических биомаркеров у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Материалы и методы. Проведён проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного (когортного) одноцентрового исследования. В исследование включены 124 ребёнка с диагнозом ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-IC BFM 2009 с включением высокодозного MTX. Для исследования полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* использован метод ПЦР в режиме реального времени. Материал исследования — периферическая кровь. Статистический анализ влияния фармакогенетических биомаркеров на токсичность и эффективность терапии проводился с использованием программы SPSS Statistics 26.0 (США). 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.

Результаты. По результатам проведённого комплексного анализа эффективности и безопасности терапии высокодозным MTX разработана достоверная ($p < 0,001$) прогностическая модель с высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью ($> 70\%$ соответственно), демонстрирующая взаимосвязи клинических и генетических факторов, влияющих на задержку элиминации MTX у детей с ОЛЛ, что подтверждает необходимость внедрения фармакогенетического тестирования в реальную клиническую практику.

Заключение. Определение полиморфизмов генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм цитостатиков необходимо использовать в практической работе онкогематологических клиник для индивидуализации терапии и обеспечения её безопасности.

Ключевые слова: прогнозирование безопасности; полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1*; метотрексат; фармакокинетика; острый лимфобластный лейкоз; дети

Для цитирования:

Гурьева О. Д., Савельева М. И., Валиев Т. Т., Варфоломеева С. Р., Ильин М. В. Прогностическое влияние клинических и генетических факторов на задержку элиминации метотрексата у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):29–38. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-29-38>. EDN: ZALQMG

Поступила: 29.10.2024. В доработанном виде: 29.11.2024. Принята к печати: 07.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

Prognostic impact of clinical and genetic factors on delayed elimination of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia

Oksana D. Gurieva¹, Marina I. Savelyeva², Timur T. Valiev¹, Svetlana R. Varfolomeeva¹, Mikhail V. Ilyin²

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation

² Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract

Background. Methotrexate (MTX) in high doses (1000–5000 mg/m²), occupies one of the leading places in modern programs of therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. Achievement of high long-term survival rates in children with ALL has become possible thanks to this drug. However, no less important problem is the toxicity of the treatment and prediction of its efficacy and safety, in this regard, the role of pharmacogenetic studies in the identification of polymorphisms in candidate genes affecting the pharmacokinetics of MTX is increasing.

Objective. To determine predictors of delayed elimination of methotrexate using pharmacokinetic biomarkers in children with acute lymphoblastic leukemia.

Materials and methods. We prospectively analyzed the database of pediatric patients with ALL within the framework of an observational (cohort) single-center study. The study included 124 children diagnosed with ALL who received therapy according to the ALL-IC BFM 2009 protocol including high-dosed MTX. Real-time PCR method was used to study polymorphisms of *ABCB1* and *SLCO1B1* genes. The study material was peripheral blood. Statistical analysis of

pharmacogenetic biomarkers influence on toxicity and efficacy of therapy was performed using SPSS Statistics 26.0 program (USA). To form mathematical prognostic models, we used the method of logistic function construction using binary logistic regression with step-by-step selection of factors and, if necessary, additional construction of ROC-curves with subsequent ROC-analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$; at $p \geq 0.05$, differences were considered unlikely and statistically insignificant.

Results. Based on the results of the conducted complex analysis of efficacy and safety of high-dosed MTX therapy, a reliable ($p < 0.001$) prognostic model with high sensitivity, specificity and efficacy ($>70\%$, respectively) was developed, demonstrating the interrelationships of clinical and genetic factors influencing the delay of MTX elimination in children with ALL, which confirms the necessity of implementing pharmacogenetic testing in real clinical practice.

Conclusion. Determination of polymorphisms of genes providing transport and metabolism of cytostatics should be used in practical work of oncohematological clinics for individualization of therapy and ensuring its safety.

Keywords: safety prediction; polymorphisms of *ABCB1* and *SLCO1B1* genes; methotrexate; pharmacokinetics; acute lymphoblastic leukemia; children

For citations:

Gurieva OD, Savelyeva MI, Valiev TT, Varfolomeeva SR, Ilyin MV. Prognostic impact of clinical and genetic factors on delayed elimination of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):29–38. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-29-38>. EDN: ZALQMG

Received: 29.10.2024. Revision received: 29.11.2024. Accepted: 07.12.2024. Published: 30.12.2024.

Введение / Introduction

Высокие показатели выживаемости больных впервые диагностированным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и неходжкинскими лимфомами удалось достичь благодаря разработке риск-адаптированных программ, включающих прогностические факторы, определяющие эффективность терапии и риск развития рецидива. Подобный подход позволяет проводить оптимальное по интенсивности лечение, при котором 10-летняя общая выживаемость составляет $90,7\%$ [1, 2]. Тем не менее, пациенты по-прежнему страдают от токсических эффектов, вызванных лекарственными средствами, что в ряде случаев требует редукции дозы или прекращения введения цитотоксических препаратов, что способствует снижению общей эффективности терапии [3, 4].

Исследователи Evans WE, Crews KR (2004 и 2020 гг.) 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].

Одним из препаратов с известным и прогнозируемым профилем токсичности при лечении ОЛЛ является метотрексат (MTX) — ингибитор фолиевой кислоты, введённый в клиническую практику в 1950-х годах. Множество транспортёров и ферментов участвуют в метаболизме фолиевой кислоты, некоторые обеспечивают всасывание и транспорт MTX, что определяет его фармакокинетику. Активность белков-транспортёров оказывает влияние на концентрацию препарата в плазме крови и тканях, тем самым определяя лекарственную токсичность [7, 8].

