



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“

Медицински факултет-Скопје

**ВЛИЈАНИЕТО НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО
ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ ВРЗ ПОЈАВАТА НА ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ОД
ВИСОКИ ДОЗИ НА МЕТОТРЕКСАТ КАЈ ДЕЦА СО АКУТНА
ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕУКЕМИЈА**

Докторска дисертација

асс. д-р Билјана Чонеска Јованова

Ментор

проф. д-р Соња Алабаковска

Скопје, 2016

КОРИСТЕНИ КРАТЕНКИ

АЛЛ – акутна лимфобластна леукемија

AMOVA – анализа на молекуларна варијанса (англ. Analysis of molecular variance)

ARMS – (англ. Amplification Resistant Mutational System)

ABL – (англ. Abelson –oncogene)

BCR – (англ. break point cluster region)

БФМ – Берлин-Франкфурт- Минстер студиска група

ДНА – дезоксирибонуклеинска киселина

D –NTP – смеса од деоксинуклеотиди

d-UMP – деоксиуридилат

d-TMP – деокситимидилат

ДХФ – дихидрофолат

ДХФР – дихидрофолат редуктаза

EDTANa₂ – динатриумова сол на етилен диамин тетраацетат

ЕФС – преживување без настан (англ. event free survival)

ЛД – англ. Linkage disequilibrium

МС – метионин синтетаза

MRG – група со среден ризик (англ. medium risk group)

МТХ – метотрексат

МТХПГ – метотрексат полиглутамат

МТХФР – метилен тетраhydroфолат редуктаза

5- МТХФ – 5- метилен тетраhydroфолат

МТХФД – метилен тетраhydrofolat дехидрогеназа

НМР – нуклеарна магнетна резонанса

МРД – минимална резидуална болест (англ. minimal residual disease)

OR – однос на шанси (англ. Odds ratio)

PCR – (англ. polymerase chain reaction)

П-гп – п-гликопротеин

PIC (англ. polymorphism information content) статистичка мерка на диверзитетот на алелите во испитуваната популација

РНА – рибонуклеинска киселина

RR – релативен ризик (англ. Relative risk)

РФЦ1 – носачот на редуцираниот фолат (англ. reduce folat carier)

RFLP – (англ. restriction fragment length polymorphism)

SAM – с-аденозил метионин

СНП – полиморфизам на поединечен нуклеотид (англ. single nucleotide polymorphism)

SRG – група со стандарден ризик (англ. standard risk group)

TEL – AML

ТТ – телесна тежина

ТВ – телесна висина

ТС – тимидилат синтетаза

TSER – (англ. Thymidilat syntase enhancer region)

ТХФ – тетраhydrofolat

ФАБ класификација – француско-американска-британска класификација

HRG – група со висок ризик (англ. High risk group)

НАРМАР – мапа на хаплотипови на хуманиот геном

HWE – Харди Вајнбергова рамнотежа (англ. Hardy Weinberg equilibrium)

ЦНС – централен нервен систем

CI – интервал на доверливост (од англ. Confidence Interval)

CR – комплетна ремисија (англ. complete remission)

РЕЗИМЕ

Акутната лимфобластна леукемија (АЛЛ) е најчесто малигно заболување во детската возраст и на неа отпаѓа околу една третина од сите малигноми кај децата. Бидејќи АЛЛ во детската возраст спаѓа во малигните заболувања со висок процент на излекување, балансот меѓу ефикасноста на терапијата и токсичните ефекти од истата е во фокусот на актуелните истражувања во современата детска онкологија. Фармакогенетиката проучувајќи ги полиморфизмите на гените вклучени во метаболизмот на лекови би можела да ја подобри идентификацијата на пациенти кај кои може да се очекуванесоодветен одговор на терапијата, појава на токсични ефекти од терапијата или релапс на болеста. Досегашните резултати од студиите посветени на истражување на влијанието на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам и исходот од терапијата и токсичните ефекти од истата кај децата со АЛЛ се сè уште контровезни.

Цели на студијата беа: анализа на токсичните ефекти од хемотерапијата со високи дози на МТХ кај пациенти со АЛЛ, генотипизација на пациентите со АЛЛ за шест полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам (*MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MS2756A>G*, *TS 2R/3R*, *RFC180 A>G(SLC19A1)* и *ABCB1 G2677A/T*) и етаблирање на методите за нивна генотипизација, евалуација на корелацијата на секој полиморфизам поединечно со појавата на токсични ефекти од високите дози на МТХ, ЕФС и релапс на болеста, истражување на влијанието на комбинацијата на два или повеќе полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам врз појавата на токсичните ефекти од МТХ, ЕФС и релапс на болеста и анализа на асоцијацијата на генските полиморфизми и концентрацијата на МТХ по истекување на лекот.

Во оваа ретроспективно-проспективна студија беа вклучени вкупно 108 пациенти. Пациентите беа поделени во 2 групи – студиска и контролна. Студиската група се состоеше од 65 пациенти со АЛЛ лекувани по протоколот АЛЛ БФМ 95 и АЛЛ БФМ 2000 на Одделот за хематологија и онкологија при ЈЗУ Клиника за детски болести Скопје. Кај нив беше извршена генотипизација за полиморфизмите вклучени во фолатниот метаболизам и нивното влијание врз токсичните ефекти и терапискиот исход. Контролната група се состоеше од 43 здрави пациенти кај кои беше спроведена само генотипизација за полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам. Анализираниите податоци за пациентите од студиската група беа добиени

од болничките истории на пациентите со АЛЛ. Токсичните ефекти беа анализирани според критериумите за токсичност од протоколот АЛЛ БФМ 95 и АЛЛ БФМ 2000 кои се пропишани во посебен образец од протоколот (отсуство или присуство на токсичен ефект и негова градација од 1-4).

Од секој пациент по добивање на информирана согласност, беше изолирана ДНА во молекуларната лабораторија на ЈЗУ Универзитетска Клиника за детски болести Скопје. Генотипизацијата на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам беа извршени во лабораторијата за молекуларна биологија на Природно-математичкиот факултет во Скопје.

Добиените резултати покажаа дека најчесто манифестирани токсични ефекти во тек и по завршување на терапијата со високи дози на МТХ беа хепатотоксичноста и депресијата на коскена срцевина манифестирана со редукција на хемоглобинот и неутрофилните леукоцити кај повеќе од 50% од пациентите, следеше тромбоцитопенијата кај нешто повеќе од 25% од пациентите. Останатите токсични ефекти се манифестираа кај помалку од 10% од пациентите, но некои од нив беа со сериозни клинички импликации. При анализа на степенот на изразеност на токсичниот ефект (1-4 степен), од вкупно регистрирани 189 епизоди на токсичност во тек на терапијата со МТХ, најзастапени беа токсичните епизоди од трет степен (43,3%) кои може да имаат значајно влијание врз третманот и исходот на болеста. Тромбоцитопенијата (во пет циклуси на терапија со МТХ) беше најзастапен токсичен ефект од четврт степен, додека најчесто манифестирани токсични ефекти од трет степен беа неутропенијата (во 23 циклуси), следеа анемијата (во 17 циклуси) и хепатотоксичноста (во 12 циклуси). Беа детерминирани генотиповите за шест специфични полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам – *MTHFR* (C677T и A1298C), *TSER* (2R/3R), *RFC1*(SLC19A1 A80G), *MS* (2756 A>G) и *ABCB1* (G2677T/A) и беа етаблирани методите за нивна генотипизација. Споредено со податоците од литературата, почесто е застапен варијантниот CC генотип на *MTHFR* A1298C полиморфизмот, додека застапеноста на останатите полиморфизмите беше во согласност со објавените податоци во литературата за застапеноста на овие полиморфизми во Европската популација. По анализата на корелацијата на полиморфизмите вклучени во фолатниот метаболизам и токсичните ефекти од МТХ-от утврдено беше дека *MTHFR* 1298AC генотипот има значаен импакт врз појавата на

токсичноста во тек и по завршување на терапијата со високи дози на MTX. Пациентите хетерозиготи за овој полиморфизам и пациентите носители барем на еден варијантен алел (C) имаа статистички сигнификантно пониска инциденца на хепатотоксичност и тромбоцитопенија, но имаа повисока инциденца на други токсични ефекти. Присуството на *ABCB1* 2677 GA генотипот беше поврзано со намалена инциденца на анемија, додека носителите на варијантниот алел почесто манифестираа орален мукозит. Пациентите носители на *TSE*R 2R/3R, *TSE*R 3R/3R генотипот и носителите на варијантниот 3R алел статистички сигнификантно почесто манифестираа тромбоцитопенија. Инциденцата на инфекции во тек и по завршување на терапијата со MTX беше повисока кај пациентите носители на *MTHFR* 677 CT, *MTHFR* 677 TT, *MTHFR* 1298 AC и *ABCB1* 2677 TT генотипот, без статистичка сигнификантност. За анализа на можното влијание на овие полиморфизми врз ризикот за појава на АЛЛ беше компарирано присуството на полиморфизмите меѓу студиската и контролната група, при што беше регистрирана статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на *TS* 2R/3R, *SLC19A1* 80 AG, *SLC19A1* 80 GG, како и на *ABCB1* GT полиморфизмот кај студиската популација во однос на контролната група. При анализа на влијанието на полиморфизмите врз концентрацијата на MTX–от, беше утврдено дека носителите на дивите генотипови на полиморфизмите *MTHFR* 677CC и на *MTHFR* 1298AA имаа статистички сигнификантно повисоки концентрации на MTX 24 часа по завршувањето на терапијата. Анализирана беше и ген-ген интеракцијата, односно влијанието на присуството на два или повеќе полиморфизми кај пациентите со појавата на токсични ефекти од хемотерапијата. Само кај носители на хетерозиготниот и варијантниот генотип за MS2756 AG+ *MTHFR*C677T беше регистрирана зголемена инциденца на инфекции, но без статистичка сигнификантност.

Генотипизацијата на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам претставуваат корисни маркери за предвидување на токсичните ефекти од хемотерапијата со високи дози на MTX и понатамошно индивидуализирање на терапијата на детската АЛЛ. Овие молекуларни анализи би требало да се воведат во редовните дијагностички процедури на децата со АЛЛ пред започнување на хемотерапијата. Неопходни се понатамошни студии кои би ја истражувале интеракцијата меѓу генетските полиморфизми и ризикот за неуспех на хемотерапијата како би се детерминирало дали прилагодување на дозата согласно со генотипот би

овозвозможила зголемена ефикасност на антилеукемискиот третман, намалена токсичност од хемотерапијата и минимален ризик за релапс на болеста .

RESUME

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of cancer in childhood and it covers almost one third of all malignant diseases in children. Due to the fact that the childhood ALL belongs to malignant diseases with high degree of cure, the balance between efficiency of treatment and the toxic effects thereof is the focus of the current researches in contemporary children's oncology. Pharmacogenetics, studying the polymorphisms in genes involved in the metabolism of drugs could improve the identification of patients who can be expected to have poor response to therapy, occurrence of toxic effects of treatment or relapse.

Current results of the studies dedicated to investigating the effect of polymorphisms of genes involved in folate metabolism and the outcome of the therapy and toxic effects in children with ALL are still controversial.

The objectives of the study included: analysis of the toxic effects of chemotherapy with high doses of MTX in patients with ALL, genotyping of patients with ALL for six polymorphisms of genes involved in folate metabolism (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MS2756A> G, TS 2R / 3R , RFC180 a> G (SLC19A1) and ABCB1 G2677A / T) and establishing methods for their genotyping, evaluation of the correlation of each individual polymorphism with the occurrence of toxic effects of high doses of MTX, EFS and disease relapse, exploring the impact of the combination of two or more polymorphisms of genes involved in folate metabolism over the incidence of toxic effects of MTX, ESF and disease relapse as well as analysis of association of gene polymorphisms and the concentration of MTX following the drug leakage.

In this retrospective-prospective study a total number of 108 patients have been included. The patients were divided into 2 groups – a study one and control one. The study group consisted of 65 patients with ALL treated according to protocol ALL BFM 95 and ALL BFM 2000 at the Department of Hematology and Oncology at Clinic for Children's Diseases in Skopje. The group was subject to genotyping of polymorphisms involved in folate metabolism and their impact on the toxic effects and the therapeutic outcome. The control group consisted of 43 healthy patients that were subject only to genotyping polymorphisms of genes involved in folate metabolism. The analyzed data on patients from the study group were obtained from hospital histories of patients with ALL. Toxic effects were analyzed according to the criteria

for toxicity from the protocol ALL BFM 95 and ALL BFM 2000 set out in the special form of the protocol (absence or presence of toxic effects and grading thereof from 1-4).

After obtaining informed consent, DNA isolation was performed in molecular laboratory of the PHI University Clinic for Children's Diseases in Skopje. Genotyping of polymorphisms of genes involved in folate metabolism were performed in the laboratory for Molecular Biology at the Faculty for Natural Sciences and Mathematics in Skopje.

The obtained results indicated that the most commonly manifested toxic effects during and after the treatment with high doses of MTX have been the hepatotoxicity and bone marrow depression manifested by reduction of the hemoglobin and granulocytes in more than 50% of patients, then the thrombocytopenia in more than 25% of patients. Other toxic effects were manifested in less than 10% of patients, but some of them were with serious clinical implications. When analyzing the level of expression of the toxic effects (grade 1-4) of the total registered 189 episodes of toxicity during treatment with MTX, the most common were the toxic episodes of third degree (43.3%) that may have serious implications on the treatment and the outcome of the disease. Thrombocytopenia (in five cycles of treatment with MTX) was the most frequent toxic effect of the fourth degree, while the most common manifested toxic effect of third degree were the neutropenia (23 cycles), then the anemia (17 cycles) and the hepatotoxicity (12 cycles). Genotypes for six specific polymorphisms of genes involved in folate metabolism were determined - MTHFR (C677T and A1298C), TSER (2R / 3R), RFC1 (SLC19A1 A80G), MS (2756 A> G) and ABCB1 (G2677T / A) and the methods for genotyping thereof have been established. As regards the distribution of polymorphisms in our population compared to the literature data, it is more prevalent the variant CC genotype of MTHFR A1298C polymorphism, while the presence of the other polymorphisms was in compliance with the prevalence of these polymorphisms in the European population. After the analysis of the correlation of polymorphisms involved in folate metabolism and the toxic effects of MTX, it was identified that MTHFR 1298AC genotype has a significant impact on the occurrence of toxicity during and after the treatment with high doses of MTX. Heterozygous patients for this polymorphism and patients who are carriers of at least one variant allele (C) had a statistically significant lower incidence of hepatotoxicity and thrombocytopenia, but had a higher incidence of other toxic effects. The presence of ABCB1 2677 GA genotype was associated with a reduced incidence of anemia, while the variant allele carriers often manifested oral mukozit. Patients with TSER 2R / 3R,

TSER 3R / 3R genotype and the carriers of the variant allele 3R, statistically significantly manifested thrombocytopenia more frequently. The incidence of infections during and after the treatment with MTX was higher in patients carriers of MTHFR 677 CT, MTHFR 677 TT, MTHFR 1298 AC and ABCB1 2677 TT genotype, without statistical significance. To analyze the possible influence of these polymorphisms on the risk of ALL occurrence, the presence of polymorphisms between the study and control group has been subject to comparison, thus it was registered that there is a statistically significant difference in the distribution of TS 2R / 3R, SLC19A1 80 AG, SLC19A1 80 GG, and ABCB1 GT polymorphism of the study population as regards the control group. During the analysis of the impact of polymorphisms on the concentration of MTX – it was identified that holders of wild genotypes of the polymorphisms MTHFR 677CC and MTHFR 1298AA had statistically significantly higher concentrations of MTX 24 hours after the completion of the treatment. The gene-gene interaction was also subject to analysis, i.e. the influence of the presence of two or more polymorphisms in patients with occurrence of toxic effects from chemotherapy. Only in case of patients carriers of heterozygous and variant genotype for MS2756 AG + MTHFRC677T increased incidence of infections has been registered, but without statistical significance.

Genotyping the polymorphisms of genes involved in folate metabolism represents useful markers for predicting the toxic effects of chemotherapy with high doses of MTX and further individualization of treatment of children's ALL. These molecular analyzes should be introduced in the regular diagnostic procedures for children with ALL before initiating the chemotherapy. Additional studies are necessary in order to investigate the interaction between the pharmaco-genetical polymorphisms and the risk of failure of the chemotherapy in order to determine whether dose adjustment in accordance with the genotype would allow increased efficiency of anti-leukemia treatment, reduced toxicity of chemotherapy and minimal risk for disease relapse.

Содржина

1	ВОВЕД.....	1
1.1	ИНЦИДЕНЦА И ЕПИДЕМИОЛОГИЈА.....	2
1.2	ЕТИОЛОГИЈА.....	3
1.3	КЛИНИЧКА ПРЕЗЕНТАЦИЈА.....	5
1.4	ДИЈАГНОЗА.....	6
1.5	КЛАСИФИКАЦИЈА НА АКУТНАТА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕУКЕМИЈА	6
1.6	ЦИТОГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛАРНА ГЕНЕТИКА НА АЛЛ	9
1.7	ТЕРАПИЈА НА АЛЛ.....	11
1.8	ПРОГНОЗА НА АЛЛ.....	11
1.8.1	РАНИОТ ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈАТА КАКО ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОР	13
1.8.2	МИНИМАЛНА РЕЗИДУАЛНА БОЛЕСТ (МРД) КАКО ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОР	13
1.9	РЕЛАПС НА АЛЛ.....	14
1.10	ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ХЕМОТЕРАПИЈА	15
1.10.1	ВИДОВИ НА ХЕМОТЕРАПЕУТИЦИ	16
1.10.2	МЕХАНИЗАМ НА ДЕЈСТВО НА ЦИТОСТАТИЦИТЕ	16
1.10.3	ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ОД ХЕМОТЕРАПИЈАТА.....	17
1.11	ПРИНЦИПИ НА ТЕРАПИЈАТА НА АЛЛ ВО ДЕТСКАТА ВОЗРАСТ ВО ПРОТОКОЛИТЕ АЛЛ БФМ	20
1.11.1	ФАЗИ ВО ТРЕТМАНОТ НА АЛЛ ВО ПРОТОКОЛИТЕ НА БФМ (БЕРЛИН – ФРАНКФУРТ – МИНСТЕР) СТУДИСКАТА ГРУПА	21
1.11.2	МЕТОТРЕКСАТОТ ВО ТРЕТМАНОТ НА АЛЛ	23
1.11.3	МЕТОТРЕКСАТОТ ВО ПРОТОКОЛИТЕ НА СТУДИСКАТА ГРУПА БФМ	24

1.11.4	МЕХАНИЗАМ НА ДЕЈСТВО НА МЕТОТРЕКСАТОТ И ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ПРЕДИЗВИКАНИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МЕТОТРЕКСАТ.....	25
1.12	ИНДИВИДУАЛИЗИРАЊЕ НА ТЕРАПИЈАТА И УЛОГАТА НА ФАРМАКОГЕНЕТИКАТА КАЈ АЛЛ.....	28
1.12.1	ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ	30
1.12.2	ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ.....	33
1.12.3	АСОЦИЈАЦИЈАТА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ СО ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД МЕТОТРЕКСАТОТ И СО ТЕРАПИСКИОТ ИСХОД.....	39
2	МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ТРУДОТ	40
3	ЦЕЛИ НА ТРУДОТ	42
4	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	43
4.1	Материјал.....	43
4.1.1	Критериуми за влучување во студијата.....	43
4.1.2	Критериуми за исклучување од студијата.....	43
4.2	Методи на истражувањето	43
4.2.1	Анализа на болнички истории	43
4.2.2	Анализа на токсичните ефекти	44
4.2.3	Изолација на ДНА.....	45
4.2.4	Генотипизација на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам	45
4.2.5	Статистичка анализа на податоците	48
5	РЕЗУЛТАТИ	50
5.1	Демографски податоци за групата на пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат	50
5.2	Клинички и клиничко-лабораториски податоци за групата на пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.....	52

5.3	Генотипизација на полиморфизмите.....	63
5.4	Популациско-генетска анализа.....	72
5.5	Статистичка споредба на генотиповите на полиморфизмите кај двете групи испитаници.....	84
5.6	Поврзаност на генотиповите од испитуваните полиморфизми кај пациентите со АЛЛ и токсичните ефекти во тек и по завршувањето на терапијата со високи дози на метотрексат	88
5.7	Поврзаност на алелите од испитуваните полиморфизми кај пациентите со АЛЛ и токсичните ефекти по третманот со метотрексат	122
6	ДИСКУСИЈА	144
6.1	ГЕНОТИПИЗАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ ВО НАШАТА СТУДИЈА	145
6.1.1	ДИСТРИБУЦИЈА НА ГЕНОТИПОВИТЕ КАЈ СТУДИСКАТА И КОНТРОЛНАТА ГРУПА	145
6.1.2	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>MTNFR C677T</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ	146
6.1.3	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>MTNFR A1298C</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ	147
6.1.4	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>TSE</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ	148
6.1.5	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>MS2756 A/G</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ	149
6.1.6	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>ARFC 80 A>G (SLC19A1 80)</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ ..	150
6.1.7	ДИСТРИБУЦИЈА НА <i>ABCB1 A2677G/T</i> ПОЛИМОРФИЗМОТ	150
Наумовска во студијата спроведена на Македонска популација утврдила фреквенцијата од 32.7%, 44.9% and 22.4% за 2677GG, 2677GT and 2677GT соодветно. Ниеден од испитуваните субјекти не бил носител на А алелот (109).		
6.2	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА ...	152
6.2.1	АСОЦИЈАЦИЈА НА <i>MTNFR C677T</i> И <i>A1298C</i> ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА.....	153
6.2.2	АСОЦИЈАЦИЈА НА <i>TSE</i> ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА.....	156

6.2.3	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА <i>RFC1 80</i> <i>G>A</i> (<i>SLC19A1 80</i>) СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА	157
6.2.4	АСОЦИЈАЦИЈА НА <i>MSA2756G</i> ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА.....	158
6.2.5	АСОЦИЈАЦИЈА НА АБЦБ1 ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА.....	160
6.3	ИНЦИДЕНЦА НА ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ КАЈ СТУДИСКАТА ГРУПА	162
6.4	СТЕПЕН НА ИЗРАЗЕНОСТ НА ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ	163
6.5	АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО АЛЛ	163
6.5.1	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА МТХФР И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ.....	164
6.5.2	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА ТИМИДИЛАТ СИНТЕТАЗА(TS) И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ	169
6.5.3	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА НОСАЧОТ НА РЕДУЦИРАНИОТ ФОЛАТ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ	170
6.5.4	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА АВСВ1 ГЕНОТ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ.....	171
6.5.5	АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА МЕТИОНИН СИНТЕТАЗАТА И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ.	173
6.6	АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО РИЗИКОТ ЗА РЕЛАПС ИЛИ ЛЕТАЛЕН ИСХОД КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО АЛЛ.....	174
6.7	АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА МТХ	180
6.8	ВЗАЕМНОТО ВЛИЈАНИЕ НА ПОВЕЌЕ ГЕНИ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД МТХ.....	182
7	ЗАКЛУЧОЦИ.....	184
8	РЕФЕРЕНЦИ:	187

9	ПРИЛОГ 1 - Образец за следење на токсичните ефекти при терапијата со метотрексат.....	210
---	---	-----

1 ВОВЕД

Акутната лимфобластна леукемија (АЛЛ) е најчесто малигно заболување во детската возраст и на неа отпаѓа околу една четвртина од сите малигноми кај децата на возраст под 15 години. Годишната инциденца на АЛЛ изнесува 30-40/1.000.000 деца, со најголема инциденца меѓу втората и петтата година од животот, почесто е застапена кај машкиот пол.

АЛЛ се карактеризира со неконтролирана пролиферација и матурационен арест на лимфоидните прогениторни клетки во коскената срцевина(1). Овие трансформирани хемопоезиски стем клетки имаат аберантна диференцијација, зголемен „turn over“ и го инхибираат растот на нормалните лимфоидни, еритроидни, гранулоцитни и мегакариоцитни прекурзори во коскената срцевина преку директни и индиректни механизми. Како последица на тоа, во коскената срцевина се создаваат сè повеќе и повеќе дисфункционални бели крвни клетки, а нормалните еритроцити и тромбоцити се потиснати и се намалува нивниот број. Бидејќи АЛЛ не е лимитирана на одреден регион во човечкото тело, таа преку крвта и лимфниот систем многу бргу се шири, зафаќајќи повеќе органи и системи, така да со право се нарекува системска малигна болест.

Достигнувањата и искуствата во терапијата на акутната лимфобластна леукемија (АЛЛ) претставуваат вистинска револуција во современата клиничка онкологија (2,3).

Пред ерата на антилеукемичната терапија АЛЛ важеше за фатална болест по чие дијагностицирања децата преживуваа 2-3 месеци. Во денешно време благодарение на оптимизацијата на хемотераписките режими скоро 95% од заболените постигнуваат комплетна ремисија во тек на терапијата, а околу 70-80% од нив постигнуваат континуирана пролонгирана ремисија или т.н. преживување без настан (ЕФС – англ. event free survival), подолго од 5 години и повеќето од нив може да се сметаат за излекувани.

Според литературните податоци (2,3,4) овој особен успех се должи на повеќе фактори:

1. Пронаоѓањето на нови антилеукемиски лекови
2. Воведување на полихемиотерапија со избор на антилеукемиски супстанции чие меѓусебно цитотоксично дејство се потенцира, како и подобрување на начинот на нивна употреба

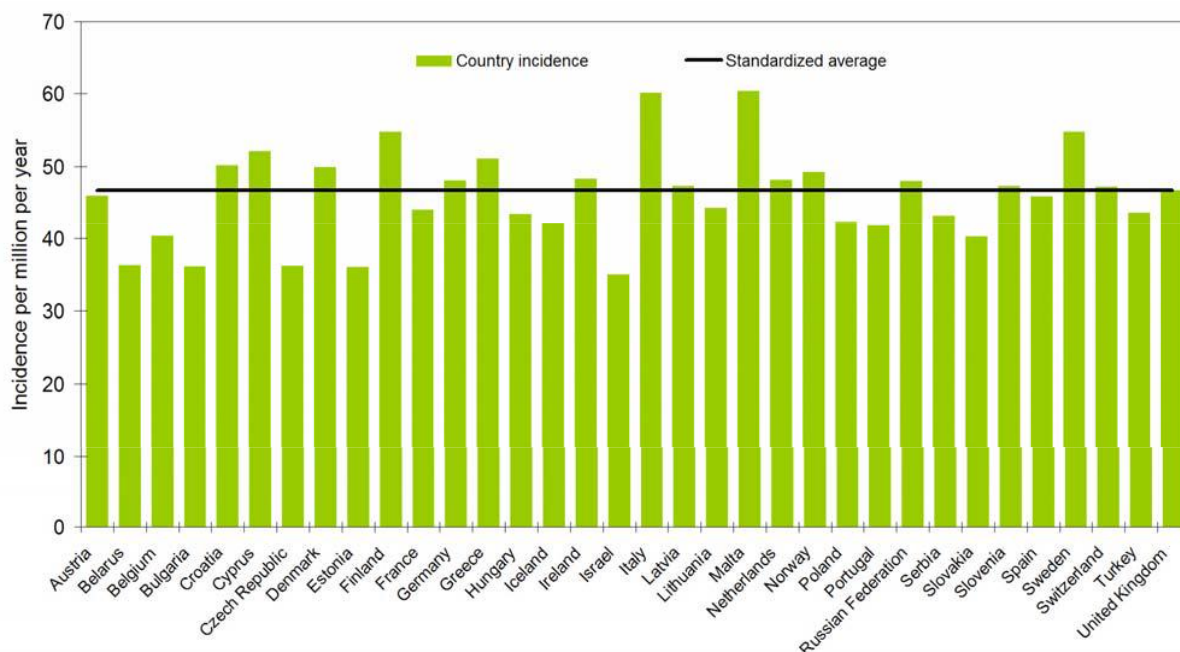
3. Превенција и лекување на леукемиските жаришта во централниот нервен систем (ЦНС) со интратекално вбригување на цитотоксични лекови и зрачење на ЦНС, со што се постигнува не само локален тераписки ефект, туку се редуцира и ризикот за релапс на болеста во ЦНС. Пред воведувањето на интратекална терапија и профилактичкото зрачење на ЦНС, повеќе од 75% од децата со АЛЛ имаа релапс на болеста во ЦНС многу кратко време по завршување на терапијата
4. Многу подобро познавање на кинетиката на леукемиските клетки, како и механизмот на делување на цитотоксичните лекови на ниво на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК) и на клеточниот репродуктивен циклус
5. Подобра стратификација на пациентите во ризични групи
6. Апликација на цитостатици во максимално толерабилни дози во што покус временски интервал
7. Поефикасно надминување на токсичните ефекти од хемотерапијата со примена на подобра супортивна терапија
8. Детекција и пратење на минимална резидуална болест – МРД (MRD - англ. Minimal residual disease)
9. Формирање на добро дизајнирани протоколи од страна на студиски групи кои се бават со третман на АЛЛ

1.1 ИНЦИДЕНЦА И ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

Акутните лимфобластни леукемии се предоминантен тип на леукемија во детската возраст, опфаќајќи 80-85% од детските леукемии. Се јавуваат кај сите раси, почесто кај белата раса и почесто кај машки деца на возраст меѓу 3 и 5 години. Според Светската здравствена организација АЛЛ има годишна инциденца од 40 случаи на еден милион деца во индустријализираните земји на западна Европа и 30-35 случаи на еден милион во земјите од Источна Европа. Во субсахарска Африка инциденцата на АЛЛ во детската возраст изнесува помалку од 20 деца на еден милион деца. Во развиените земји повеќе од 80% од АЛЛ отпаѓа на Б прекурсорниот тип кој е одговорен за назначениот пик на инциденца на АЛЛ во раната детска возраст и овој тип е предоминантен во тоталната инциденца на АЛЛ и во останатите земји во светот (5).

Во Република Македонија инциденцата на АЛЛ изнесува околу 30-35 случаи на еден милион деца годишно.

Инциденцата на АЛЛ во светски рамки е прикажана на слика бр.1.



Слика 1: Инциденца на АЛЛ во светот

Инциденцата е стандардизирана на светската популација. За некои земји (Белгија Италија, Полска, Португалија, Руската федерација, Србија, Шпанија и Турција) националните проценки се базирани на регионалните регистри. www.euro.who.int/ENHIS (5)

1.2 ЕТИОЛОГИЈА

Причините за настанување на леукемијата се сè уште непознати. Се знае дека болеста настанува со малигна трансформација на прекурзорните лимфоцити и исто така е познато дека оваа трансформација може да биде асоцирана со генски алтерации на овие клетки. Причината за постоењето на овие генски алтерации и зошто тие не предизвикуваат малигна трансформација кај сите деца е сè уште непозната. Се обвинуваат повеќе фактори кои може да влијаат на појавата на леукемијата. Една од причините е генската предиспозиција со оглед на зголемената инциденца на АЛЛ кај субјекти со конституционални кариотипски аберации (пр. пациенти со тризомија 21), генска нестабилност или некое генско заболување. Епидемиолошките студии сугерираат на влијанието на надворешните фактори врз настанокот на АЛЛ-радиоактивното зрачење, различни хемикалии и лекови, исхраната, животните услови, електромагнетните бранови, инфекциите и сл.).

Сепак кај повеќето пациенти не може да се утврди причината за настанување на АЛЛ. (6,7)

Врз основа на епидемиолошките истражувања 5-10% од АЛЛ се асоцирани со експозиција на јонизирачко зрачење и конгенитални синдроми (Down, neurofibromatosis, Fanconi anaemia, and Bloom syndrome) (8). За останатите 90% етиопатологијата се смета за комплексен процес, т.н. процес во повеќе чекори, чија почетна точка претставуваат соматските мутации. Кога овие мутации се иницирани за време на феталниот живот, на повеќето од нив им е потребен постнатален настан кој ќе придонесе за акумулација на втора мутација и способност за пролиферација. (8,9,10)

Во таа смисла иницирачкиот настан кој започнува во клетката се должи на генската предиспозиција комбинирана со изложеноста на штетни надворешни влијанија. (11)

Генската предиспозиција се должи на присуството на генските полиморфизми кои се дефинирани како природни генски варијации кои случајно се јавуваат во општата популација. Најчестите видови на генски полиморфизми се полиморфизмите на еден нуклеотид – СНП (англ.SNP - single nucleotide polymorphism) кои се состојат од варијација на еден базен пар. Во зависност од тоа каде е лоциран СНП, тој може да интерферира со функцијата на генот и на тој начин да ги засегне метаболните патишта.

Факторите од надворешната средина исто така може да влијаат врз етиологијата на АЛЛ. Децата се многу повулнерабилни и поосетливи на надворешните влијанија отколку возрасните заради физиолошката незрелост и заради индиректната и ненамерна изложеност. Надворешните токсини како чад од цигари, издувни гасови, инсектициди, хемикалии кои се применуваат во домаќинството, бои или храна се потенцијален ризик за АЛЛ, бидејќи сите овие агенси може да содржат канцерогени материи. Овие субстанции ги активираат ензимите вклучени во ксенобиотскиот систем и може да интерферираат со генетскиот материјал на луѓето и евентуално да предизвикаат соматски мутации (12).

Голем број на епидемиолошки студии ја истражувале асоцијацијата меѓу инфекциите и ризикот за педијатриска леукемија, посебно за АЛЛ. Према хипотезата на Кинлен, зголемена инциденца на АЛЛ се јавува во перодите на мешање на популацијата кога нов инфективен агенс може да биде внесен во таа популација која претходно не била во контакт со него или е преосетлива на тој инфективен агенс(13). Грејвс пак смета

дека развојот на леукемија е во врска со несоодветен развој на имунитетот во доеначката возраст како последица на намалена изложеност на инфекции во раното детство што резултира со несоодветна реакција на имунолошкиот систем на одредена инфекција подоцна (хипотеза на одложена инфекција) (14).

Неколку обсервации се во прилог на теоријата дека инфекциите се инволвирани во онкогениот процес на детската АЛЛ:

1. Најголемата инциденца на АЛЛ е во раната детска возраст, кај деца од 2-5 години, група која сè уште нема добро развиен имунитет.
2. Виралната етиологија е докажана за некои животински и хумани канцери (пр. Epstein Bar –овата вирусна етиологија на Burkitt limfoma).
3. Забележана е сезонска варијација на инциденцата на АЛЛ (15)

1.3 КЛИНИЧКА ПРЕЗЕНТАЦИЈА

Симптомите на акутната леукемија кај повеќето деца и адолесценти се развиваат за само неколку недели. Помладите пациенти имаат симптоми кои варираат од неспецифични, минорни симптоми до животна загрозувачки компликации кои се должат на супресијата на нормалната клеточна популација во коскената срцевина и дисфункцијата на другите органи како последица на инфилтрацијата со леукемични бласти. Продукцијата на еритроцити, леукоцити и тромбоцити во коскената срцевина е редуцирана. Како последица на ова децата често се жалат на малаксаност и бледило која се должи на супресијата на црвената лоза и редуцираниот транспорт на кислород до ткивата и органите. Недостатокот на леукоцити, кои играат важна улога во одбраната на организмот од надворешни патогени микроорганизми, доведува до чести бактериски инфекции и пролонгирана фебрилност. Дефицитот на тромбоцити се манифестира со мукозни крварења. Голем број на деца се жалат на болки во коските, најчесто во грбот и долгите коски на екстремитетите како последица на инфилтрација на коскената срцевина со леукемични бласти. Зголемени лимфни јазли се чест клинички наод кај децата со леукемија. Исто така чест симптом е стомачната болка која се должи на инфилтрација и зголемување на црниот дроб и слезинката. Во случаи на инволвираност на централниот нервен систем пациентите се жалат на наузеја, главоболка, пореметен вид, симптоми од страна на кранијалните нерви и др. АЛЛ претставува генерализирана малигна болест при која секој орган во човековото тело може да биде зафатен со болеста.

1.4 ДИЈАГНОЗА

Цитоморфолошка анализа на коскената срцевина е неопходна за поставување на дијагноза на АЛЛ. Наодот на повеќе од 25% бласти во препарат од аспирациона пункција на коскена срцевина е доволен за иницијална дијагноза на акутна леукемија. Иницијалната дијагностика е дополнета со флоуцитометриска имунофенотипизација за определување на експресијата на антигените за лимофидна диференцијација на лимфобластите која се мери со помош на специфични моноклонални антители. Исто така, неопходно е со помош на цитогенетски и молекуларни анализи да се детектира евентуалното присуство на генски аберации, како што се хромозомални транслокации или нивните молекуларни еквиваленти (пр. t(9,22) или BCR/ABL фузијата). Молекуларните анализи и/или флоуцитометријата се користат и за следење на текот на болеста преку мерење на минимална резидуална болест (МРД – англ. Minimal residual disease). (16)

Во многу мал број на случаи е потребна патохистолошка анализа на материјал добиен од трепанобиопсија на коскена срцевина.

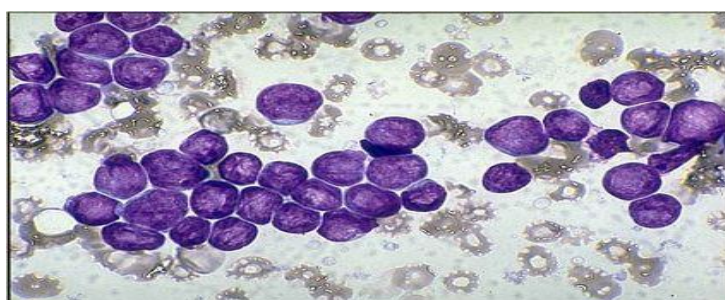
За утврдување на раширеноста на болеста на другите органи, на слезинката, црниот дроб, лимфните јазли, коските или ЦНС потребно е да се реализираат ехосонографија на абдомен и лимфогландули, рентген на бели дробови, магнетна резонанса на абдомен, ЦНС, карлица, тестиси и скен на коскен систем. Неопходно е спроведување на лумбална пункција за утврдување на евентуално присуство на бласти во цереброспиналната течност.