Выявление полиморфизмов генов, кодирующих белки-переносчики MTX и ферменты его биотрансформации, позволяет прогнозировать риск MTX-индуцированной токсичности со стороны кожи и слизистых, печени, почек, нервной системы [9].

Переносчик органических анионов растворённого вещества 1B1 (SLCO1B1) — транспортёр MTX — расположен в основном на гепатоцитах человека. Два однонуклеотидных полиморфизма (SNP, single nucleotide polymorphism) *SLCO1B1*, rs11045879 и rs4149081 были связаны с клиренсом MTX и с тяжёлой гастроинтестинальной токсичностью во время проведения фазы консолидации при лечении ОЛЛ [10, 11]. Исследования других научных групп (Schulte RR, 2021; Lopez-Lopez E, 2013; Treviño LR, 2009) также подтвердили, что SNP коррелируют с результатами терапии [8, 12, 13]. Radtke S с соавт. показали, что вариант *SLCO1B1* rs4149056 в значительной степени связан с фармакокинетикой (ФК) MTX [10]. По результатам высокопроизводительного секвенирования экзонов *SLCO1B1* у детей с ОЛЛ, четыре общих гаплотипа *SLCO1B1* были связаны с самым низким клиренсом MTX [10]. Различные полиморфизмы в этом гене могут объяснить изменения клиренса высокодозного MTX у $10,7\%$ больных [8]. Следовательно, SNP в гене *SLCO1B1* являются важными детерминантами токсичности MTX, в особенности стоматита и мукозита [6]. Биодоступность MTX также зависит от генетических полиморфизмов переносчиков семейства ABC, которые транспортируют молекулы MTX из энтероцитов в просвет желудочно-кишечного тракта (кодируются генами *ABCC2*, *ABCB1*, *ABCG2*) и в кровь (кодируются генами *ABCC1* и *ABCC3*). Системное выведение MTX обеспечивается за счёт клубочковой фильтрации и активной секреции из клеток почечных канальцев [14, 15].

Все существующие протоколы терапии ОЛЛ предполагают расчёт дозы MTX, исходя из площади поверхности тела без учёта влияния генетических факторов. Поскольку клиренс препарата имеет большое значение для токсичности и исходов терапии, точное дозирование высокодозного ($1000–5000\text{ мг/м}^2$) MTX (HD-MTX) 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-MTX [16].

Таким образом, 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 MTX с его фармакогенетическими особенностями и выявить факторы риска, позволяющие прогнозировать ответ на терапию и тяжесть токсических явлений за счёт оценки влияния на фармакокинетику MTX при лечении ОЛЛ.

Цель исследования / Objective

Определить предикторы задержки элиминации метотрексата более 54 часов с использованием фармакогенетических биомаркеров у детей с острым лимфобластным лейкозом.

Гипотеза / Hypothesis

Выраженность токсических нежелательных лекарственных реакций (НЛР) на метотрексат у детей с ОЛЛ зависит от фармакокинетики препарата.

Материалы и методы / Materials and methods

Проведён проспективный анализ базы данных пациентов детского возраста с ОЛЛ в рамках наблюдательного (когортного) одноцентрового исследования. В исследование включены 124 ребёнка с диагнозом ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-IC BFM 2009 с использованием HD-MTX. Для исследования полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* использован метод ПЦР в режиме реального времени. Материал исследования — периферическая кровь. Забор материала производился однократно независимо от сроков терапии метотрексатом. Критерии отбора SNPs: частота минорных аллелей >5 %, гены, соответствовавшие равновесию Харди—Вайнберга (HWE), и, наконец, уровень доказательности ранее опубликованных исследований.

В соответствии с протоколами терапии ОЛЛ, оптимальным временем экскреции MTX считается период до 54 ч от момента введения MTX, а безопасным уровнем — концентрация MTX в сыворотке крови менее 0,25 мкмоль/л. При достижении безопасного уровня в течение более продолжительного периода времени, элиминацию MTX следует считать замедленной.

Для статистической обработки результатов использовалась программа SPSS Statistics 26.0 (США). Расчёт объёма выборки производился по методу К.А. Отдельновой (исследование средней точности

при статистической мощности 80 %). Проверка нормальности распределения проводилась методом Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При нормальном распределении данных количественный показатель представлялся в виде средней арифметической (M), со стандартным отклонением ($\pm SD$) и 95 % доверительным интервалом (ДИ), а при ненормальном распределении — в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (25–75 % Q). Межгрупповые различия оценивались при нормальном распределении при помощи t -критерия Стьюдента, а при ненормальном распределении — с помощью U -критерия Манна—Уитни. Сравнительный анализ независимых категориальных переменных использовался с применением χ^2 Пирсона либо точного теста Фишера. При парных сравнениях трёх и более групп между собой применялась поправка на множественность сравнений Бонферрони. Номинальный показатель представлялся абсолютным числом наблюдений, приведена процентная доля признака в подгруппах.

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.