Како би го подготвиле пациентот за интензивна хемотерапија која следи по поставување на дијагноза и земајќи го предвид токсичниот ефект на хемотерапијата на сите органи, неопходно е да се направат дополнителни иследувања на функцијата на срцето, бубрезите, црниот дроб, мозокот, како и одредување на крвната група на пациентот.

1.5 КЛАСИФИКАЦИЈА НА АКУТНАТА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕУКЕМИЈА

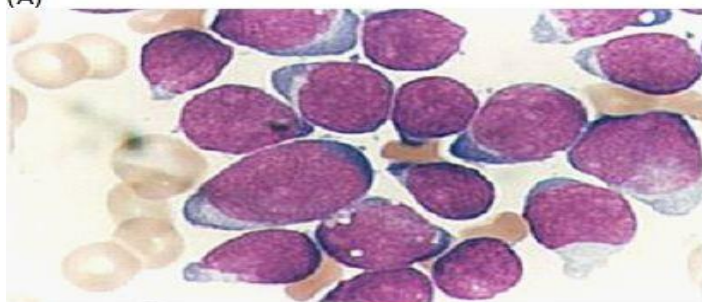
АЛЛ се карактеризира со малигна трансформација на прекурзорите на лимфоцитите-лимфобластите. Оваа трансформација се случува во секој стадиум на клеточната диференцијација така да можат да бидат засегнати различни подтипови на лимфоцити

и нивни прекурзори и врз основа на тоа постојат различни форми на АЛЛ. Една од најстарите интернационални класификации е предложена во 1976 година од страна на француско-американско-британската кооперативна група (ФАБ). Према оваа класификација, врз основа на морфолошките карактеристики, АЛЛ е поделена во три групи Л1, Л2 и Л3. Л1 лимфобластите се мали бласти со оскудна цитоплазма и помалку видливи нуклеолуси. Л2 бластите се поголеми, похетерогени, со обилна цитоплазма и изразени нуклеолуси. Л3 бластите ги карактеризира изразено базофилна вакуолизирана цитоплазма. (17) Морфологијата на лимфобластите според ФАБ класификацијата е прикажана на сликата бр.2.



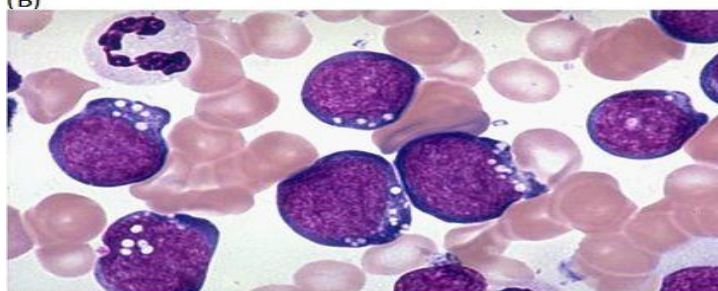
(A)

L1



(B)

L2



(C)

L3

Слика 2: ФАБ класификација на АЛЛ

Развојот на моноклоналните антитела насочени кон специфичните антигени на клеточната мембрана во голема мерка придонесоа за биолошка класификација на АЛЛ и истата се базира на типот на клеточната линија и стадиумот на диференцијација. Во зависност од тоа на кое место се случило блокирањето на диференцијацијата, односно созревањето на лимфоцитот, АЛЛ се дели во рани и доцни стадиуми. Покрај тоа

бластите често пати манифестираат аберантна експресија на антигените и врз основа на тоа е можно детекција на минимална резидуална болест со помош на проточна флоуцитометрија. Цитохемиските боења кои со децении беа рутина во дијагностиката на АЛЛ со воведувањето на флоуцитометријата изгубија од своето значење.

Карактеристични обрасци за експресија на антигените кај АЛЛ се CD19/CD22/CD79a за Б клеточната линија и CD7/CD3 за Т клеточната линија(18). Имунолошката класификација на АЛЛ е прикажана во табела бр.1

Табела 1: Имунолошка класификација на АЛЛ(18)

ИМУНОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА	АКУТНА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕУКЕМИЈА
Б – клеточен тип	CD19 и/или CD22 и/или CD79a (најмалку 2)
Про – Б АЛЛ	Отсатна експресија на други Б – клеточни диференцирачки антигени
Комон – Б АЛЛ	CD10+
Пре – Б АЛЛ	cyIgμ+
Зрела – Б АЛЛ	cyIg или sIgk+ или sIgλ+
Т – клеточен тип	Cy/m CD3+
Про – Т АЛЛ	CD7+
Пре –Т АЛЛ	CD2 или CD5 или CD8+
Кортикална Т АЛЛ	CD1a+
Зрела Т АЛЛ	mCD3+,CD1a-
My+АЛЛ	АЛЛ со присутни антигени од миелоидната лоза
Су – цитоплазматски, м - мембрански	

Иако имунофенотипизацијата е неопходна за диференцијација на АЛЛ од акутната миелоидна леукемија (АМЛ), како и за диференцијацијата на Б-клеточна од Т-клеточна леукемија, нејзиното прогностичко значење во Б клеточните подтипови е помало во однос на важноста на цитогенетските карактериститки на бластите и раниот одговор на терапија.

Миелоидните карактеристики CD13 и CD33 се присутни кај околу 1/3 болни со АЛЛ (MY+ALL). Коекспресијата на миелоидните карактеристики на лимфобластите треба

да се разликуваат од недиференцираните, бифенотипските и билинеарните леукемии. Бифенотипска леукемија претставува леукемија во која една доминантна популација на бласти има истовремена коекспресија и на миелоидни и на лимфоидни антигени. Леукемиите во кои постојат две посебни популации се означуваат како билинеарни и имаат најлоша прогноза. Постојат докази дека всушност не се работи за одвоени ентитети, бидејќи некои леукемии имаат карактеристики и на бифенотипска и на билинеарна леукемиа, а кај некои болни едната форма на леукемија може да премине во друга форма (19).

Најзастапена е Б клеточната АЛЛ (85%), претежно комон или пре Б АЛЛ. Про Б АЛЛ е многу незрела форма на АЛЛ која се карактеризира со отсаство на CD10 експресија и е асоцирана со висока инциденца на МЛЛ реаранжманите и има лоша прогноза. Зрелата Б-АЛЛ која се карактеризира со присуство на имуноглобулини на клеточната мембрана има подобра прогноза само кога се третира по протоколи предвидени за В-non Hodgkin лимфоми. Т-клеточната АЛЛ се дијагностицира кај околу 15% од пациентите со АЛЛ и се карактеризира со релативна резистентност на терапијата и полош исход отколку пациентите со Б АЛЛ. Докажано е дека Т лимфобластите акумулираат помалку метотрексат полиглутамати и помалку цитарабин отколку Б лимфобластите (20).

Заради различната прогноза на АЛЛ постојат модификации во тераписките протоколи како би се подобрил исходот од терапијата.

1.6 ЦИТОГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛАРНА ГЕНЕТИКА НА АЛЛ

Нумеричките и структурните абнормалности на хромозомите се присутни кај повеќе од 85% од децата со АЛЛ. Кај една третина од новодијагностицираните деца со Б – прекурзорна АЛЛ присутен е вишок на хромозоми, скоро кај 2/3 од случаите бројот е поголем од 50. Кај 25% од Б-прекурзорните АЛЛ присутна е транслокацијата t(12;21)(p13;q22) која резултира со фузија на генот TEL-AML1. Хиподиплоидија (≤ 45 хромозоми) се јавува кај 6-9% од детската АЛЛ, од кои најголем број на болни има 45, а само 1% има помалку од 44 хромозоми. Транслокациите во кои спаѓа MLL генот се присутни кај 70% од доенечките АЛЛ, а најчеста е t(4;11)(q21;23) со фузија на генот MLL-AF4. Филадельфија хромозомот (Ph) е резултат на реципрочна транслокација меѓу секвенцата на c-ABL онкогенот (англ. Abelson oncogene) на хромозомот 9 и BCR (англ. Breakpoint cluster region) секвенцата на хромозомот 22, t(9;22) (q34;q11). Оваа транслокација е присутна кај 2-3% од педијатриската АЛЛ. Хипердиплоидијата е ретка

кај Т-АЛЛ, но кај околу 25% од случаите е присутна транслокација која ги вклучува гените за Т- клеточните рецептори. Најчестите хромозомски абнормалности, генски карактеристики, здруженост со подтиповите на АЛЛ, нивната зачестеност и нивното прогностичко значење се прикажани во табела бр.2 (18)

Табела 2: Најчести хромозомски абнормалности кај АЛЛ

Абнормалност	Подтип на АЛЛ	Гени/ хромозоми	Честота	Прогноза
Хипердиплоидија	Рана пре-Б	4,10,17	30%	Поволна
Хиподиплоидија	Рана пре-Б	< 44	3%	Неповолна
t(4;11)(q21;q23)	Про-Б (доенчиња)	MLL-AF4	2%	Неповолна
t(1;19)(q23;p13)	Пре-Б АЛЛ	E2A-PBX1	5%	Неутрална
t(9;22)(q34;q11)	Рана пре-Б АЛЛ	BCR-ABL	2%	Неповолна
t(12;21)(p13;q22)	Рана пре-Б АЛЛ	TEL-AML1	25%	Поволна
t(1;14)(p33;q11)	Т-АЛЛ	TAL1	25% Т-АЛЛ	Неутрална
t(10;14)(q24;q11)	Т-АЛЛ	HOX11-TCRδ	10% Т-АЛЛ	Поволна
t(8;14)(q24;q11)	Зрела Б - АЛЛ	MYC-IgH	1-3%	Поволна

Болните со изразена хипердиплоидија (> 50 хромозоми) и со тризомија на хромозомите 4,10 и 17 имаат одлична прогноза со 90% петгодишно преживување. Исто така и присуството на фузискиот TEL-AML1 ген е поврзано со добра прогноза. Наспроти тоа болните со хиподиплоидија (< 44 хромозоми) и Ph + АЛЛ имаат лоша прогноза, со пет годишно преживување <50%. Болните со MLL реаранжманите исто така имаат неповолна прогноза.

1.7 ТЕРАПИЈА НА АЛЛ

1. **Хемотерапија** – се состои од лекови т.н. цитостатски агенси кои може да ги уништат или да го инхибираат растот на клетките кои брзо се делат како што се малигните клетки. Бидејќи еден цитостатик не може сам да ги уништи сите леукемични клетки, се применува комбинација на цитостатици кои делуваат на различни нивоа на клеточната делба, т.н. полихемотераписки режими.
2. **Радиотерапија** – и радијација на ЦНС се применува како додатна терапија кај пациенти со инфилтрација на ЦНС со леукемиски клетки, додека кај пациенти со висок ризик за релапс се применува профилактичка радиотерапија на ЦНС.
3. **Трансплантација на коскена срцевина** – Кај некои пациенти високодозна хемотерапија пратена со трансплантација на коскена срцевина е метода на избор.

Целта на терапијата е да се елиминираат што е можно повеќе леукемични клетки, како би можела коскената срцевина да ја возврати својата функција. Бидејќи хемотерапијата може да предизвика појава на токсични ефекти, воспоставени се специфични супортивни режими за превенција и соодветно менаџирање на токсичните ефекти и во денешно време тие претставуваат многу важна компонента во третманот на АЛЛ.

Интензитетот и траењето на хемотерапијата, потребата за радиотерапија и/или трансплантација на коскена срцевина, како и прогнозата на болеста зависи од подтипот на АЛЛ, од раширеноста на леукемичните клетки во организмот, од индивидуалниот одговор и од толерабилност на терапијата од страна на пациентите.

1.8 ПРОГНОЗА НА АЛЛ

Благодарение на современите достигнувања во дијагнозата и третманот на АЛЛ во последните три децении, во голема мерка се зголемени шансите за излекување на децата и адолесцентите со АЛЛ. Денешните модерни дијагностички процедури и употребата на интензивни, стандардизирани полихемотераписки протоколи комбинирани со оптимална супортивна терапија овозможува постигнување на пет годишно преживување од околу 70 - 80% во зависност од ризичната група. Се разбира децата со лоши прогностички фактори, како иницијално висок број на леукоцити и резистентност на терапијата или одреден АЛЛ подтип имаат полоша прогноза. Прогностичките фактори кај децата со АЛЛ се прикажани во табела бр.3.

Табела 3: Важни прогностички фактори и нивната приближна инциденца кај детската АЛЛ

Прогностички фактор	Поволни прогностички фактори и нивната приближна инциденца (%)	Неповолни прогностички фактори и нивната приближна инциденца (%)
Возраст	1-10 год. (77%)	< 1 год. (3%) или ≥ 10 год. (20%)
Пол	Женски (45%)	машки (55%)
Број на леукоцити	< 50.000/ μ l (80%)	≥ 50.000/ μ l (20%)
Имунофенотип	CD10-позитивни В-прекурзорни клетки (83%)	CD10-негативни В-прекурзорни клетки АЛЛ (4%), Т-АЛЛ (13%)
ЦНС статус	ЦНС 1 (80%)	ЦНС 3 (3%), TLP+ (7%)
Генотип	хипердиплоидија (20%), TEL/AML1 позитивни (20%)	хиподиплоидија (1%), t(9;22) или BCR/ABL позитивни (2%), t(4;11) или MLL/AF4 позитивни (2%)
Преднизонски одговор	< 1000/ μ l бласти во периферна размазка (90%)	≥ 1000/ μ l бласти во периферна размазка (10%)
Цитоморфолошки наод на коскената срцевина на 15 ден	< 5% бласти (M1) на 15 ден од индукционата терапија (60%)	≥ 25% бласти (M3) на 15 ден од индукционата терапија (15%)
Ремисионен статус по завршена индукција во коскената срцевина (цитоморфолошки)	< 5% бласти (M1) по 4-5 недели од индукционата терапија (98%)	> 5% бласти (M2 or M3) по 4-5 недели од индукционата терапија (2%)
Минимална резидуална болест (на молекуларно ниво)	< 10 ⁻⁴ бласти по 4-5 недели од индукционата терапија (40%)	> 10 ⁻³ бласти по 12 недели од третманот (индукција и консолидација) (10%)

Прогностичките фактори зависат од применетиот протокол, така да податоците наведени во табелата се во согласност со актуелните препораки на Германската БФМ група

ЦНС 1 (нетрауматска пункција, нема бласти во цереброспиналната течност по центрирање),

ЦНС 3 (нетрауматска пункција, во цереброспиналната течностима > 5 леукоцити/ μ L со присуство на бласти)

TLP+ (трауматска лумбална пункција со присуство на леукемични бласти

TLP без присутни бласти не се смета за неповолен фактор; прогностичкото значење на ЦНС2 статусот (нетрауматска пункција со ≥ 5 леукоцити/ μ L во цереброспиналниот ликвор е сè уште тема за размислување. За цитоморфолошка анализа, примероците од ликворот треба да се анализираат по подготовка на цитоспин препарат, постапка со која со центрифугирање се концентрираат клеточните компоненти од ликворот.

Хипердиплоидија е дефинирана како присуство на повеќе од 50 хромозоми или ДНА индекс ≥ 1,16 (ДНА индекс претставува соодносот меѓу количеството на ДНА во леукемичните клетки G0/G1 и количеството на ДНК во нормалните диплоидни лимфоцити); **хиподиплоидија** е дефинирана со број на хромозоми < 45.

Сè уште се дебатира околу прогностичката важност на останатите MLL реаранжмани (освен за MLL/AF4, кој е лош прогностички фактор) и за присуството на E2A/PBX1 фузијата (16)

1.8.1 РАНИОТ ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈАТА КАКО ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОР

Иако не се напълно дефинирани точните биолошки фактори кои контрибуираат со раниот одговор на хемотерапијата, се знае дека брзата регресија на болеста во иницијалната фаза на терапијата е резултат од комбинирањето на хемосензитивноста на бластните клетки, ефикасноста на хемотераписките агенци вклучени во протоколот и фармакогенетиката на домаќинот. Групата Берлин-Франкфурт-Минстер(БФМ) вовеле критериум кој веќе традиционално се користи во определувањето на брзината на одговорот кон иницијалната терапија. Тоа е бројот на бласти во периферната размаска по седумдневна терапија со преднизон (бројот на бласти помал од 1000/ μL на 8-от ден од почетокот на терапијата претставува брз иницијален одговор). Морфолошката проценка на миелограмот на 7,15 и 33 ден од почетокот на индукционата терапија, исто така се користи за квантификација на одговорот кон хемотерапијата. За брз одговор се смета М1 миелограм ($< 5\%$ бласти) со присуство на трите клеточни линии (регенерација на хемопоезата) (16).

1.8.2 МИНИМАЛНА РЕЗИДУАЛНА БОЛЕСТ (МРД) КАКО ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОР

Воведувањето на високо сензитивни методи за детектирање на минимална резидуална болест (МРД), флоуцитометриски или на молекуларно ниво се смета дека е значајно за прогноза на болеста. Според БФМ групата минималната резидуална болест би требало да се мери во два наврати: по завршената индукција и пред консолидацијата. Во повеќето студии позитивна МРД е дефинирана како присуство на повеќе од 0,01% лимфобласти на крајот на индукцијата. Ризикот за релапс е утврдено дека е пропорционален на нивото на МРД. Пациентите се класифицираат според процентот на бласти на пациенти со МРД со стандарден ризик, со интермедиерен ризик и со висок ризик. Десет годишното преживување без настан за трите групи МРД изнесува 93%, 74% и 16% соодветно. МРД е важна и за децата со АЛЛ кои се подготвуваат за алогена трансплантација на коскена срцевина и за мониторирање на одговорот по терапија за релапс на АЛЛ.

Заради фактот дека брзиот одговор на хемотерапијата е важен прогностичен фактор, кај пациентите со слаб одговор на иницијалната терапија потребна е модификација на терапијата, која најчесто се состои во пролонгирање на индукцијата и консолидацијата. Зголемување на интензитетот на релативно не-миелосупресивната терапија

(кортикостероиди, аспарагиназа и винкристин) во некои студии е докажано дека води до зголемување на бројот на пациенти со 5 годишно преживување без настан од 55 на 75%. Рано вклучување на нови лекови, како на пример нуклеозидни аналози (неларабин, клофарабин, гемцитабин) е докажано дека ја подобруваат прогнозата кај пациенти со АЛЛ со висок ризик, посебно кај пациентите со Т-АЛЛ. Примената на моноклонални антитела како ритуксимаб, гемтузумаб, алектумаб се вклучени во некои хемотераписки режими заради нивната активност кон одредени антигени асоцирани со АЛЛ.

Најновите достигнувања во имунологијата може да доведат до ефикасна клеточна имунотерапија и револуционерно да го променат третманот и прогнозата на АЛЛ (21)

1.9 РЕЛАПС НА АЛЛ

И покрај постигнатите успеси во третманот на АЛЛ, релапс на болеста се јавува кај 20 - 30% од децата. Релапсот се случува најчесто во првите 2-3 години по поставување на дијагнозата, додека многу поретко се јавува пет години по иницијалната дијагноза. Прогнозата на релапсот е генерално лоша, но сепак кај одреден процент на пациенти е можно постигнување на ремисија со интензивни хемотераписки режими и ако е потребно, со трансплантација на коскена срцевина. Тешко е да се предвиди одговорот на терапија кај децата со релапс, бидејќи кај скоро една третина од болните по постигнување на втората ремисија доаѓа до повторен релапс на болеста. Прогнозата на релапсот зависи од повеќе фактори: времето и местото на појава на релапсот, имунофенотипот на бластите и нивото на МРД во тек на реиндукциската хемотерапија. Колку е порано настанат релапсот, толку исходот од терапијата е полош.

Сè уште нема единствени ставови за дефинирање на ран и доцен релапс. Повеќето педијатриски хематоонколози за ран медуларен релапс го сметаат релапсот кој настанува во првите 36 месеци од поставување на дијагнозата, а за доцен го сметаат релапсот кој се јавува подоцна од 36 месеци од поставување на дијагнозата. Наспроти ремисијата од скоро 95% кај новодијагностицираната АЛЛ, кај децата со ран Б клеточен релапс ремисија се постигнува кај 66-82%, а кај доцниот Б клеточен релапс 90-95% пациенти. Заради агресивната терапија кај 3-8% од децата настанува летален исход како последица на токсичните ефекти од хемотерапијата. Долгогодишното преживување изнесува 10-20% кај децата со ран релапс, односно 40-50% кај децата со доцен релапс, вклучувајќи го и лекувањето со трансплантација на коскена срцевина.

Исходот на лекувањето на вториот и третиот релапс се уште полоши. Иако трета ремисија се постигнува кај околу 40% од болните, најчесто таа трае многу кратко.

Местото на релапсот е исто така битен прогностички фактор. Изолираниот медуларен релапс има најлоша прогноза, изолираниот екстремедуларен има поповолна прогноза, а комбинираниот релапс има интермедиерна прогноза. Границата меѓу раниот и доцниот екстремедуларен релапс е вообичаено 18 месеци по иницијалната дијагноза (во споредба со 36 месеци за раниот медуларен релапс). Кај деца со доцен изолиран ЦНС релапс 5 годишното преживување изнесува околу 80%, а со раниот изнесува околу 40%.

Оптималната терапија кај децата со релапс (трансплантација на коскена срцевина наспроти хемотерапија) не е сосема усогласена. Дополнителен проблем претставува достапноста на ХЛА компатибилен дарител на коскена срцевина и можен летален исход пред започнување на трансплантацијата (18).

1.10 ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ХЕМОТЕРАПИЈА

1. **Комбинирана хемотерапија:** за прв пат е применета со успех во третманот на АЛЛ во педесеттите години на минатиот век. (3,22,23,24) Во споредба со поединечните апликации на цитостатици, употребата на комбинирана хемотерапија значајно го зголеми процентот на пациенти кај кои се постигнува комплетна ремисија, како и должината на траење на ремисијата. Само кај 60% од пациентите кои биле третирани со поединечна хемотерапија била постигната комплетна ремисија, додека при примена на комбинирана хемотерапија се постигнува комплетна ремисија кај 95% од пациентите.
2. **Неoadјувантна хемотерапија** (предоперативен третман): иницијална хемотерапија, дизајнирана да го намали примарниот тумор пред спроведување на локална терапија (хируршка ресекција или радиотерапија).
3. **Адјувантна хемотерапија:** Се применува кај солидните тумори по спроведената локална хируршка или радиотерапија кај кои постои голем ризик од појава на релапс на болеста или далечни метастатски промени.
4. **Палијативна хемотерапија:** Нема тераписки цели, се применува за намалување на туморот и продолжување на животот на пациентите.

1.10.1 ВИДОВИ НА ХЕМОТЕРАПЕУТИЦИ

Основните лекови кои се користат во терапијата на малигните заболувања може да се поделат во неколку општи категории (3,23,24)

А. Цитотоксични лекови

- алкилирачки агенси и слични супстанции кои делуваат со создавање на ковалентни врски со ДНК и така спречуваат нејзина репликација
- антимаболити, агенси кои ги блокираат или попречуваат метаболните патишта вклучени во синтезата на ДНК
- цитотоксични антибиотици т.е супстанции со потекло од микроорганизми кои ја спречуваат делбата на клетките на цицачите
- деривати на растенија (винка алкалоиди, таксани, кампотедини), повеќето делуваат на микротубулите и создавањето на делбеното вретено.

Б. Хормони - најважни се стероидите, посебно гликокортикоидите, потоа естрогените и андрогените и лекови кои ја супримираат секрецијата на хормоните или го антагонизираат дејството на хормоните

В. Останати лекови кои не спаѓаат во наведените категории-лекови кои се дизајнирани да напаѓаат целни места специфични за малигната болест, модификатори на биолошкиот одговор, инхибитори на ангиогенезата и др.

1.10.2 МЕХАНИЗАМ НА ДЕЈСТВО НА ЦИТОСТАТИЦИТЕ

Малигните клетки настануваат како последица на серија на генетски и епигенетски промени од кои основни се (24):

- инактивација на тумор супресорни гени
- активација на онкогени (мутација на нормални гени кои ја контролираат делбата на клетките и други процеси).

Тие поседуваат четири карактеристики по кои се разликуваат од нормалните клетки:

1. неконтролирана пролиферација и долго преживување (нема апоптоза)
2. губиток на функцијата како последица на губитокот на способноста да се диференцираат
3. инвазивност
4. способност за метастазирање.

Малигните клетки неконтролирано пролиферираат заради промени во факторите на растот и/или нивните рецептори, интрацелуларните сигнални патишта, посебно оние кои го контролираат клеточниот циклус и апоптозата, експресија на теломеразата и ангиогенезата во туморот.

Према делувањето на клеточниот циклус цитостатиците се делат во две групи (3, 23, 24)

1. Цитостатици кои делуваат на клетките кои интензивно се делат. Овие лекови обично имаат специфично дејство на одредена фаза на циклусот на клетката. (G1,G2,S и M) Оваа група на лекови е особено ефикасна во терапијата на малигни заболувања на крвта, како и на сите видови на тумори кои имаат брза пролиферација.
2. Цитостатици кои делуваат независно од фазата на клеточен циклус, значи неспецифично, тука спаѓаат лековите кои се користат во терапијата на солидни тумори кои имаат спор раст.

1.10.3 ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ОД ХЕМОТЕРАПИЈАТА

Терапијата на малигните заболувања претставува поголем проблем отколку лекувањето на бактериските инфекции. Микроорганизмите биохемиски, квантитативно и квалитативно, се разликуваат од клетките на човекот, додека малигните клетки и здравите хумани клетки се многу слични од повеќе аспекти. Затоа, тешко е да се најдат општо употребливи биохемиски разлики меѓу нив кои би можеле да се искористат во пронаоѓање на цитостатик кој би делувал само на малигните клетки.

Повеќето цитостатици делуваат антипролиферативни и индуцираат апоптоза оштетувајќи го молекулот на ДНК. Но, тие истовремено делуваат и на нормалните клетки во организмот на човекот и на тој начин предизвикуваат оштетување на коскената срцевина, оралната и гастроинтестиналната мукоза, го успоруваат зараснувањето на раните, го успоруваат растот, можат да предизвикаат стерилитет, а може да предизвикаат и секундарно малигно заболување (3, 21).

Идеален цитостатик би бил лек кој ги уништува малигните клетки, а при тоа не ги оштетува здравите клетки во организмот. За жал, таков лек сè уште не постои.

Бидејќи механизам на дејство на цитостатиците е неселективен, во тек на нивната апликација настанува оштетување на витално значајните метаболни патишта кои се

критични и за малигните и за здравите клетки во организмот на човекот што може да доведе до манифестација на различни акутни токсични ефекти.

Најчести акутни токсични ефекти како последица на апликација на хемотерапија се (3, 25, 26)

- Миелосупресија
- Наузеа и повраќање
- Алопеција
- Ороинтестинален мукозит
- Хепатотоксичност
- Алергиски реакции
- Локална улцерација од субкутана екстравазација на лекот
- Хеморагичен цистит
- Коагулопатија
- Невролошки компликации

Акутните токсични ефекти од хемотерапијата може да бидат животна загрозувачки, нивната појава може да доведе до дисконтинуирање или дури и до прекин на хемотерапијата што може да го зголеми ризикот за релапс на болеста, а исто така може да влијаат и на квалитетот на живот во текот на терапијата. Повеќето од токсичните ефекти од хемотерапијата се транзиторни, но некои може да бидат животозагрозувачки и да доведат до летален исход кај пациентите. Најчеста причина за летален исход како последица на токсичноста од хемотерапијата се инфекциите – 0,5-1,55% од пациентите умираат како последица на инфекција во тек на индукцијата, а 1-3% од пациентите умираат во тек на инфективна епизода по постигнување на комплетна ремисија (27).

Покрај тоа треба да се земат предвид и доцните токсични ефекти од хемотерапијата како и можноста за појава на секундарна малигна болест по завршување на хемотерапијата. Бидејќи АЛЛ во детската возраст спаѓа во малигните заболувања со висок процент на излекување, балансот меѓу ефикасноста на терапијата и токсичните ефекти од истата е во фокусот на актуелните истражувања во современата детска онкологија.

Откако главните студиски групи постигнаа компарабилни резултати во третманот на детската АЛЛ, во фокусот на нивното внимание се редукција на акутните и доцните

токсичните ефекти од хемотерапијата, како и подобрување на исходот кај пациентите со лоша прогноза. Во новите протоколи предвидена е редукција на дозите на хемотераписките агенси за пациентите со стандарден и среден ризик. (26).

Стратификацијата на пациентите со АЛЛ во тераписките протоколи се базира на возраста, полот, бројот на леукоцити, кариотипот, имунофенотипот и раниот одговор на терапија, но за жал овој тип на стратификација не може да ја идентификува групата на пациенти која нема да одговори на терапијата или ќе искуси токсични ефекти кои нема да се манифестираат кај сите пациенти (3,25).

Еден од големите предизвици во онкологијата е да се детерминираат фактори кои ќе овозможат подобра стратификација и ќе овозможат соодветна терапија за секој пациент.

Покрај веќе востановените биолошки и клинички фактори за стратификација на пациентите со АЛЛ, индивидуалните генетски разлики во однос на метаболните патишта кои го засегаат одговорот на терапија во смисол на терапевтски ефект, резистенцијата на терапијата или несаканите ефекти од терапијата, се смета дека може да имаат значајна улога во исходот од третманот на АЛЛ. Фармакогенетиката проучувајќи ги варијациите на гените вклучени во метаболизмот на лекови би можела да ја подобри идентификацијата на пациенти кај кои може да се очекувалош одговор на терапијата, појава на токсични ефекти од терапијата или релапс на болеста (28).

Голем број студии се посветени на истражувањето на фармакогенетските фактори кои играат улога во појавата, третманот и исходот од терапијата на леукемијата. Проучувани се бројни полиморфизми на гените вклучени во метаболизмот на цитостатиците, како и интеракцијата меѓу овие гени и нивната улога во појавата на токсични ефекти од хемотерапијата и крајниот исход од терапијата. Генската варијабилност на ензимите, транспортерите и рецепторите вклучени во метаболизмот на лекови може да доведат до изменета индивидуална осетливост на лековите и да влијаат врз токсичноста или ефикасноста на третманот на АЛЛ (28,29,30).

Подобро разбирање на овие асоцијации е значаен предуслов за вклучување на фармакогенетските информации во оптимизирање на тераписките режими.

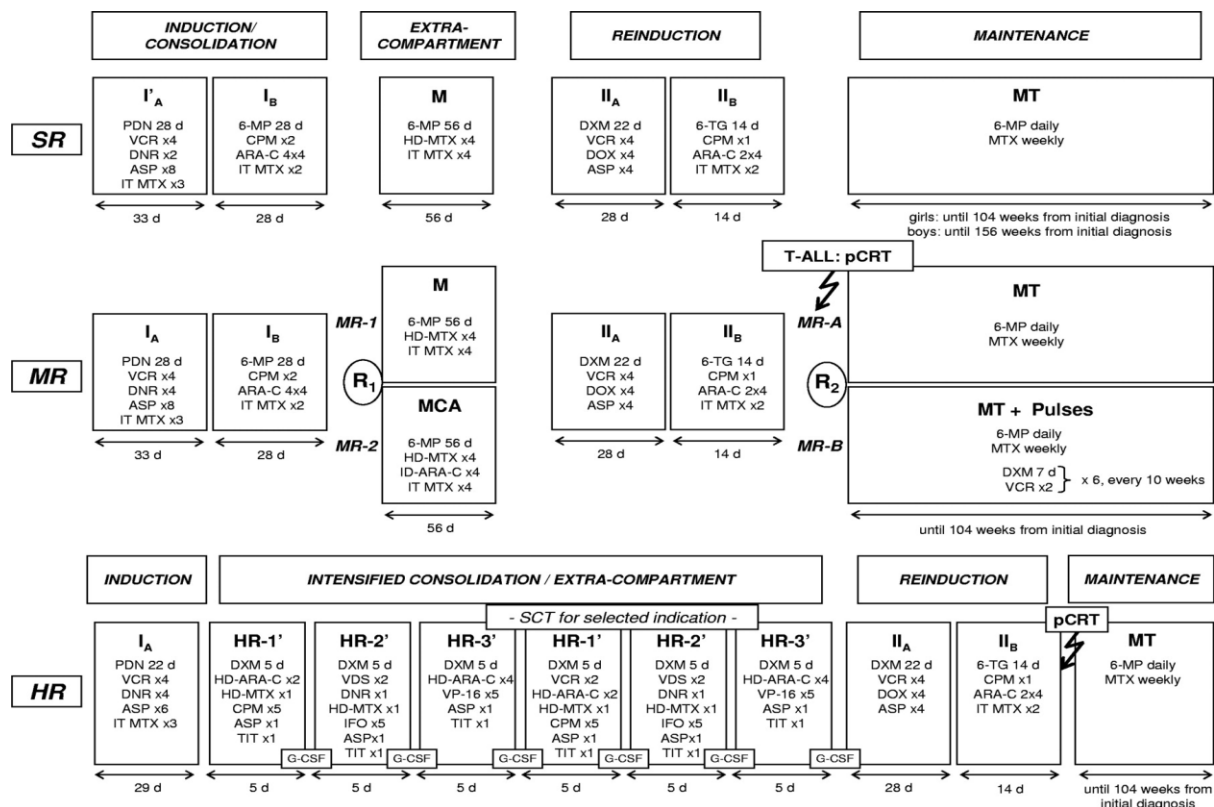
1.11 ПРИНЦИПИ НА ТЕРАПИЈАТА НА АЛЛ ВО ДЕТСКАТА ВОЗРАСТ ВО ПРОТОКОЛИТЕ АЛЛ БФМ

Третманот на пациентите со АЛЛ се состои во апликација на интензивна мултиагентна хемотерапија, понекогаш комбинирана со зрачење на CNS и трансплантација на коскена срцевина. Интензитетот и траењето на третманот се одредуваат во зависност од проценетниот ризик фактор (подтипот на АЛЛ, раширеноста на болеста, прогностички фактори-поволни и неповолни). Прецизно одредување на ризичниот фактор е многу важно за селектирање на терапискиот режим кој ќе овозможи висок процент на излекување пропратен со што помалку токсични ефекти од хемотерапијата (21).

Протоколот АЛЛ БФМ 2000 (сл.3) претставува пример за модерен клинички протокол кој се базира на посебна стратификација на пациентите според ризичниот фактор. По поставување на дијагнозата и пред започнување на терапијата, пациентите со АЛЛ се стратифицираат во три ризични групи – стандарден ризик, среден и висок ризик. Главните критериуми за оваа стратификација се иницијалниот број на леукоцити и возраста на пациентот, имунофенотипот, присуство на BCR-ABL и MLL/AF4 реаранжмани, раниот одговор на кортикотерапија и ремисиониот статус на триесет и третиот ден од терапијата (31).

Според овие карактеристики пациентите се стратифицирани во три ризични групи:

1. Група со стандарден ризик СРГ (SRG - англ. standard risk group) – немаат карактеристики на групата со висок ризик, иницијално имаат леукоцити помалку од 20×10^9 , на возраст се меѓу 1 и 6 години и немаат Т-АЛЛ/леукемија. Кај нив се очекува ЕФС 90%,
2. Група со среден ризик – МРГ (MRG – англ. Medium risk group) – немаат карактеристики на групата со висок ризик, иницијално имаат леукоцити 20×10^9 или повеќе, на возраст се меѓу 1 и 6 години или постари и имаат Б или Т-АЛЛ/леукемија. Кај нив се очекува ЕФС 80%.
3. Група со висок ризик ХРГ (HRG -англ. high risk group) - пациенти со лош одговор на преднизон – ППР (PPR -англ. pure prednisone response), и/или без комплетна ремисија КР (CR англ. complete remission) на 33 ден, и/или присуство на t(9,22) или BCR/ABL транслокација и/или t(4,11) или МЛЛ/АФ4 транслокација. Кај нив се очекува ЕФС 50%.



Слика 3: Основна шема на протоколот АЛЛ БФМ 2000

Целта на терапијата на АЛЛ е елиминирање на сите леукемични клетки и обновување на функцијата на коскената срцевина. Како би се превенирале и адекватно менаџирале токсичните ефекти од хемотерапијата, етаблирани се специфични дијагностички критериуми за нивно детектирање и супортивни режими кои се многу важни во третманот на АЛЛ.

1.11.1 ФАЗИ ВО ТРЕТМАНОТ НА АЛЛ ВО ПРОТОКОЛИТЕ НА БФМ (БЕРЛИН – ФРАНКФУРТ – МИНСТЕР) СТУДИСКАТА ГРУПА

Протоколите на студиската група БФМ ипоевекето светски протоколи за третман на детската АЛЛ се состојат од неколку фази на хемотерапија:

1. **ИНДУКЦИЈА:** се состои од неколку курса на интензивна полихемотерапија со различни цитостатици. Целта на оваа фаза е елиминација на поголемиот дел од леукемичните клетки во релативно краток период-постигнување на комплетна ремисија. Оваа фаза трае обично 5-8 недели.
2. **КОНСОЛИДАЦИЈА:** следи по индукијата, трае 2-4 месеци. Се состои од курсеви на интензивна хемотерапија составени од различни цитостатици во

однос на индукцијата. Во текот на консолидацијата целта е да се елиминираат преостанатите леукемични клетки (одржување на ремисијата) и да се минимизира ризикот на релапс на болеста. Важна компонента на оваа фаза е профилактичкиот третман на CNS чија цел е спречување на ширење на леукемичните клетки во CNS.