Результаты исследования / Results of the study

Проведена оценка историй болезни и исследованы образцы периферической крови 124 пациентов: соотношение пациентов мужского ($n = 70$) и женского ($n = 54$) пола составило 1,2/1,0, медиана возраста — 7 лет. Среди возрастных групп преобладали дети в возрасте 6–12 лет (33,9 %), затем в порядке убывания шли следующие возрастные группы: 4–5 лет (27,4 %), 13–18 лет (21,8 %), 1–3 года (13 %) и менее года (4 %). Превалировал В-линейный иммуноподвариант ОЛЛ — 67,7 %, по сравнению с Т-линейным (32,3 %). Группы риска в соответствии с протоколом ALL-IC BFM 2009 распределялись следующим образом: отмечалось незначительное преобладание пациентов группы среднего риска (48,4 %) над группой высокого риска (44,4 %), тогда как наименьшее число больных были стратифицированы в группу стандартного риска (7,2 %). 106 пациентов с впервые установленным диагнозом ОЛЛ проходили лечение по программе ALL-IC BFM 2009, 18 больных с рецидивом ОЛЛ — по программе ALL REZ BFM 2002. Исходы терапии представлены на рис. 1.

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 рис. 2.

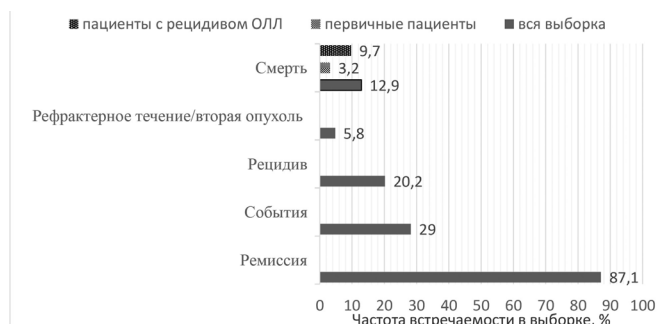


Рис. 1. Распределение исходов лечения детей с ОЛЛ в исследуемой группе ($n = 124$).

Fig. 1. Distribution of treatment outcomes for children with ALL in the study group ($n = 124$)

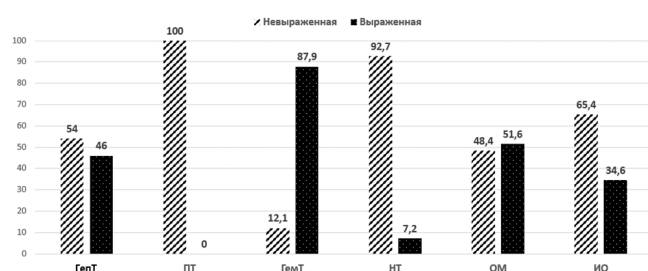


Рис. 2. Сравнение невыраженных и выраженных степеней тяжести НЛР метотрексата у детей с ОЛЛ

Fig. 2. Comparison of unexpressed and expressed degrees of severity of methotrexate ADR in children with ALL.

Примечания: HepT — гепатотоксичность; PT — почечная токсичность; GemT — гематологическая токсичность; NT — нейротоксичность; OM — орофарингеальный мукозит; IO — инфекционные осложнения.

Notes: HepT — hepatotoxicity; RT — renal toxicity; GemT — hematological toxicity; NT — neurotoxicity; OM — oropharyngeal mucositis; IC — infectious complications.

По результатам частотного анализа выявлены достоверные преобладания выраженных форм таких НЛР, как гематологическая ($p = 0,002$), гепатологическая ($p < 0,001$) токсичность, а также орофарингеальный мукозит ($p = 0,003$), при этом тяжёлые формы гематологической токсичности и орофарингеального мукозита оказались достоверно связаны с задержкой элиминации MTX ($p < 0,001$). Кроме того, обнаружено, что чем выше частота встречаемости гематологической и гепатотоксичности, а также орофарингеального мукозита (≥ 3 ст.), тем выше частота встречаемости инфекционных осложнений у детей с ОЛЛ, получающих терапию метотрексатом.

По результатам фармакогенетического тестирования обнаружено, что при выявлении генотипа CC 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 TT *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженной инфекции ($p = 0,046$, ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1)), а у пациентов с генотипом TT *ABCB1* C3435T rs1045642 — 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)).

Результаты проведённого ассоциативного анализа по оценке эффективности терапии MTX у детей с ОЛЛ в зависимости от носительства полиморфизмов гена *ABCB1* свидетельствуют о необходимости проведения фармакогенетического тестирования с целью выявления носителей «дикого» генотипа GG гена *ABCB1* rs2032582 и аллеля TT гена *ABCB1* rs4148738 для определения группы пациентов с повышенным риском развития событий в отсроченном периоде. Показатели бессобытийной выживаемости (БСВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) достоверно выше были в группе носителей TT, TC, чем в группе носителей аллеля CC «дикий тип» гена *ABCB1* C3435T rs1045642 ($p = 0,018$ и $p = 0,026$, соответственно). Все три вида оценённой выживаемости (БСВ, БРВ, ОВ) оказались выше в группе пациентов, получавших метотрексат в дозе более 1000 мг/м² ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,047$, соответственно), демонстрируя зависимость — чем выше доза метотрексата, тем выше общая выживаемость у детей с ОЛЛ. При этом группа пациентов ($n = 18$), получавшая впервые HD-MTX в дозировке 1000 мг/м², с подтверждённым диагнозом рецидива ОЛЛ при первичном лечении не имевшая в составе полихимиотерапии высокодозного MTX, продемонстрировала худшие показатели выживаемости.

Остальные же изучаемые нами полиморфизмы не показали значимого влияния на результаты терапии MTX в связи с возможно недостаточной мощностью исследования и не полным соответствием равновесию Харди–Вайнберга, т. е. неравномерным распределением генотипов в выборке.