3. **РЕИНДУКЦИЈА:** оваа фаза се состои повторно од мултиагентна полихемотерапија и е слична на индукцијата. Целта е да се постигне комплетна деструкција на леукемичните клетки и да се спречи релапс на болеста.
4. **ТЕРАПИЈА НА ОДРЖУВАЊЕ:** се состои од помалку интензивна хемотерапија, најчесто аплицирана перорално и се спроведува во домашни услови. Целта на оваа фаза на хемотерапијата е борба против леукемичните клетки кои можеби го преживеале интензивниот третман и трае обично до крајот на втората година од почетокот на лекувањето на АЛЛ.
5. **ПРОФИЛАКТИЧКО ЗРАЧЕЊЕ НА ЦЕНТРАЛНИОТ НЕРВЕН СИСТЕМ (ЦНС):** во новите протоколи профилактичко зрачење на ЦНС е предвидено за пациентите со примарно засагање на ЦНС и за пациентите со Т-АЛЛ подтип.

1.11.2 МЕТОТРЕКСАТОТ ВО ТРЕТМАНОТ НА АЛЛ

ИСТОРИЈАТ

Во 1947 година тимот на истражувачи предводени од Сидни Фарбер (сл.4) докажале дека аминоптеринот, хемискиот аналог на фолната киселина може индуцира краткотрајна ремисија кај деца со АЛЛ.



Слика 4: Д-р Сидни Фарбер – таткото на модерната хемотерапија

Развојот на аналози на фолната киселина бил поттикнат од сознанието дека апликацијата на фолна киселина кај пациенти со АЛЛ доведува до прогресија на болеста и дека исхраната дефицитарна со фолна киселина може да доведе до подобрување на состојбата кај овие пациенти (32). Во тоа време биле во развојна фаза и други аналози на фолната киселина и во 1950 година МТХ-от (тогаш познат како аметоптерин) бил предложен како можен лек за третман на АЛЛ. Во 1956 година биле објавени резултати од клинички студии на животни, кои покажале поголема ефикасност на МТХ-от во однос на аминоптеринот, по што аминоптеринот е напуштен во третманот на АЛЛ.

МТХ-от во доцните 40-ти и раните 50-ти години бил применуван како монотерапија во третманот на АЛЛ. Подоцна, во шеесеттите години е започнато истражувањето на мултиагентна терапија на АЛЛ која и денес се применува со одредени модификации (33).

Но, и покрај овие промени и скоро 66 години по неговата првична примена, во сите протоколи за третман на АЛЛ, метотрексатот (MTX) е еден од круцијалните цитостатици. Во почетокот тој бил применуван во помали дози (под 1g/m^2), но подоцна постепено се зголемувани дозите, така што денес во повеќето протоколи за третман на АЛЛ се препорачуваат високи дози на MTX (5g/m^2). Благодарение на високите дози на MTX и неговата интратекална апликација (воведена 1960 г од страна на Donald Pinkel и сор., St.Judas Children research Hospital) намален е бројот на релапси, посебно релапси во ЦНС и зголемен е процентот на преживување од оваа болест (3, 4, 34).

1.11.3 МЕТОТРЕКСАТОТ ВО ПРОТОКОЛИТЕ НА СТУДИСКАТА ГРУПА БФМ

Во протоколите АЛЛ БФМ 95 и АЛЛ БФМ 2000, MTX-от се применува во дози од 5g/m^2 (сл.5) во тек на фазата на консолидација кај пациентите со стандарден и среден ризик. Предвидени се четири циклуси на високи дози MTX аплицирани парентерално, заедно со интратекална апликација на MTX за профилакса на ЦНС рецидиви.

Gewicht = _____ kg
Größe = _____ cm
KOF = _____ m²

ALL-BFM 2000: Protokoll M

(Bitte Applikationsdaten, Dosis [evtl. Reduktionen] und Komplikationen eintragen)

Klinik: _____
(Stempel)

Name: _____
geb.: _____

6-MP p.o. (56 d) $25\text{mg/m}^2/\text{d}$ = _____ mg/d
(abends)

MTX p.i. (24h) 5.000mg/m^2 = _____ mg/ED
(10% in 0,5 Std., 90% in 23,5 Std.)

LCV-Rescue 15mg/m^2 i.v. Std. 42, 48, und 54

MTX i.th. (1h n. Beginn von MTX-Inf.) = _____ mg
Dosis n. Alter: <1J. 1J 2J ≥3J
MTX i.T. 6mg 8mg 10mg 12mg

Aufgrund eines MRD-Befundes und Stratifizierung
in HR vorzeitiger Abbruch von Prot. M:
☐ Ja; Wann: _____
☐ Nein (letzter Protokolltag in M)

Bitte zusätzlich pro MTX-Kurs einen
Toxizitätsbogen ausfüllen !

Datum der Gabe eintragen

1. MTX		2. MTX		3. MTX		4. MTX	
MTX-Spiegel (µmol/l)	LCV-Rescue (mg)	MTX-Spiegel (µmol/l)	LCV-Rescue (mg)	MTX-Spiegel (µmol/l)	LCV-Rescue (mg)	MTX-Spiegel (µmol/l)	LCV-Rescue (mg)
24h		24h		24h		24h	
36h		36h		36h		36h	
42h		42h		42h		42h	
48h		48h		48h		48h	
54h		54h		54h		54h	
verlängerter Rescue		verlängerter Rescue		verlängerter Rescue		verlängerter Rescue	
☐ ja ☐ nein		☐ ja ☐ nein		☐ ja ☐ nein		☐ ja ☐ nein	
bis Std. _____		bis Std. _____		bis Std. _____		bis Std. _____	

Anhang 3.1.5

Слика 5: Шематски приказ на терапијата со MTX во протоколот АЛЛ БФМ 2000

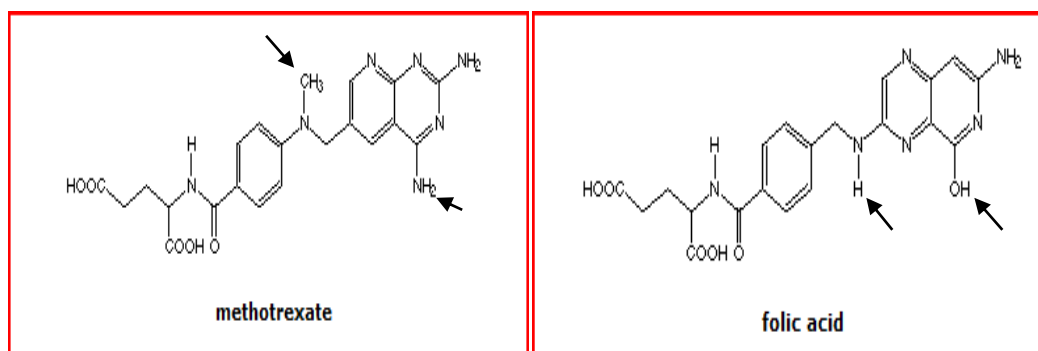
За превенцијата на токсичните ефекти од терапијата со МТХ вклучени се повеќе терапевтски мерки пред почетокот, во текот на апликацијата на лекот и по завршување на терапијата. Пред почетокот на терапијата се врши проценка на бубрежната, хепаталната функција и хематолошкиот статус на детето, а пред започнување на апликацијата на лекот се спроведува прехидрација со алкализација на урината бидејќи МТХ-от подобро се излачува во алкална средина. Потоа паралелно со апликацијата на МТХ-от следи хиперхидрација повторно со додавање на бикарбонати со редовно мониторирање на вредностите на рН на урината како би се одржувала алкална урина. Мониторирањето на нивото на МТХ-от е "condition sine qua non" и е есенциелно за дијагноза и менаџирање на животна загрозувачки состојби кои може да бидат предизвикани од високите дози на МТХ. Нивото на МТХ во крвта се мониторира 24, 36 и 48 часа по започнување на терапијата, а 36 часа по започнување на терапијата со МТХ е предвидена апликација на калциум фолинат, стандардно во три дози, како би се стопирало цитотоксичното дејство на МТХ-от и би се заштитиле здравите клетки кои брзо се делат од понатамошното токсично дејство на МТХ(22).

По завршувањето на терапијата со високи дози на МТХ, продолжува мониторирањето на пациентите како навремено би се дијагностицирале токсичните ефекти од терапијата и би се превземале соодветни терапевтски процедури.

МТХ е исто така дел од последната фаза на протоколот т.н. фаза на одржување кога се аплицира во помали дози перорално и започнува две недели по завршување на интензивниот дел од протоколот (22).

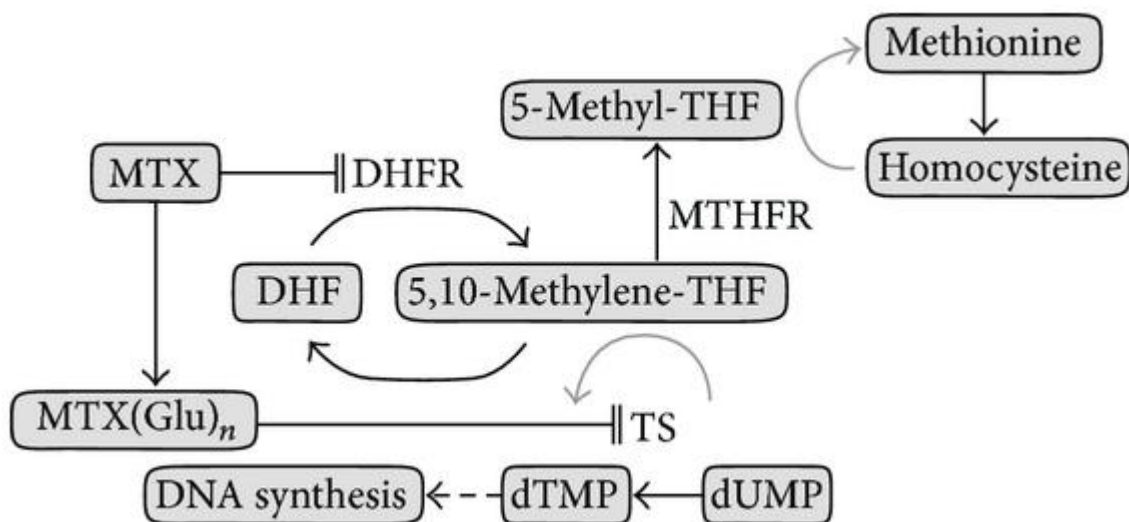
1.11.4 МЕХАНИЗАМ НА ДЕЈСТВО НА МЕТОТРЕКСАТОТ И ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ПРЕДИЗВИКАНИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МЕТОТРЕКСАТ

МТХ-от е антифолатен агенс кој припаѓа на класата антиметаболити. Неговата хемиска структура е многу слична на фолната киселина. Разликата е во тоа што МТХ-от има една метил група повеќе од фолната киселина и наместо хидроксилна група МТХ-от има аминоксидна група во молекулот, така што тој ги користи истите метаболни патишта како и фолната киселина (слика 6) (35),



Слика 6: Хемиска структура на метотрексатот и фолната киселина

Заради оваа сличност, фармакодинамскиот профил на МТХ може да се објасни преку неговата интеракција со ензимите вклучени во фолатниот метаболизам. При екстрацелуларна концентрација на МТХ-от под 20 $\mu\text{mol/l}$ тој влегува во клетката главно преку рецепторот за носачот на редуцираниот фолат (англ. reduce folat carrier receptor – РФЦ1 или SLC19A1) и преку органскиот анјонски транспортер SLC01B1. Потоа со помош на ензимот фолиполиглутамил синтетаза настанува негова полиглутамација во МТХ полиглутамат (МТХПГ). Полиглутамацијата на МТХ овозможува зголемена ретенција на МТХ во клетката. МТХПГ-от претставува силен инхибитор на ензимот дихидрофолат редуктаза (ДХФР) кој е неопходен за конверзија на дихидрофолатот (ДХФ) во тетрахидрофолат (ТХФ). ТХФ е есенцијален за „de novo“ синтеза на пурини, а неговата биолошки активна компонента 5 – метилен тетрахидрофолат (5-МТХФ) е важен фактор во процесите на метилација. Ефикасноста на МТХ-от зависи од функцијата и експресијата на неколку ензими вклучени во фолатниот метаболизам – метилентетрахидрофолат дехидрогеназа (МТХФД1), тимидилат синтетаза (ТС), метилентетрахидрофолат редуктаза (МТХФР) и метионин синтетаза (МС). Споредено со МТХ-от, МТХПГ-от посилно ги инхибира клучните ензими во фолатниот метаболизам, предизвикувајќи намалена метилација на протеините и на ДНК, намалена продукција и репарација на оштетената на ДНК. Нивоата на МТХПГ-от се одржуваат во клетката во поголема концентрација и подолго време отколку нивоата на МТХ-от, неговата разградба зависи од активноста на лизозомалниот ензим гама-глутамил хидролаза кој го катализира отстранувањето на полиглутаматите од клетката. Метотрексатот клетката ја напушта преку АБЦ ефлукс транспортерите. Метаболизмот на МТХ во клетката е прикажан на слика бр.7



Слика 8: Шематски приказ на дејството на МТХ-от. МТХ-от го инхибира фолатниот метаболизам преку два механизми: МТХ-от ја инхибира ДХФР што доведува до деплеција на ТХФ и како последица на тоа се нарушува синтезата на пурины и тимидин. МТХПГ ја инхибира директно ТС што доведува до деплеција на синтезата на ДНК. МТХ: метотрексат, DHFR: дихидрофолат редуктаза, THF: тетраhydrofolat; TS: тимидилат синтетаза; MTHFR: метилен тетраhydrofolat редуктаза; MTX(Glu)_n: МТХ полиглутамат; dTMP: деокситимидин монофосфат; dUMP: деоксиуридин монофосфат.

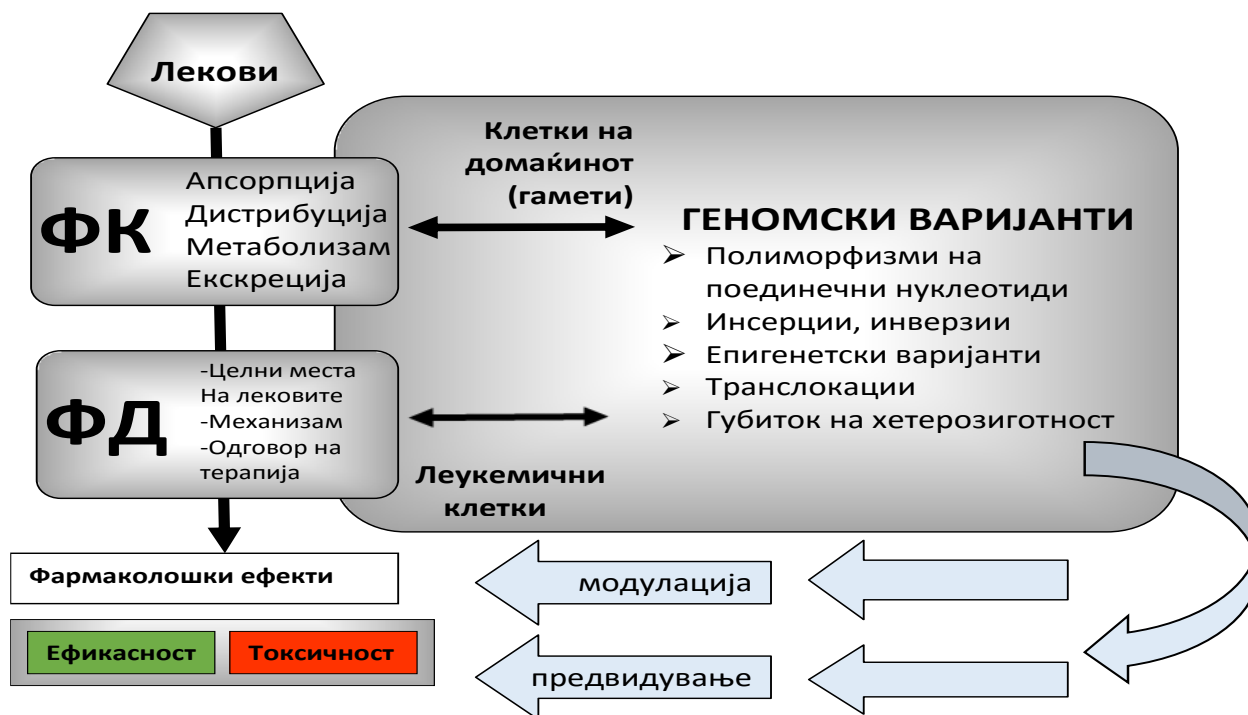
Најчести токсични ефекти при терапија со високи дози на метотрексат се: хепатотоксичност, мукокутанатоксичност, хематолошка токсичност и гастроинтестинална токсичност. Поретко се јавуваат неуротоксичност, пулмонална токсичност и нефротоксичност. Рапортирани се и летални исходи како последица на токсичното дејство на високите дози на метотрексат.

1.12 ИНДИВИДУАЛИЗИРАЊЕ НА ТЕРАПИЈАТА И УЛОГАТА НА ФАРМАКОГЕНЕТИКАТА КАЈ АЛЛ

Пациентите со АЛЛ, во зависност од ризичниот фактор, се третираат со исти медикаменти кои се дозираат на телесната површина. Сепак, одговорот на терапијата е различен кај повеќето пациенти и покрај тоа што сите примаат ист медикамент и иста доза на метар квадратен површина.

Оваа варијабилност може да биде причинета од негенетски фактори како на пример пореметена бубрежна или хепатална функција, надворешни фактори, начин на исхрана и придружно заболување. Во одреден број на случаи (15-30%, во ретки случаи до 95%) генетиката е одговорна за индивидуалните разлики во метаболизмот на лекови и ефектот на терапијата. Генетските разлики може да влијаат на фармакокинетиката и

фармакодинамиката на лековите засегајќи ја нивната ефикасност и токсичност. (сл.8.1)
(36)



Слика 8.1: Влијанието на фармакогенетиката врз ефикасноста
и токсичноста на хемотерапевтските агенси (37)

Во денешно време скоро 90% од децата со АЛЛ можат да бидат излекувани со постоечката терапија. Сè уште се бара подобар третман за сите деца, за овие 90% кои може да бидат излекувани, но се изложени на токсичните ефекти од хемотерапијата, како и за 10% од пациентите кои сè уште не може да се излекуваат (38). Индивидуализирањето на терапијата ветува можност секој пациент да има индивидуално дозирање и посебна шема на лекување и претставува нов тренд во современата детска онкологија (39).

Еден од начините за индивидуализирање на терапијата е мониторирање на концентрацијата и ефикасноста на лекот без да се предизвикаат токсични ефекти т.н. терапевтски прозорец. Друг начин е скринирање на пациентите пред започнување на третманот за веќе познати фармакогенетски фактори, поточно пред започнување на терапијата да се детерминираат генетски маркери кои се вклучени во фармакокинетиката и фармакодинамиката на антилеукемиските агенси.