При сравнении времени экскреции MTX в зависимости от генотипов CC и TC *SLCO1B1* T521C rs4149056 статистически значимых различий получено не было ($p = 1$ и $p = 0,304$, соответственно). Время экскреции MTX у пациентов с генотипами CC и TC *SLCO1B1* T521C rs4149056 отличалось незначимо (медианы составляли 48 ч). При сравнении времени экскреции в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия генотипа TT rs4149056 статистически значимых различий получено не было ($p = 0,267$). Время экскреции у группы пациентов с генотипом TT rs4149056 не отличалось от пациентов с другими генотипами (медианы составляли 48 и 48 ч, соответственно) (рис. 3).

Для проверки гипотезы о том, что выраженность токсических реакций на MTX у детей с ОЛЛ зависит от фармакокинетики препарата был осуществлён поиск взаимосвязей между выраженными НЛР и временем экскреции MTX, отражающим фармакокинетику препарата. Проведено сравнение медианы времени экскреции MTX при проявлении выраженной токсичности того или иного вида с медианой времени экскреции препарата при отсутствии тяжёлых НЛР. Результаты сравнительного анализа представлены в виде таблиц (табл. 1, 2) и графиков (рис. 4, 5).

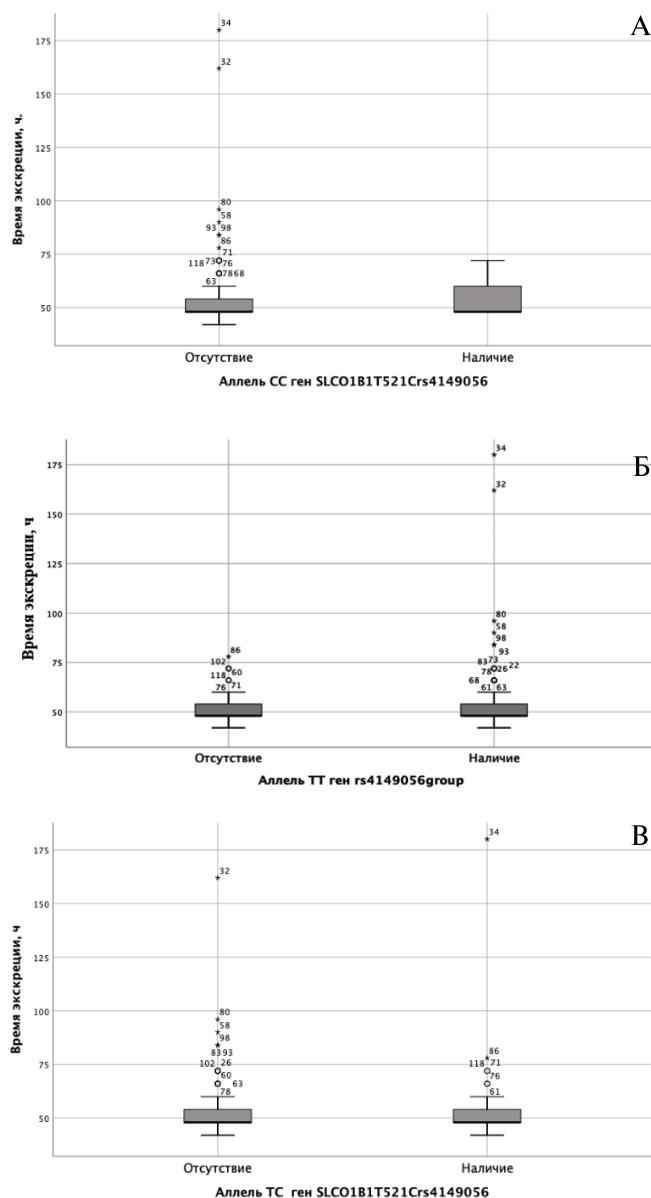


Рис. 3. Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции МТХ от генотипов *SLC01B1*: CC (А), ТТ «дикий тип» (Б) и TC (В)

Fig. 3. Graphical representation of comparative data on median time of MTX excretion from the *SLC01B1* genotypes: CC (A), TT "wild type" (B) and TC (C)

Таблица 1

Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от проявлений выраженного орофарингеального мукозита

Table 1

Comparison of median time of methotrexate excretion depending on the manifestations of severe oropharyngeal mucositis

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

Таблица 2

Сравнение медиан времени экскреции метотрексата в зависимости от проявлений выраженной гепатотоксичности

Table 2

Comparison of median time of methotrexate excretion depending on the manifestations of expressed hepatotoxicity

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

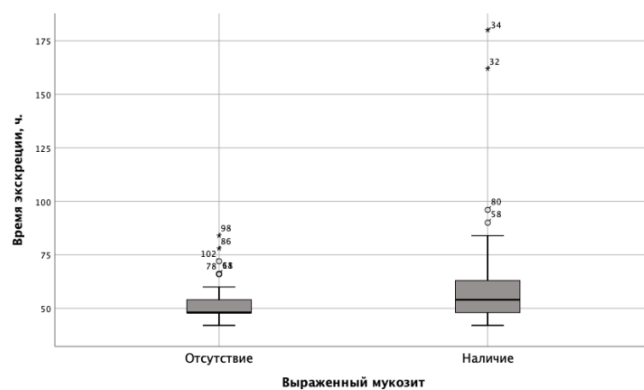


Рис. 4. Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженного орофарингеального мукозита у детей с ОЛЛ

Fig. 4. Graphical representation of comparative data on median time of methotrexate excretion in the presence or absence of manifestations of severe oropharyngeal mucositis in children with ALL

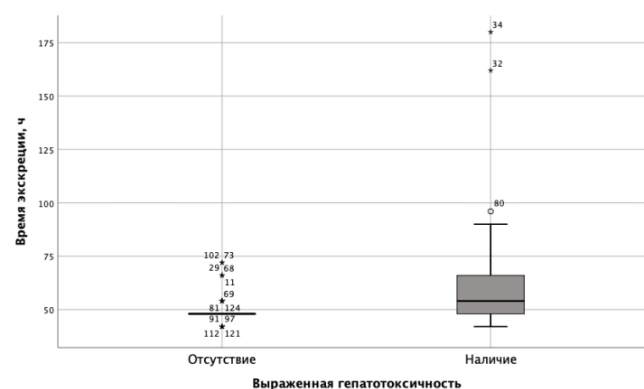


Рис. 5. Графическое изображение сравнительных данных медиан времени экскреции метотрексата при наличии или отсутствии проявлений выраженной гепатотоксичности у детей с ОЛЛ

Fig. 5. Graphical representation of comparative data on the median time of methotrexate excretion in the presence or absence of manifestations of expressed hepatotoxicity in children with ALL

При сравнении тяжести орофарингеального мукозита в зависимости от времени экскреции метотрексата (табл. 1, рис. 4) были получены статистически значимые различия ($p < 0,001$). 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).

При сравнении степени выраженности гепатотоксичности в зависимости от времени экскреции МТХ были получены статистически значимые различия ($p < 0,001$), (табл. 2, рис. 5). Время экскреции у пациентов с выраженной гепатотоксичностью было существенно выше, чем среди пациентов без выраженной гепатотоксичности (медианы составляли 48 и 54 ч, соответственно).

Доказано, чем выше время экскреции МТХ у детей с ОЛЛ, как показателя, отражающего фармакокинетику препарата, тем выше степень выраженности таких токсических НЛР, как орофарингеальный мукозит и гепатотоксичность ($p < 0,001$). Пациенты с генотипом ТТ *ABCB1* C3435T rs1045642 имеют повышенный риск развития нефро- и нейротоксичности ($p = 0,041$, ОШ: 2,3 (95 % ДИ: 1,02–5,12)). Пациенты с генотипом СС *ABCB1* rs1128503 имеют повышенный риск развития выраженного орофарингеального мукозита ($p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95 % ДИ: 1,01–4,55)), а с генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ($p = 0,046$, ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1,01–7,1)). Другие виды токсических НЛР на МТХ во взаимосвязи с носительством полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* не показали достоверных различий.

На основании всех полученных данных частотного и ассоциативного анализов эффективности и безопасности терапии высокодозным МТХ нами была разработана актуальная прогностическая модель риска задержки элиминации МТХ более 54 часов при ОЛЛ у детей в зависимости от различных генетических и клинических данных.

Прогностическая модель для определения вероятности задержки элиминации МТХ более 54 часов включала 7 предикторов, которые составляют 42 % факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную. Данная прогностическая модель оказалась статистически значимой ($p < 0,001$) и описывались уравнением:

$$P = \frac{1}{(1 + e^{-z})} \times 100 \%, \\ z = -3,76 + 3,75 \times X_{ABCB1rs1128503CC} + 1,29 \times \\ \times X_{ABCB1rs1128503CT} - 2,76 \times X_{ABCB1rs2032582GG} + 2,24 \times \\ \times X_{\text{гепатотоксичность}} + 1,6 \times X_{\text{гематотоксичность}} + 1,23 \times \\ \times X_{\text{нейротоксичность}} - 1,017 \times X_{\text{инф_выраж}},$$

где P — вероятность неблагоприятного исхода (событие, рецидив, смерть) или задержки элиминации МТХ более 54 часов (в долях единицы); $X_{ABCB1rs1128503_CC}$ — генотип СС *ABCB1* rs1128503 (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{ABCB1rs1128503_CT}$ — генотип СТ *ABCB1* rs1128503 (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{ABCB1rs2032582_GG}$ — GG генотип *ABCB1* rs2032582 (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{\text{гепатотокс_выраж}}$ — наличие выраженной гепатотоксичности (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{\text{гематотокс_выраж}}$ — наличие выраженной гематологической токсичности (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{\text{наличие_нейротоксичности}}$ — наличие нейротоксичности (0 — отсутствие, 1 — наличие); $X_{\text{инф_выраж}}$ — наличие выраженных инфекционных осложнений (0 — отсутствие, 1 — наличие).

Исходя из значений коэффициентов регрессии, наличие генотипа GG *ABCB1* rs2032582 и выраженных инфекционных осложнений уменьшают вероятность экскреции МТХ более 54 часов. В свою очередь, другие факторы (генотипы СС *ABCB1* rs1128503 и СТ *ABCB1* rs1128503; наличие выраженных гепатотоксичности, гематологической и нейротоксичности) увеличивают вероятность задержки элиминации МТХ более 54 часов в отдалённом периоде (рис. 6).



Рис. 6. Схематическое изображение прогностической модели развития задержки элиминации МТХ более 54 часов в зависимости от клинических и генетических факторов у детей с ОЛЛ, получавших терапию HD-MTX
Fig. 6. Schematic representation of the prognostic model of the development of delayed elimination of MTX for more than 54 hours, depending on clinical and genetic factors in children with ALL who received HD-MTX therapy

В табл. 3 определены параметры связи каждого из предикторов модели с шансами вероятности экскреции МТХ > 54 ч. В соответствии с коэффициентом детерминации R_2 Найджелкерка, вошедшие в её состав предикторы составляют 42 % факторов, оказывающих влияние на зависимую переменную.