Генетиката одигра значајна улога во последниве 25 години во третманот на АЛЛ и ветува можност за радикална промена во третманот на АЛЛ во следната деценија преку овозможување на попрецизна дијагностика која ќе води кон индивидуализирање на терапијата (37)

Фармакогенетиката како посебен дел од генетиката, се фокусира на генските варијанти т.н. полиморфизми на гените кои ги кодираат ензимите вклучени во метаболизмот на лекови, целните места на дејствување на лековите и нивните транспортери и на начинот на кој овие генски варијанти во меѓусебна интеракција продуцираат фенотип поврзан со специфичниот медикамент.

Потенцијалните генски полиморфизми би можеле да се користат како предикторни маркери за функционална субкласификација на пациентите со АЛЛ и на тој начин би влијаеле врз природата и интензитетот на третманот. Овие генски маркери би можеле да укажат на нови целни места на делување на медикаментите кои би влијаеле позитивно врз ефектот на терапијата и врз редукција на токсичните ефекти. Конечно, намерата на фармакогенетиката е да востанови полигени модели со кои прецизно би се предвидел одговорот на терапијата и појавата на токсичните ефекти од терапијата за секој пациент поединечно и да ги примени овие модели за персонализирање на тераписките режими со цел да се подобри ефикасноста и сигурноста на терапијата.

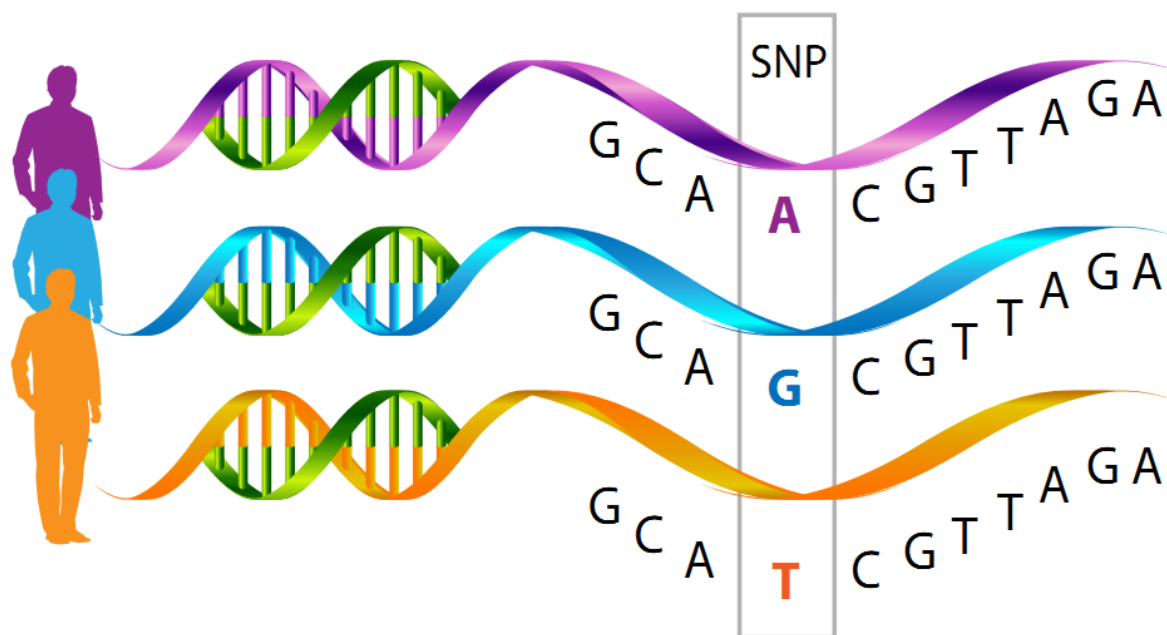
1.12.1 ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ

Полиморфизам е феномен на присуство на алтернативни ДНА секвенци кај две различни индивидуи на ист локус во геномот. Главната база на податоци на СНП содржи повеќе од 12 милиони хумани СНП. Само мал дел од нив, околку 60.000 се лоцирани во кодирачкиот регион на гените и само околку 30.000 од нив предизвикуваат промена на аминокиселини во протеините кои ги кодираат (несинонимни СНП). Промената на аминокиселини во ДНА секвенцата има потенцијал да ја промени функцијата на протеинот чија синтеза ја кодира (37).

Постојат три групи на полиморфизми на ДНА- полиморфизми на поединечни нуклеотиди, делеции/инсерции на делови од ДНА и полиморфизми кои се карактеризираат со различен број на тандемски повторувања.

Полиморфизми на поединечни нуклеотиди (англ. SNP – single nucleotide polymorphisms)

Најчестите наследни варијации во секвенцата на ДНА претставуваат полиморфизмите на еден нуклеотид (СНП) или англ. single nucleotide polymorphism. Тие се карактеризираат со замена на една база со друга база и оваа варијација може да се појави во било кој дел од генот – во промоторниот регион, во кодирачкиот регион или пак во нетранслациониот 3' регион од генот. Овие промени имаат инциденца поголема од 1% и истите можат да имаат значително влијание врз одговорот на терапија на пациентите на одреден медикамент. Сепак одговорот на терапија не зависи само од присуството на СНП на еден ген туку од взаемната интеракција на повеќе генски полиморфизми (40). Пример за полиморфизми на поединечни нуклеотиди е прикажан на слика бр. 9



Слика 9: Шематски приказ на SNP – полиморфизми на поединечните нуклеотиди

Целокупниот наследен материјал (хуманиот геном, кој ги опфаќа сите 46 хромозоми) се состои од околу 3 милијарди нуклеотиди, што значи дека по еден СНП се наоѓа на секои 600 базни парови. Доколку се наоѓаат во генот, заменетите нуклеотиди се препишуваат (транскрибираат) од синџирот на ДНА во ланецот на и-РНА. Во однос на ефектот, замените на нуклеотидите во гените може да бидат синонимни, несинонимни и бесмислени. Синонимната замена на нуклеотидите не доведува до промена на аминокиселината во протеинот при неговата синтеза, што значи не доведува до

промена на функцијата на протеинот, а со самото тоа не доведува до фенотипска промена. Несинонимната промена на нуклеотиди предизвикува замена на аминокиселините во протеинот, а тоа може да доведе до промена на функцијата на протеинот. Бесмислената замена на нуклеотиди воведува т.н. стоп кодон (тоа е кодонот каде завршува синтезата на протеини при нормална транслација) на неодговарачко место што доведува до неадекватно, прерано прекинување на синтезата на протеини што резултира со настанување на нефункционален фрагмент на протеин.

СНП во ист регион на ДНА формираат т.н. хаплотипови (вообичаено тие се оддалечени меѓу себе со помалку од 50 базни парови) и тие се наследуваат заедно. Хуманиот геном е организиран во хаплотипски блокови со висок т.н. linkage disequilibrium (ЛД): тоа се региони со високо ниво на истовремено наследување кои се одделени со региони со низок ЛД (региони со ниско ниво на истовремено наследување). Поради тоа СНП кои се во силен ЛД со фенотипот на болеста или со фенотипот за резистенција на лекови можат да укажат на местото на хромозомот каде суспектниот ген или функционалниот СНП е лоциран, дури и ако полиморфизмот можеби нема да продуцира соодветен фенотип. Проучувајќи го ЛД во хуманиот геном, интернационалниот НАРМАР проект конструирал мапа на хаплотипови на хуманиот геном, битно средство за проучување на комплексни фенотипови како ризик за одредено заболување или одговор на одредени лекови кај различни популации(37).

Полиморфизми од типот делеција/инсерција

Полиморфизмите од овој тип се карактеризираат со тоа што едната негова алелска варијанта содржи одреден сегмент на ДНА (инсерција), додека другата алелска варијанта не го содржи тој сегмент на ДНА (делеција). Доколку делецијата се наоѓа во кодирачкиот регион на генот таа предизвикува синтеза на структурно и функционално изменет протеин.

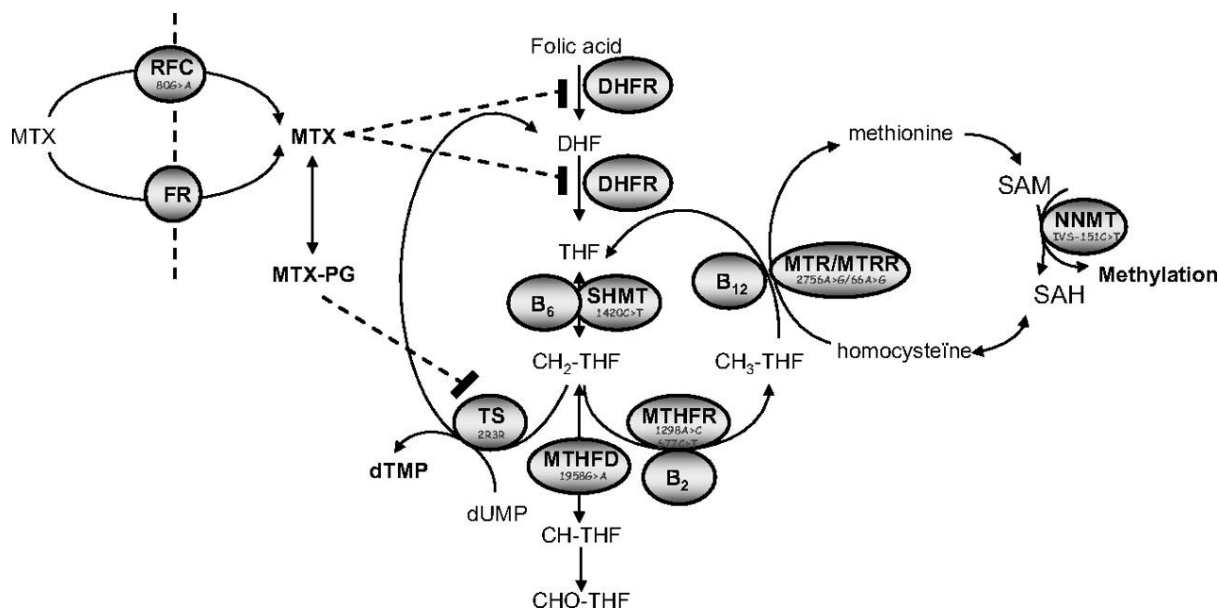
Полиморфизми од типот на различен број на тандемски репетиции – минисателити и микросателити

Тандемските повторувачки секвенци во молекулот на ДНА се познати како мини и микросателити. Минисателитот се состои од секвенца долга 10-60 нуклеотиди (базни парови) кои се повторуваат повеќекратно (тандемски) до неколку стотина пати во одреден регион на ДНА. Микросателитот е сегмент на ДНА до 10 базни парови кои тандемски се повторуваат и до неколку стотина пати. Детекцијата на полиморфизмите

со различен број на тандемски повторувања се користат во процесите на идентификација на луѓето.

1.12.2 ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ

Адекватен внес на фолати е неопходен за делба на клетките и клеточната хомеостаза заради нејзината есенциелна улога како коензим во синтеза на нуклеинските киселини, регенерација на метионин и во транспорт, оксидација и редукција на C1 фрагментите неоподни за нормален метаболизам на клетките. Бидејќи цицачите не можат да ги синтетизираат овие есенциелни кофактори, фолатите мора да се внесат преку исхраната и нивото на фолати во клетката зависи од нивниот внес или од губитокот на фолати преку урина или преку дигестивниот систем. За време на неадекватен фолатен внес или при малапсорпција, настануваат абнормалности во метаболизмот на C1 фрагментите како последица на биохемиски процеси кои се должат на неадекватниот фолатен статус. Овие абнормалности (пр. хиперхомоцистинемија или хипометилација на ДНА) може да доведат до штетни последици, вклучувајќи ризик за одредени хронични заболувања или пореметувања на развојот (пр. дефекти на неуралната туба, кардиоваскуларни заболувања и др.) (41). Дефицитот на фолати е поврзан и со мегалобластна анемија, срцеви заболувања, но исто така е поврзан и со развојот на малигни заболувања. Фолатниот метаболизам може да биде пореметен заради неправилна исхрана, пореметен клеточен транспорт и заради присуството на полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам. Метаболизмот на фолати во клетката е прикажан на слика бр. 10.



Слика 10: Шематски приказ на интрацелуларниот фолатен метаболизам(42)

Folic acid означува фолна киселина, THF - тетраhydrofolat; DHF - дихидроfolat; CH₂-THF - метилен THF; CH₃-THF - метил -THF; SAM - C - аденозилметионин; SAH - C-аденозилхомоцистеин; dTMP - деокситимидин монофосфат; dUMP - деокси уридин монофосфат; TS - тимидилат синтетаза; MTHFR - метилентетраhydrofolat редуктаза; MTHFD - метилентетраhydrofolat дехидрогеназа; MTR - метионин синтетаза; MTRR - метионин синтетаза редуктаза; SHMT - серин-хидроксиметил трансфераза; DHFR - дихидроfolat редуктаза; RFC - носач на редуцираниот фолат; FR - рецептори за фолати и MTG-PG - метотрексат полиглутамат.

Опишани се неколку полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам, но сè уште не се потполно јасни биохемиските последици од присуството на овие полиморфизми (42).

Најчесто иследувани полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам во асоцијација со ризикот за АЛЛ, третманот, исходот и токсичните ефекти од високите дози на MTX се полиморфизмите на генот за ензимот: 5,10- Метилен тетраhydrofolat редуктаза (*MTHFR* 1298A>C и *MTHFR* 677C>T), следат истражувањата на полиморфизмите во засилувачкиот регион на генот за Тимидилат синтетазата (TSER англ. thymidylate synthase enhancer region) и тоа бројот на репетиции во тандем(двојна 2R и тројна репетиција 3R во тандем), потоа полиморфизмите на генот кој го кодира рецепторот преку кој MTX-от влегува во клетката – носачот на редуцираниот фолат (англ. Reduced folate carrier *RFC1* 80G>A), а најмалку се истражувани полиморфизмите на генот за ензимот Метионин синтетазата (*MS* 2756A>G) и полиморфизмите на

ефлуксниот транспортер со помош на кој МТХ излегува од клетката *ABCB1(G2677A/T)*.

1.12.2.1 ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНОТ ЗА ЕНЗИМОТ МТХФР -*MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C*

МТХФР ензимот ја катализира редукцијата на 5,10 метилен тетрахидрофолат(ТХФ) во 5-метил тетрахидрофолат. ТХФ е важен елемент за синтеза на тимидилат и пурины, додека пак 5-метил ТХФ е неопходен за реакциите на метилација. Намалени нивоа на 5,10 метилен ТХФ во клетката може да доведе до нарушена инкорпорација на урацил во ДНК и оштетување на истата, и на тој начин би можела да се зголеми токсичноста на МТХ-от. Присуството на двата најчести полиморфизми на генот за МТХФР: *C677T* и *A1298C* во хетеро и хомозиготна форма ја зголемуваат термолабилноста на ензимот и ја намалуваат неговата активност(43).

MTHFR C677T полиморфизмот се карактеризира со замена на аминокиселината аланин со валин, а кај *MTHFR A1298C* полиморфизмот аминокиселината глицин е заменета со аланин. Во литературата е опишано дека *C677T* генотипот е асоциран со хиперхомоцистинемија, посебно при ниски вредности на фолати во крвта. *A1298C* полиморфизмот е помалку истражуван и се смета дека помалку влијае на активноста на ензимот. Се смета дека фенотипската експресија на овие мутации може да зависи од влијанието на надворешните фактори (најчесто од фолатниот статус) дури и во рамките на иста етничка група(44). Во овој контекст внесот на фолати е од големо значење, бидејки исхраната сиромашна со фолати во комбинација со редуцирана активност на МТХФР ензимот може да ја потенцира клиничката експресија на МТХФР полиморфизмот (45).

MTHFR варијантите *677TT* and *1298CC* имаат улога во развојот на дефекти на неуралната туба и се позитивно асоцирани со кардиоваскуларни заболувања заради зголемените нивоа на хомоцистеин. Асоцијацијата на овие полиморфизми со варијабилан ризик за развојот на малигни болести е прикажан во повеќе студии. Исто така влијанието на полиморфизмите на генот за МТХФР врз ризикот за АЛЛ, појавата на токсичните ефекти од хемотерапијата со високи дози на МТХ, исходот од терапијата на АЛЛ и ризикот за релапс се истражувани во голем број студии, резултатите се сè уште контроверзни.

1.12.2.2 ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНОТ ЗА ЕНЗИМОТ ТИМИДИЛАТ СИНТЕТАЗА(TSER полиморфизам - двојна и тројна репетиција во тандем)

Тимидилат синтетазата (ТС) е ензим кој врши конверзија на деоксиуридилат (dUMP) во деокситимидилат (dTMP), нуклеотиди неопходни за синтезата и репарација на ДНК. ТС е есенциелен ензим за пролиферативните клетки и е исто така важна цел за различни хемотерапевтски агенси. Инхибицијата на ензимот ТС од страна на МТХ полиглутаматот доведува до деплеција на тимидин и предизвикува оштетување на ДНА и клеточна смрт.

Полиморфизмите на генот за ТС може да доведат до промена на функцијата на ензимот, што може да влијае врз предиспозицијата кон малигни заболувања, како и на ефикасноста на третманот и појавата на токсични ефекти во тек на третманот со антифолатни агенси (46).

Еден од најчестите полиморфизми на генот за ТС се полиморфизмите во засилувачкиот регион на генот за тимидилат синтетаза -*TSER* (англ. *TSER thymidilate synthase enhancer region*). Овој полиморфизам за првпат е опишан од страна на Хори во 1995 година(47). Полиморфизмот на *TSER* се карактеризира со двојна 2R/2R или тројна репетиција 3R/3R на 28 базни парови (28 bp) во тандем, при што тројната репетиција се карактеризира со поголема експресија на ТС генот (43).

При присуство на полиморфизми на ТС генот во неговиот засилувачки регион, посебно во случај на тројната репетиција во тандем 3R/3R, заради негова поголема експресија потребни се повисоки дози на МТХ и на неговите метаболити за постигнување на цитотоксичен ефект (47,48,49).

1.12.2.3 ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНОТ ЗА НОСАЧОТ НА РЕДУЦИРАНИОТ ФОЛАТ RFC1 80A>G (SLC19A180)

Транспортот на фолатите во клетките на цицачите се одвива преку рецептори и транспортери или т.н. носачи. Функционалната координација меѓу овие два механизми се смета дека е одговорна за внесот на фолати во клетката. Носачот за редуцираниот фолат РФЦ1 (англ. RFC1 - Reduced folate carrier или Solute carrier family 19-SLC19A1) кај цицачите претставува главен транспортер на редуцираните фолати и игра важна улога во одржување на интрацелуларната концентрација на фолатите.