С помощью ROC-анализа было определено оптимальное значение прогностической функции P . Полученная кривая представлена на рис. 7.

Таблица 3

Оценка связи предикторов модели с шансами вероятности экскреции MTX >54 часов

Table 3

Evaluation of the relationship of the predictors of the model with the chances of the probability of excretion of MTX >54 hours

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*
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

Примечание: * — связь с предиктором статистически значима.
Note: * — the association with the predictor is statistically significant.

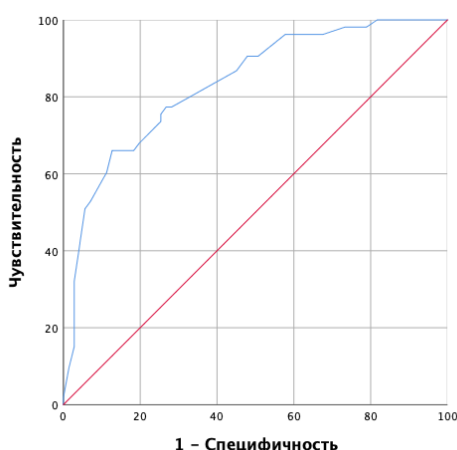


Рис. 7. ROC-кривая, характеризующая зависимость прогноза падения вероятности задержки элиминации MTX (более 54 часов) от значения логистической функции p . Площадь под ROC-кривой составила $0,833 \pm 0,036$ (95 % ДИ: 0,762–0,905). Значение логистической функции p в точке cut-point составило 0,35.

Fig. 7. ROC-curve characterizing the dependence of the forecast of the decrease in the probability of delayed elimination of MTX (more than 54 hours) from the value of the logistic function p . The area under the ROC-curve was 0.833 ± 0.036 (95 % CI: 0.762–0.905). The value of the logistic function p at the cut-point was 0.35.

Чувствительность разработанной модели составила 77,4 % (41 верных прогнозов из 53 случаев экскреции более 54 ч), специфичность составила 73,2 % (52 верных прогнозов из 71 случая экскреции MTX до 54 ч). Общая диагностическая эффективность 75 %.

Обсуждение / Discussion

Исследования токсичности HD-MTX с точки зрения полиморфизмов генов белков-переносчиков появились сравнительно недавно. В данной работе мы

оценили ассоциации полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с токсичностью HD-MTX и прогнозом задержки элиминации MTX более 54 часов, как показателя, отражающего фармакокинетику препарата.

Анализ результатов настоящего исследования подтверждает важность стратификации больных на группы риска с учётом инициальных клинико-лабораторных параметров и выявления ряда полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* с большей степенью представленности ассоциаций с полиморфизмом гена *ABCB1*, чем гена *SLCO1B1*. Следует отметить, что только у пациентов с генотипом TT *SLCO1B1* T521C rs4149056 был повышен риск развития выраженных инфекционных осложнений ($p = 0,046$, ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1), что из-за широкого доверительного интервала и низкой частоты встречаемости в популяции (менее 5 %) требует дальнейших исследований на более обширном материале для подтверждения или опровержения полученного результата, и кроме того, ни один из полиморфизмов данного гена не попал в логистические функции прогностических моделей исходов ОЛЛ у детей и задержки элиминации MTX более 54 часов.

В систематическом обзоре и метаанализе, представленном коллективом авторов под руководством Song Z, рассмотрены и исследованы генетические полиморфизмы всего пути метаболизма лекарственных средств [17]. Оказалось, что ген *ABCB1* 3435C>T rs1045642 оказывает значимое влияние на повышение риска гепатотоксичности, что соответствует результатам предыдущих исследований [18, 19]. Однако в нашей работе пациенты с генотипом TT *ABCB1* 3435C>T rs1045642 имели 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)), связи полиморфизмов с ГепТ 3–4 ст. не обнаружено.

В нашем исследовании в группе пациентов с аллелем «дикого типа» CC rs1128503 в 2,1 раз повышен риск развития орофарингеального мукозита 3–4 степени

относительно пациентов с мутантными аллелями этого SNP ($p = 0,047$, ОШ: 2,1 (95 % ДИ: 1,01–4,55)). По сообщению группы авторов под руководством *Liu SG*, 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, $p = 0,054$) [20]. По нашему мнению, получение противоречивых результатов только подтверждает необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

У пациентов с мутантным генотипом ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 риск развития тяжёлых инфекционных осложнений повышен в 2,7 раз ($p = 0,046$, ОШ: 2,7 (95 % ДИ: 1–7,1)). Полиморфизмы гена *SLCO1B1* влияют на клиренс и токсичность МТХ, что может быть обусловлено опосредованной эндогенными метаболитами дистанционной связью между белками-транспортёрами в печени и почках [20]. В исследовании *Yang's FF et al.* генотип rs11045879 был связан с анальным мукозитом, а локус rs4149056 — с тромбоцитопенией, почечной токсичностью и анальным мукозитом [21].

В исследовании *Hao 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. Концентрация МТХ в сыворотке крови пациентов с генотипом ТТ *SLCO1B1* rs4149056 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) [22], а в нашем исследовании у пациентов с генотипом ТТ *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, проведённом *Treviño LR et al.* в рамках геномного анализа два варианта *SLCO1B1*, rs4149081 и rs11045879, были идентифицированы как ассоциированные с токсичностью, связанной с МТХ и его клиренсом [13]. *Ramsey LB et al.* подтвердили, что варианты *SLCO1B1*, rs4149056 и rs2306283 являются предикторами замедлённого клиренса МТХ у пациентов с ОЛЛ [23]. В их исследовании были установлены ассоциации между *SLCO1B1* rs4149056 и сывороточным уровнем МТХ и задержкой его элиминации, что аналогично результатам *den Hoed MA et al.* [24]. Вариант *SLCO1B1* rs4149056 был достоверно связан с кинетикой 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 яв-

лялась значимым предиктором общих токсических нежелательных явлений во время курсов терапии МТХ ($R(2) = 0,043$; $p < 0,001$) [10].

Полученные в нашем исследовании данные подтверждают наличие ассоциаций между генами *SLCO1B1* и *ABCB1* и повышенным риском токсичности HD-МТХ. А разработанная нами прогностическая модель риска задержки элиминации МТХ более 54 часов в отдалённом периоде подтверждает вклад таких факторов, как наличие выраженных гепато-, гемато- и нейротоксичности, а также носительство генотипов СС *ABCB1* rs1128503 и СТ *ABCB1* rs1128503, которые необходимо рассматривать в качестве предикторов нарушений фармакокинетики МТХ.

Результаты проведённого ассоциативного анализа по оценке безопасности 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 «дикого» генотипа СС гена *ABCB1* rs1128503 для прогнозирования развития выраженного орофарингеального мукозита, а также генотипа ТТ *SLCO1B1* T521C rs4149056 для прогнозирования развития выраженных инфекционных осложнений.

Заключение / Conclusion

Между полиморфизмами генов *SLCO1B1* и *ABCB1* и повышенным риском токсичности HD-МТХ существует значимая взаимосвязь. Мы пришли к выводу, что генотипирование полиморфизмов генов *ABCB1* и *SLCO1B1* до начала лечения может быть потенциально полезным с целью возможной индивидуальной адаптации терапии HD-МТХ и снижения токсичности у пациентов с ОЛЛ, несмотря на то что многие современные исследования часто не обладают достаточной мощностью. В дальнейшем необходимо проведение более крупных валидизированных исследований генетических ассоциаций с терапией высокодозным метотрексатом.

Таким образом, по результатам проведённого комплексного анализа безопасности терапии высокодозным МТХ нами разработана достоверная ($p < 0,001$) прогностическая модель с высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью (>70 % соответственно), демонстрирующая взаимосвязь клинических и генетических факторов, влияющих на фармакокинетику МТХ у детей с ОЛЛ, что подтверждает необходимость внедрения фармакогенетического тестирования в реальную клиническую практику. Разработанный алгоритм прогнозирования безопасности применения МТХ у детей с ОЛЛ с учётом таких фармакогенетических биомаркеров, как полиморфизмы генов *ABCB1* и *SLCO1B1*, может быть использован в работе стационарных отделений лечебных учреждений гематологического профиля с целью усовершенствования и оптимизации терапии детей с ОЛЛ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Гурьева О. Д., Савельева М. И., Валиев Т. Т., Варфоломеева С. Р., Ильин М. В.: разработка концепции и дизайна статьи, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, сбор и анализ данных, научное редактирование статьи, окончательное одобрение рукописи.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России. Тематика государственного задания «Новые фармакогенетические маркеры безопасности фармакотерапии некоторых социально значимых заболеваний» (ЕГИСУ НИОКТР № 1022050400012-9).

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

Gurieva OD, Savelyeva MI, Valiev TT, Varfolomeeva SR, Ilyin MV: concept and design development, article writing, review of publications on the article topic, data collection and analysis, scientific article editing, final approval of the article.

Funding

The work was financially supported by the Ministry of Health of Russia. The subject of the state assignment "New pharmacogenetic markers of safety of pharmacotherapy of some socially significant diseases" (EGISU NIOCTR No. 1022050400012-9).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Гурьева Оксана Дмитриевна — врач-детский онколог отделения детской онкологии и гематологии (химиотерапия гемобластозов) № 1 НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Минздрава России, Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0050-0721>

Савельева Марина Ивановна — д. м. н., профессор кафедры терапии имени профессора Е.Н. Дормидонтова ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация
Автор, ответственный за переписку
e-mail: marinasavelyeva@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2373-2250>

Валиев Тимур Теймуразович — д. м. н., заведующий отделением детской онкологии и гематологии (химиотерапия гемобластозов) № 1 НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Российская Федерация; профессор кафедры детской онкологии имени академика Л.А. Дурнова ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

Oksana D. Gurieva — Pediatric Oncologist of the Department of Pediatric Oncology and Hematology (Hemoblastosis Chemotherapy) No. 1 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0050-0721>

Marina I. Savelyeva — Dr. Sci (Med.), Professor, Department of Therapy, Prof. E.N. Dormidontov Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation
Corresponding autor
e-mail: marinasavelyeva@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2373-2250>

Timur T. Valiev — Dr. Sci (Med.), Head of the Department of Pediatric Oncology and Hematology (Hemoblastosis Chemotherapy) No. 1 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Pediatric Oncology named academician L.A. Durnov FSBEI FPE RMACPE MOH Russia, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1469-2365>

Варфоломеева Светлана Рафаэлевна — д. м. н., профессор, директор НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

Svetlana R. Varfolomeeva — Dr. Sci (Med.), Professor, Director of the Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, MOH Russia, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6131-1783>