Метотрексатот е антифолатен хемотерапевтски агенс кој активно се транспортира преку соодветни носачи во клетката. РФЦ1 претставува двонасочен транспортер, со голем капацитет за 5- метил ТХФ и тиамин монофосфат. Мембранскиот транспорт преку РФЦ1 е важна детерминанта на антифолатните агенси кои се применуваат во терапијата на малигни заболувања (пр. МТХ и Томудекс) и нивниот нарушени транспорт преку РФЦ1 често е причина за резистенција кон овие лекови. Губитокот на функцијата на РФЦ1 со голема сигурност може да допринесе до состојби кои се асоцирани со намалена акумулација на фолати (пр. фетални малформации, кардиоваскуларни заболувања и малигни заболувања) (50,51,52,53,54,55)

Најчестиот полиморфизам на генот за РФЦ1 е полиморфизмот RFC1 80A>G кој се должи на замената на гванин со аденин на позиција 80. Како резултат на оваа замена, во структурата на протеинот аминокиселината аргинин е заменета со хистидин. Оваа субституција доведува до намалена експресија на РФЦ1, намалени можности на РФЦ1 за транспорт на фолати и е во корелација со нарушен афинитет на рецепторот за МТХ (28,56,57).

Присуството на RFC1 80A>G полиморфизмот може да влијае врз ризикот за појава на леукемија, концентрацијата на МТХ во плазмата, врз појавата на токсични ефекти од високите дози на МТХ, како и врз исходот од терапијата кај децата со АЛЛ(58).

1.12.2.4 ПОЛИМОРФИЗМИ НА ГЕНОТ ЗА ЕНЗИМОТ МЕТИОНИН СИНТЕТАЗА (MS2756 A/G)

Метионин синтетазата (МС) има значајна улога во метаболизмот на фолати. МС претставува кобаламин зависен ензим кој игра важна улога во синтезата на аминокиселините, градежните елементи на протеините. Ензимот го катализира трансферот на метил групата од 5-метилентетрахидрофолат на хомоцистеинот продуцирајќи при тоа метионин и тетраhydroфолат (59,60). На тој начин игра важна улога во одржување на адекватни нивоа на С- аденозил метионин (САМ) неопходни за метилација на ДНА имајќи при тоа канцер супресорен ефект. Инхибицијата на овој ензим резултира со намалување на нивоата на интрацелуларниот фолат и метионин. Инхибиција на МС доведува до развој на мегалобластна анемија и субакутна дегенерација на медула спиналис. Бидејќи ја ограничува инкорпорацијата на метилентетрахидрофолатот од крвта во клеточните фолатни пулови неопходни за синтеза на нуклеотиди, МС претставува потенцијална цел за хемотерапевтиците (61).

Најчестиот полиморфизам на генот за МС е MS2756 A/G и се карактеризира со замена на нуклеотидот аденин со гванин на позиција 2756 во генот за МС што доведува до замена на аспарагин со глицин во молекулот на ензимот. Иако овој полиморфизам е првпат детектиран кај пациенти со дефицит на МС и кај здрави особи, биолошкото влијание на овој полиморфизам е сè уште недоволно проучено. Објавено е дека присуството на глицинот може да ја промени секундарната структура на протеинот што може да доведе до функционални последици на ензимот водејќи кон промена на нивоата на витамин Б12, на фолатите или хомоцистеинот (59).

Се знае дека тој ја менува активноста на ензимот, предизвикувајќи намалена редукција на хомоцистеинот и пореметена метилацијата на ДНА. Оваа варијанта на генот за МС е асоцирана со дефекти на неуралната туба, Sy Down (genetic home references internet)(62)

Бидејќи намалената функција на ензимот доведува до намалување на интрацелуларните нивоа на метионин и хипометилација на ДНК, се смета дека полиморфизмите на генот за МС може да предизвикаат селективен раст и трансформација на клетките со што може да го модифицираат ризикот за малигни заболувања (59).

1.12.2.5 ПОЛИМОРФИЗМИ НА АБЦБ1 ГЕНОТ (АБЦБ1 G2677A/T)

АБЦБ1 генот ја кодира синтезата на п-гликопротеинот кој има протективна функција, поточно ја штити клетката од штетните хемикалии и метаболити (63).

П – гликопротеинот исто така претставува транспортер одговорен за ефлуксот на лекови од клетката и може да влијае на фармакокинетиката на многу антилеукемични агенси меѓу кои и на метотрексатот. Опишани се повеќе од 50 СНП и три инсерции/делеции полиморфизми на генот за АБЦБ1 транспортерот и некои од нив може да ја изменат експресијата или функцијата на п-гликопротеинот. (64,65). Прекумерната експресија на п-гликопротеинот во туморските клетки доведува до зголемување на резистенцијата на туморските клетки кон антилеукемичните агенси. Исто така полиморфизмите на АБЦБ1 генот може да го зголемат ефлуксот на антинеопластичните агенси од малигните клетки или да ја зголеми нивната елиминација од организмот, намалувајќи ја нивната концентрација во плазмата преку што влијаат на ефикасноста на лекот (66).

Несинонимниот ABCB1 G2677T SNP се карактеризира со замена на аминокиселината аланин со серин или треонин бидејќи три различни нуклеотиди може да се најдат на оваа позиција (G,T или A). Присуството на овој полиморфизам може да ја зголеми (67) или намали функцијата на транспортерот (68).

Достапните податоци во литературата укажуваат дека зголемениот ризик за малигни заболувања може да се должи на полиморфизми во гените кои учествуваат во транспортот и метаболизмот на ксенобиотици меѓу кои спаѓа и п-гликопротеинот. ABCB1 генот кој ја кодира синтезата на п - гликопротеинот содржи бројни полиморфизми кои може да се поврзани со зголемен ризик за АЛЛ, како и со појава на токсични ефекти во тек на терапијата со високи дози на МТХ и со ефикасноста на терапијата на АЛЛ (63,71).

1.12.3 АСОЦИЈАЦИЈАТА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМСО ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД МЕТОТРЕКСАТОТ И СО ТЕРАПИСКИОТ ИСХОД

Иследувањето на генската предиспозиција и разликите во метаболизмот кои влијаат на интериндивидуалната разлика во одговорот на терапијата претставува поле на истражување кое рапидно расте. Фармакогенетиката ги истражува генските полиморфизми кои одговараат на секвенционалните варијации во гените.

Регистрирана е голема варијабилност во фармаколошкиот одговор на пациентите со АЛЛ во тек на третманот со високи дози на МТХ. Објавено е дека кај скоро 20% од пациентите третирани со високи дози на МТХ нема одговор на терапијата(21).

Дополнителен проблем претставува и појавата на токсични ефектикај значителен број на пациенти, вклучувајќи гастроинтестинална токсичност, орален мукозит, покачување на хепаталните ензими, неуротоксичност и хематолошка токсичност кои може да доведат до дисконтинуирање на третманот или дури до летален исход (29). Сепак, одреден број пациенти ја толерираат терапијата со високи дози на МТХ без никакви пропратни нузефекти. Токсичните ефекти асоцирани со терапијата со МТХ се смета дека се во врска со негенетски фактори (влијание на надворешната средина, начинот на исхрана) и со фармакогенетски фактори (72).

Голем број студии се посветени на истражувањето на фармакогенетските фактори кои играат улога во појавата, третманот и исходот од терапијата на леукемијата.

Проучувани се голем број полиморфизми на гени вклучени во метаболизмот на цитостатиците, како и интеракцијата меѓу овие гени и нивната улога во појавата на токсични ефекти од хемотерапијата и крајниот исход од терапијата. Генетската варијабилност на ензимите, на транспортерите и рецепторите вклучени во метаболизмот на лекови може да доведат до изменета индивидуална осетливост на лековите и да влијаат врз токсичноста или ефикасноста на третманот на АЛЛ (28,29,30)

Подобро разбирање на овие асоцијации е значаен предуслов за вклучување на фармакогенетските информации во оптимизирање на терапевските режими.

МТХ е фолатен аналог кој своето дејство го манифестира преку инхибиција на ензимите вклучени во фолатниот метаболизам. Актуелните истражувања се посветени на проучување на генските полиморфизми на клучните ензими и транспортери вклучени во фолатниот метаболизам. Резултатите од овие студии се сè уште контроверзни, во некои студии е потврдена асоцијација на овие полиморфизми со токсичните ефекти од високите дози на МТХ, додека други студии ја негираат. Некои автори сметаат дека различните резултати може да се должат на географските и етничките разлики, големината на испитуваната група пациенти, различната стратификација, апликацијата на различни дози на МТХ, влијанието на надворешните фактори, посебно начинот на исхрана, фолатниот статус на пациентите пред започнување и во текот на хемотерапијата и сл. Сè повеќе автори сметаат дека главната причината за ова се должи на тоа што во најголемиот број студии е истражувано влијанието на поединечните полиморфизми врз токсичните ефекти и терапевскиот одговор, а не е евалуирано истовременото присуство на повеќе полиморфизми кај пациентите и нивното меѓусебно влијание (28,71).

Целта на овие студии е да се откријат прогностички фактори (маркери) кои пред започнување на терапијата со високи дози на МТХ би ги селектирале пациентите со зголемен ризик за манифестација на сериозни токсични ефекти и можен неуспех од терапијата (71, 73, 74, 75, 76)

Сè уште нема дефинитивни резултати кои генски полиморфизми би биле кандидати за фармакогенетски маркери - предиктори на токсичните ефекти, ефикасноста на терапијата, ризикот за појава на леукемија и релапс на болеста.

2 МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ТРУДОТ

Базирајќи се на опсежната анализа на досега познатите литературни сознанија може да се заклучи дека резултатите од студиите посветени на истражувањето на влијанието на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам и исходот од терапијата и токсичните ефекти од истата кај децата со АЛЛ се сè уште контроверзни. Во новите протоколи за третман на АЛЛ предвидена е генотипизација за дел од полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам пред започнување на терапијата.

До сега во Македонија не е вршена генотипизација на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам пред започнување на терапија кај пациентите со АЛЛ, ниту пак е анализирано нивното влијание врз ризикот за појава на леукемија, токсичните ефекти од терапијата со високи дози на МТХ, ЕФС и ризикот за релапс на болеста. Од тука произлезе и мотивот за изработка на едно вакво истражување.

Полето на фармакогенетиката последниве години во светот е главно поле на истражување кое ветува дека во иднина ќе овозможи персонализирање на третманот на пациентите со малигни заболувања, со цел да се постигне нивно излекување и подобар квалитет на живот.

3 ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

1. Анализа на токсичните ефекти од хемотерапијата со високи дози на МТХ кај пациенти со АЛЛ
2. Генотипизација на пациентите со АЛЛ за шест полиморфизмина гените вклучени во фолатниот метаболизам: *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MS2756A>G*, *TS 2R/3R*, *RFC180 A>G (SLC19A1)* и *ABCB1 G2677A/T*
3. Анализа на влијанието на комбинацијата на два или повеќе полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам врз појавата на токсичните ефекти од МТХ
4. Анализа на асоцијацијата на генските полиморфизми и концентрацијата на МТХ по истекување на лекот.
5. Да се утврди корелацијата на секој полиморфизам поединечно со појавата на токсични ефекти од високите дози на МТХ, со ризикот за АЛЛ, ЕФС и релапс на болеста

4 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1 Материјал

Во истражувањето беа вклучени вкупно 108 пациенти. Пациентите беа поделени во 2 групи-контролна и испитувана. Испитувана група се состоеше од 65пациенти со АЛЛ лекувани по протоколот АЛЛ БФМ 95 и АЛЛ БФМ 2000 на Одделот за хематологија и онкологија при ЈЗУ Клиника за детски болести Скопје. Кај нив беше извршена генотипизација за полиморфизмите вклучени во фолатниот метаболизам и нивното влијание врз токсичните ефекти и терапискиот исход. Контролната група се состоеше од 43 здрави пациенти кај кои беше спроведена само генотипизација за полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам.

4.1.1 Критериуми за влучување во студијата

Во истражувањето беа вклучени пациенти со АЛЛ на возраст од 1-14 години, кои ги примиле сите четири циклуси високи дози на МТХ, стратифицирани како пациенти со стандарден ризик СР (англ. SR-Standard risk) и среден ризик МР (англ. MR medium risk) според протоколот АЛЛ БФМ 95 и 2000. Ризикот беше проценет преку следниве параметри:

- бројот на бласти во периферната размаска на осмиот ден(седум дена по започнувањето на кортикотерапија) да е помал од 1000 бласти/микролитар,
- комплетна ремисија (КР) на 33ти ден – морфолошки (M1) или флоуцитометриски
- отсаство на BCR/ABL рекомбинација

4.1.2 Критериуми за исклучување од студијата

Од истражувањето беа исклучени пациенти на возраст под 1 година со АЛЛ и пациенти со АЛЛ стратифицирани како пациенти со висок ризик (овие пациенти се третираат по друг протокол), како и пациенти кои не ги примиле сите четири циклуси високи дози на МТХ од било какви причини.

4.2 Методи на истражувањето

4.2.1 Анализа на болнички истории

Анализирани беа следните податоци од болничките истории

- Пол

- Возраст
- Место на живеење
- Тип на леукемија
- Дата на прием
- ТТ (телесна тежина) и ТВ (телесна висина) на прием
- Вкупен број на леукоцити, тромбоцити и хемоглобин на прием
- Присуство на медијастинална маса на прием
- Присуство на хепатоспленомегалија на прием
- Позитивен одговор на кортикотерапија на осмиот ден од започнување на терапијата (бласти под 1000/микролитар)
- КР на 33 ти ден (цитоморфолошки или флоуцитометриски)
- Ниво на МТХ 24 -от час од започнување на терапијата, односно веднаш по негово истекување
- Појава на релапс на болеста

4.2.2 Анализа на токсичните ефекти

Појавата на токсични ефекти во тек на терапија со високи дози на МТХ беше анализирана поединечно за секој пациент во четирите фази на протоколот М (апликација на високи дози МТХ – 5г/м²), при што беа опфатени 260 циклуси хемотерапија. Токсичните ефекти беа анализирани според критериумите за токсичност од протоколите АЛЛ БФМ 95 и АЛЛ БФМ 2000 кои се пропишани во посебен образец од протоколот (отсуство или присуство на токсичен ефект и негова градација од 1-4).
Прилог бр.1

- хематолошка токсичност (вредности на хемоглобин, гранулоцити, тромбоцити)
- присуство/отсуство на инфекција
- мукозит (орален и интестинален)
- кардиотоксичност (пореметување на ритмот-електрокардиографски и вредностите на ежекционата фракција – ехокардиографски)
- невротоксичност (централна и периферна невротоксичност)
- нефротоксичност (вредности на креатинин и клиренс на креатинин)
- кожна токсичност
- хепатотоксичност

4.2.3 Изолација на ДНА

Од секој пациент по добивање на информирана согласност беа земени 3 mL периферна полна крв со антикоагулант (динатриумова сол на етилендиамин тетраацетат-EDTA·Na₂). Потоа беше изолирана ДНА со стандардна метода на исолување со 5M NaCl. Изолацијата на ДНА беше извршена на ЈЗУ Универзитетска Клиника за детски болести Скопје. ДНА изолатите беа аликвотирани во неколку епрувети, од кои едната се чуваше на +4 до +8 °C и се користеше за анализи, додека останатите се чуваат како резерва во банката на примероци на -18 до -20°C до завршување на студијата.

4.2.4 Генотипизација на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам

Анализите беа извршени во Лабораторијата за молекуларна биологија на Природно-математичкиот факултет во Скопје.

Регионот од соодветниот ген е амплифициран со полимеразна верижна реакција со употреба на соодветен пар олигонуклеотидни прајмери (нарачани од компанијата Sigma-Genosys); термостабилна Taq-полимераза (AmpliTaq Gold од Applied-Biosystems), фабрички подготвен PCR пуфер со магнезиумови јони, смеса од деоксинуклеотиди (dNTP) (сите претходни од Applied-Biosystems) и примерок на ДНА од испитаникот во реакциски епрувети со тенки ѕидови. Користена е PCR-машина (GeneAmpSystem 2400, Perkin-Elmer) со соодветен амплификациски програм. Податоците за нуклеотидната секвенца на олигонуклеотидните прајмери за амплификација, температурата на анилирање, како и очекуваната должина на ампликоните за секој испитуван полиморфизам се прикажани во **табелата 3.1**.

Табела 3.1: Податоци за олигонуклеотидните прајмери и амплификацијата

1. локус	Поли-морфизам	секвенца на олигонуклеотидните прајмери	темп. на анилирање (C°)	ампли-кон(и) (bp)	референца
2. <i>MTHFR</i>	677 C>T	CF: 5-TGC TGT TGG AAG GTG CAA GAT-3	65	226	Poursadegh Zonouzi et al., 2012(77)
		RW: 5-GCG TGA TGA TGA AAT CGG-3			
		RM: 5-GCG TGA TGA TGA AAT CGA-3			
	1298 A>C	F: 5'- ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC -3' R: 5'- GTC TCC CAA CTT ACC CTT CTC CC-3'	51	241	Bagheri et al., 2010(78)
3. <i>TS ER</i>	2R>3 R	F: 5'-AAA AGG CGC GCG GAA GGG GTC CT-3' R: 5' TCC GAG CCG GCC ACA GGC AT 3'	62	2R=116 3R=144	Iacopetta et al., 2001(79)
4. <i>MS</i>	2756 A>G	5'-TGT TCC AGA CAG TTA GAT GAAAAT C-3' 5'-GAT CCAAAG CCT TTT ACA CTC CTC-3'	60	211	Matsuo et al., 2001(80)
5. <i>SLC19A1</i>	80 A>G	F: 5'-AGC GGT GGA GAA GCA GGT-3' R: 5'-GGA GGT AGG GGG TGA TGA AG-3'	61	140	Shaw et al., 2002(81)
6. <i>ABCB1</i>	G267 T/A	FA: 5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTA-3'	touch-down 57 до 55	222	Kurzawski et al., 2006(82)
		FG: 5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTG-3',			
		FT: 5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTT-3'			
		RR: 5'-AGT CCA AGA ACT GGC TTT GC-3'			

Успешноста на амплификацијата е верифицирана со агарозна електрофореза и флуоресцентно бојење на гелот со етидиум бромид. Геловите беа фотографирани под UV-светлина (312 nm) со дигитална камера (*Canon*). Амплификабилноста на изолираната DNA е верифицирана со амплификација на регион од генот за β -глобин.

Дигиталната анализа (идентификација на електрофоретски ленти и определување на нивната должина во базни парови) е вршена со опцијата за анализа на еднодимензионални гелови на софтверот ImageJodNIH.

За потврдување на веродостојноста и репродуцибилноста на PCR и на рестрикциските анализи, околу 20% од примероците по случаен избор беа подложени на повторна анализа. Притоа, резултатите од повторените анализи целосно се совпаднаа со претходно извршените.

Полиморфизмот 677 C>T во генот *MTHFR* е определен само со амплификација со методот ARMS (од англ.: amplification resistant mutational system) при што користењето на комбинации на олигонуклеотидните прајмери (RW или RM со заедничкиот прајмер CF) го детерминираат амплифицирањето на 226 bp-електрофоретска лента која одговара на алел со цитозин или тимин на критичната нуклеотидна позиција 677 во генот (77).

Користен е следниов амплификациски програм: иницијална денатурација на 94°C во текот на 2 мин., по што следат триесет и пет циклуси од по три фази: денатурација на 94°C во текот на 30 сек., анилирање на 59°C во текот на 30 сек. и екстензија на 72°C во текот на 30 сек. По завршувањето на последниот циклус, извршена е финална екстензија при 72°C во текот на 10 мин.