Ильин Михаил Витальевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой терапии имени профессора Е.Н. Дормидонтова ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6278-374X>

Mikhail V. Ilyin — Dr. Sci (Med.), Professor, Head of the Department of Therapy Prof. E.N. Dormidontov Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6278-374X>

Список литературы / References

1. Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т., Тупицын Н.Н. Перспективы оценки минимальной остаточной болезни в постиндукционном периоде при В-линейном остром лимфобластном лейкозе у детей. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2020;7(2):15-22. [Shervashidze MA, Valiev TT, Tupitsyn NN. Prospects for evaluation of the minimal residual disease in the post-induction period in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2020;7(2):15-22. (In Russ.)]. doi: 10.21682/2311-1267-2020-7-2-15-22.
2. Барях Е.А., Валиев Т.Т., Яцков К.В., и соавт. Интенсивная терапия лимфомы Беркитта: описание двух клинических случаев. *Гематология и трансфузиология*. 2007;52(1):41-43. [Baryakh EA, Yatskov KV, Valiev TT, et al. Intensive care for Burkitts lymphoma: two case reports. *Hematology and transfusiology*. 2007;52(1):41-43. (In Russ.)].
3. Валиев Т.Т., Шервашидзе М.А., Бельшева Т.С. Оценка токсичности терапии острого лимфобластного лейкоза по протоколу ALL IC-bfM 2002. *Онкогематология* 2022;17(3):137-59. [Valiev TT, Shervashidze MA, Belysheva TS. Toxicity assessment of acute lymphoblastic leukemia treatment protocol ALL IC-bfM 2002. *Onkogematologiya = Oncohematology*. 2022;17(3):137-59. (In Russ.)]. doi: 10.17650/1818-8346-2022-17-3-137-159.
4. Коркина Ю.С. Оценка эффективности и токсичности терапии острого лимфобластного лейкоза у детей по протоколу ALL IC-BFM 2009: Дис. ... канд. мед. наук. — Москва; 2023. [Korkina YuS. Evaluation of the effectiveness and toxicity of therapy for acute lymphoblastic leukemia in children according to the ALL IC-BFM 2009 protocol. [dissertation] Moscow; 2023. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/otsenka-effektivnosti-i-toksichnosti-terapii-ostrogo-limfoblastnogo-leukoza-u-detей-po-proto?ysclid=m3m6gcbnxi143584346>. Ссылка активна на 25.10.2024.
5. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2690-6. doi: 10.1182/blood-2004-04-1616.
6. Lopez-Lopez E, Autry RJ, Smith C, et al. Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells *in vivo*. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6600-6615. doi: 10.1172/JCI140797.
7. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, et al. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev*. 2015 Jul;29(4):243-9. doi: 10.1016/j.blre.2015.01.001.
8. Schulte RR, Choi L, Utreja N, et al. Effect of SLCO1B1 Polymorphisms on High-Dose Methotrexate Clearance in Children and Young Adults With Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Clin Transl Sci*. 2021 Jan;14(1):343-353. doi: 10.1111/cts.12879.
9. Maamari D, El-Khoury H, Saifi O, et al. Implementation of Pharmacogenetics to Individualize Treatment Regimens for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2020 Aug 12;13:295-317. doi: 10.2147/PGPM.S239602.
10. Radtke S, Zolk O, Renner B, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013 Jun 27;121(26):5145-53. doi: 10.1182/blood-2013-01-480335.
11. Zgheib NK, Akra-Ismael M, Aridi C, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in

- Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Aug;24(8):387-96. doi: 10.1097/FPC.0000000000000069.
12. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec;13(6):498-506. doi: 10.1038/tj.2012.44.
13. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5972-8. doi: 10.1200/JCO.2008.20.4156.
14. Razali RH, Noorizhab MNF, Jamari H, et al. Association of ABCG2 with levels and toxicity of methotrexate in Malaysian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Pediatr Hematol Oncol*. 2020 Apr;37(3):185-197. doi: 10.1080/08880018.2019.1705949.
15. Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015 Aug;15(4):372-9. doi: 10.1038/tj.2014.81.
16. Cheng Y, Chen MH, Zhuang Q, et al. Genetic factors involved in delayed methotrexate elimination in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 May;68(5):e28858. doi: 10.1002/pbc.28858.
17. Song Z, Hu Y, Liu S, et al. The Role of Genetic Polymorphisms in High-Dose Methotrexate Toxicity and Response in Hematological Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2021 Oct 21;12:757464. doi: 10.3389/fphar.2021.757464.
18. Maagdenberg H, Oosterom N, Zanen J, et al. Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 May;161:103312. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103312.
19. Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1445-54. doi: 10.1007/s13277-012-0395-2.
20. Liu SG, Gao C, Zhang RD, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):37761-37772. doi: 10.18632/oncotarget.17781.
21. Yang FF, Xue TL, Gao C, et al. Effects of SLCO1B1 on elimination and toxicities of high-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2022 Oct;23(15):821-834. doi: 10.2217/pgs-2022-0098.
22. Hao Q, Song Y, Fang Q, et al. Effects of genetic polymorphisms on methotrexate levels and toxicity in Chinese patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Sci*. 2022 Nov 11;5(1):32-38. doi: 10.1097/BS9.0000000000000142.
23. Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, et al. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):898-904. doi: 10.1182/blood-2012-08-452839.
24. den Hoed MA, Lopez-Lopez E, te Winkel ML, et al. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun;15(3):248-54. doi: 10.1038/tj.2014.63.