Полиморфизмот 1298 A>C во генот *MTHFR* е анализиран со PCR-амплификација и последователна рестрикциска анализа (RFLP) со ендонуклеазата *Mbo*II која пресекува при постоење на аденин во полиморфната нуклеотидна позиција 1298 (78).

По дигестијата и електрофорезата, кај примероците со хомозиготен див генотип (AA) ензимот *Mbo*II пресекува на едно асиметрично место и се прикажуваат две ленти: 204 и 37 bp, кај хетерозиготите (AC) три ленти: 241, 204 и 37 bp, додека кај хомозиготите за варијантниот генотип (CC) ензимот воопшто не пресекува и се прикажува само една лента со должина од 241 bp.

Полиморфната промена на бројот на 28-bp репетиции во тандем 2R>3R во засилувачкиот (енхенсерен) регион (ER) на генот *TSe* е определувана со PCR-амплификација на регион од генот и анализа на должината на добиените ампликони (79). Во PCR-смесата е додаден и диметилсулфоксид (DMSO), според препораките опишани во референцата, а употребен е следниов амплификациски програм: иницијална денатурација на 94°C во текот на 5 мин., по што следат триесет и два циклуси од по три фази: денатурација на 94°C во текот на 40 сек., анилирање на 62°C во текот на 40 сек. и екстензија на 72°C во текот на 2 мин. По завршувањето на последниот циклус, извршена е финална екстензија при 72°C во текот на 10 мин.

Со оглед на тоа што должината на репетитивната секвенца во овој ген е долг 28 базни парови (bp), алелот 2R е со должина од 116bp, а алелот 3R со 144 bp.

Полиморфизмот 2756 A>G во генот *MSe* анализиран со PCR-амплификација и последователна рестрикциска анализа со ендонуклеазата *HaeIII* која пресекува при постоење на гуанин во полиморфната нуклеотидна позиција 2756 (80).

Со дигестија на амплификатите со ензимот *HaeIII* и последователната електрофореза, кај примероците со хомозиготен див генотип (AA) ензимот не пресекува и се прикажува само една лента: 211 bp, кај хетерозиготите (AG) две ленти: 131 и 80 bp, додека кај хомозиготите за варијантниот генотип (GG) се прикажуваат три ленти со должина: 211, 131 и 80 bp.

Полиморфизмот 80 A>G во генот *SLC19A1* е определуван со амплификација и последователна RFLP анализа со ендонуклеазата *HhaI* која пресекува при постоење на гуанин во полиморфната нуклеотидна позиција 80 (81).

По дигестијата и електрофорезата, кај примероците со хомозиготен див генотип (AA) ензимот *HhaI* не пресекува и се прикажува само една лента: 140 bp, кај хетерозиготите (AG) три ленти: 140, 80 и 60 bp, додека кај хомозиготите за варијантниот генотип (GG) се прикажуваат две ленти со должина: 80 и 60 bp.

Полиморфизмот G2677T/A во генот *ABCB1* е определен со алелно-специфична амплификација (82). За секоја од трите можни алели користен е специфичен прајмер (FG, FT и FA) во посебна реакциска епрувета, а со заеднички реверзен прајмер (RR).

Генотипот е определуван според појавата на специфичниот ампликон (комбинација на алелите: G, A или T) со должина од 222 bp. При секоја амплификација, користена е и внатрешна контрола со која се амплифицира лента за верификација на амплификацијата и има должина од 353 bp.

4.2.5 Статистичка анализа на податоците

Статистичките анализи се вршени софтверски со користење на софтверските додатоци XLSTAT 2015 и RealStatistics 2015 инсталирани на Microsoft Excel 2013.

Применувани се дескриптивни статистички методи со табеларен и графички приказ на податоците и резултатите, додека атрибутивните серии се анализирани со определување на коефициентите на односи, пропорции, фреквенции и определување на статистичката значајност на разликите. За сигнификантни се сметани вредностите на p помали од 0,05.

Според генотиповите на шесте испитувани полиморфизми, анализирани се порпорциите на случаи со токсични епизоди од разни клинички типови (депресија на коскена срцевина, хепатотоксичност и слични) и со различни категории (отсуство, лесна, умерена, тешка и екстремна) при третманот на пациентите со метотрексат.

Поврзаноста на присуството на дивiot тип од определен полиморфизам, како и на хетерозиготните и варијантните генотипови со определен токсичен ефект е анализирана со Fisher-овиот егзактен тест. Поради отстапување од нормалната дистрибуција, споредбата на концентрациите на метотрексатот со генетските податоци од пациентите е вршено со непараметрискиот двонасочен Mann-Whitney U-тест. Релативниот ризик - *Relative Ratio*, како и односот на шанси - *Odds Ratio* се пресметувани од поврзаноста на соодветен полиморфизам со определен токсичен ефект или друг клинички-релевантен параметар при интервали на доверливост (CI од англ. *Confidence Interval*) од 95%, односно при $p < 0,05$.

Поради релативно малиот број на испитаници во групата, не се вршени статистички анализи за споредба на кривите на преживување меѓу подгрупите на пациенти со различни генотипови.

Покрај тоа, добиените податоци од генотипизација на предвидените полиморфизми кај ДНА примероците од секој пациент се обработени со популациско-генетски аналитички методи. Ваквите популациско-генетските пресметки се вршеа со додатокот GenAlEx 6.5 (83) инсталиран на Microsoft Excel 2013. Определени беа испитуваните, наспроти очекуваните, фреквенции на алелите и генотиповите. За проценка на подобноста на испитуваната група пациенти за популациско-генетски анализи пресметани беа: Харди-Вајнберговата рамнотежа, опсервираната и очекуваната хетерозиготност, F-статистичките параметри (основниот F-индекс на фиксација, како и дериватните фиксациски индекси: F_{ST} , F_{IT} и F_{IS}). Со овие параметри беше проверена генетската избалансираноста на испитуваната популација што е важно за веродостојноста на анализите.

5 РЕЗУЛТАТИ

Студијата беше спроведена на вкупно 108 испитаници поделени на две групи на испитаници: група на 65 педијатриски пациенти со АЛЛ третирани со високи дози на метотрексат и контролна група составена од DNA примероци од 43 здрави лица. Од првата група на испитаници беа анализирани клиничките, лабораториските и молекуларно-генетските податоци, додека од контролната група само молекуларно-генетските податоци.

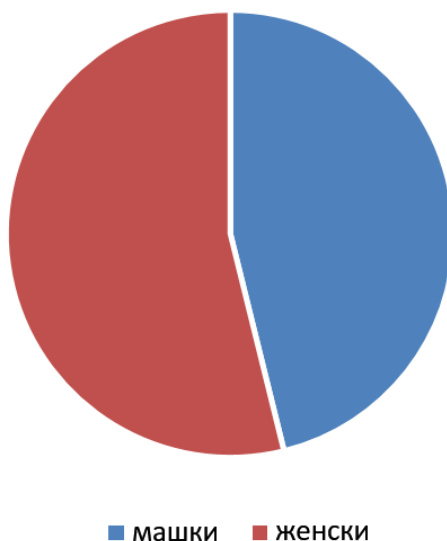
5.1 Демографски податоци за групата на пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

Полова структура

Групата на пациенти со АЛЛ вклучуваше вкупно 65 пациенти, од кои 30 (46,15%) беа машки, а 35 (53,85%) женски деца. Половата застапеност на испитуваната група пациентите прикажана во **табелата 4.1**, како и на **графиконот 4.1**.

Табела 4.1: Податоци за полот на испитуваната група пациенти со АЛЛ

ПОЛ	п	%
машки	30	46,15
женски	35	53,85
вкупно	65	100,00



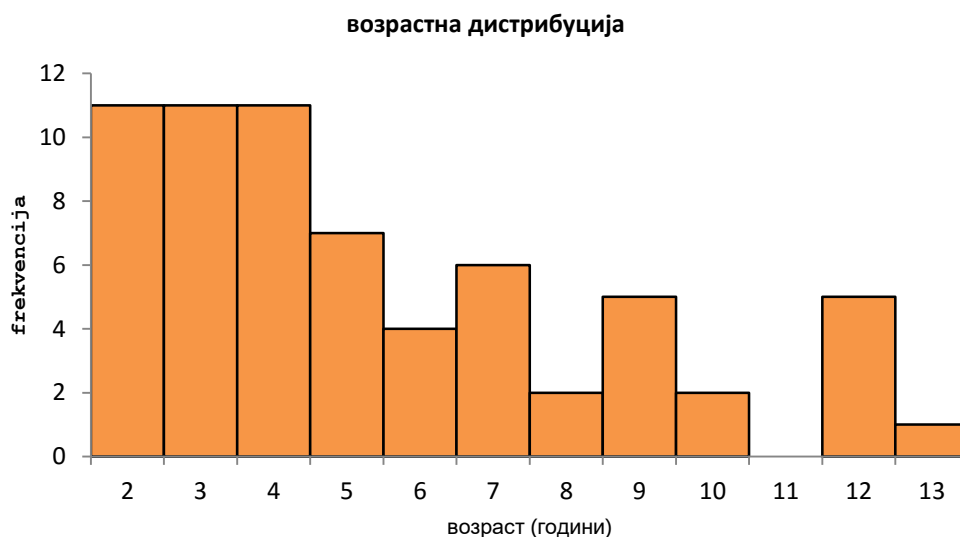
Графикон 4.1: Графички приказ на половата застапеност на испитуваната група пациенти со АЛЛ

Возрастна структура

Просечната возраст на пациентите со АЛЛ беше $62,82 \pm 37$ месец , ($5,2 \pm 3,2$ години), односно во опсег од 14-156 месеци (1,2-13 години). Возрастната структура на испитуваната група е прикажана во **табелата 4.2**, како и на **графиконот 4.2**.

Табела 4.2: Податоци за возраста на испитуваната група пациенти со АЛЛ

параметри	месеци	години
просечна возраст	62,82	5,2
минимална возраст	14	1,2
максимална возраст	156	13,0
стандардна девијација	37,81	3,2



Графикон 4.2: Хистограм со приказ на возрастната структура на испитуваната група пациенти со АЛЛ

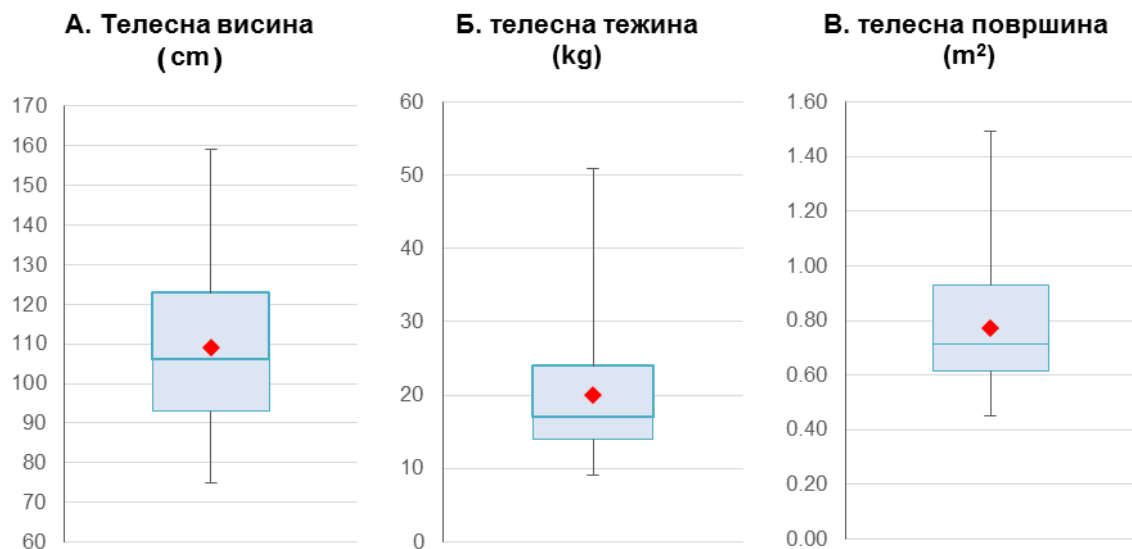
Во однос на возраста најголем број на пациенти беа дијагностицирани на возраст од 2-5 години.

Телесни карактеристики

Податоците за основните телесни карактеристики на пациентите со АЛЛ се прикажани во **табелата 4.3**, како и на **графиконот 4.3**.

Табела 4.3: Податоци за телесните карактеристики на испитуваната група пациенти со АЛЛ

Параметри	тел. висина (cm)	тел. тежина (kg)	тел. површина (m ²)
просечна вредност	108,95	19,96	0,77
минимална вредност	75,00	9,00	0,45
максимална вредност	159,00	51,00	1,49
стандардна девијација	20,57	9,03	0,24



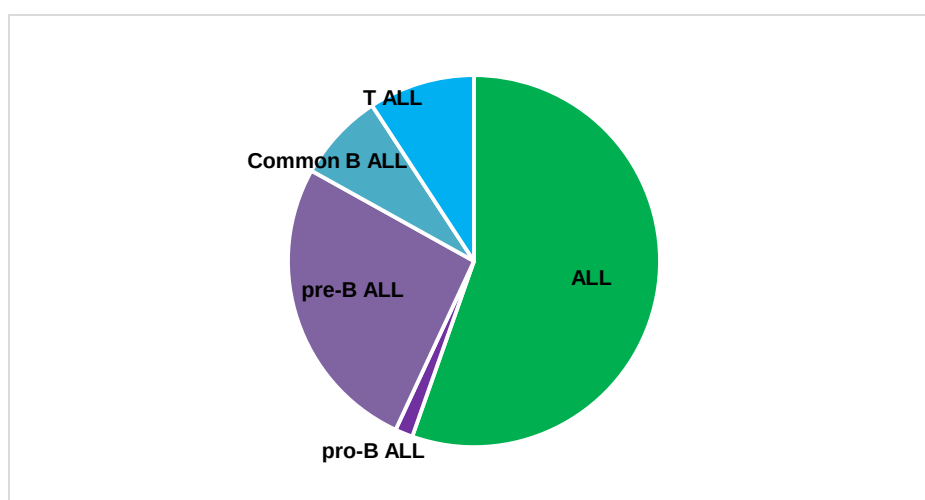
Графикон 4.3: Приказ на просечните вредности на телесните карактеристики: **А.** висина, **Б.** тежина и **В.** Телесна површина, кај испитуваната група пациенти со АЛЛ со *box-and-whiskers* графикони. Долниот раб од секоја правоаголна структура одговара на првиот квинтил (25. перцентил), а горниот раб на третиот квинтил (75. перцентил) на вредностите и ги опфаќа средните 50% од сите мерења. Хоризонталната линија низ секоја правоаголна структура ја прикажува медијаната (геометриската средина), додека црвениот симбол на ромб го означува просекот (аритметичка средина). Вертикалните позитивни и негативни отсечки се однесуваат на дистрибуцијата на екстремните максимални и минимални отстапувања на мерењата коригирани со третиот и со првиот квинтил, соодветно

5.2 Клинички и клиничко-лабораториски податоци за групата на пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

Кај сите пациенти од испитуваната група поставена е дијагноза на акутна лимфобластна леукемија (АЛЛ). Во зависност од цитоморфологијата и, во дел од случаите, имунофенотипизациските анализи, идентифициран е и попрецизниот клеточен поттип (табела 4.4 и графикон 4.4).

Табела 4.4: Дистрибуција на дијагностичкиот поттип кај испитуваната група пациенти со АЛЛ

дијагностички поттип		п	%
АЛЛ без имунофенотипизација		36	55,38
Б-клеточна линија	pro-B-ALL	1	1,54
	pre-B-ALL	17	26,15
	Common B-ALL	5	7,69
Т-клеточна линија	T-ALL	6	9,23
вкупно		65	100,00



Графикон 4.4: Приказ на застапеноста на дијагностичкиот поттип кај испитуваната група пациенти со АЛЛ.

Кај 36 пациенти (55,38%) поставена е дијагноза на АЛЛ без имунофенотипизација и натамошно допрецизирање на клеточниот поттип заради техничка инсуфициентност. Кај 29 пациенти (44,62%) беше извршена имунофенотипизација со флоуцитометрија, при што најзастапен имунофенотип беше пре Б АЛЛ кај 17 пациенти (26,15%), следи комон Б АЛЛ кај 5 пациенти (7,69%) и про Б кај 1 пациент (1,54%). Кај преостанатите 6 пациенти (9,23%) идентифицирана е Т-АЛЛ.

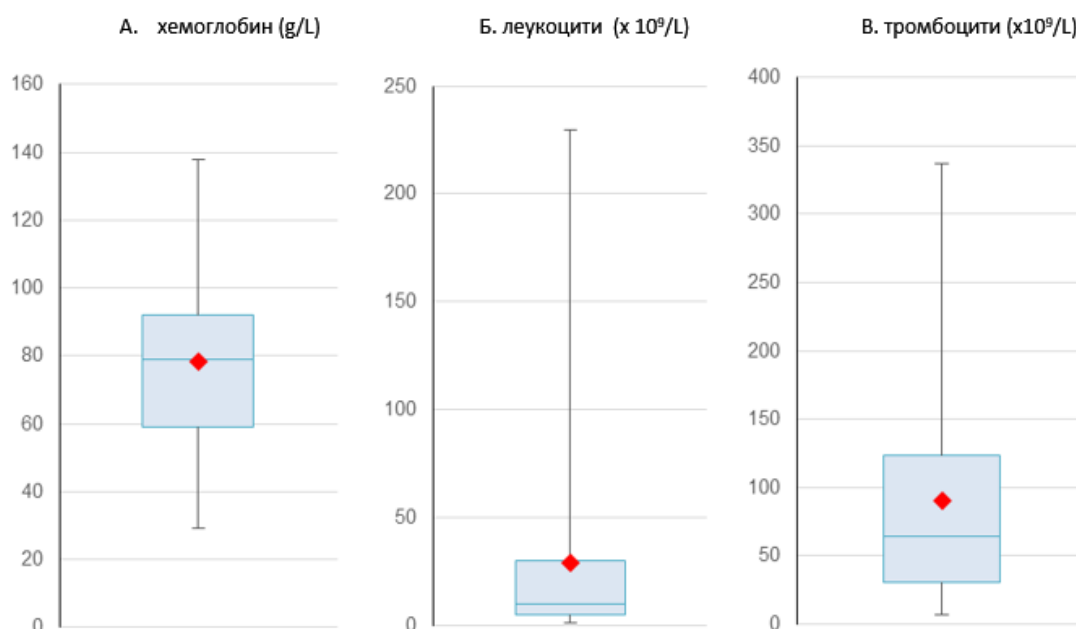
Хематолошки параметри

Статистички обработените податоци од вредностите на основните параметри на крвната слика (хемоглобин, леукоцити и тромбоцити) определени при поставување на дијагнозата кај сите 65 пациенти соАЛЛ се прикажани во табела 4.5 и графикон 4.5

Табела 4.5: Податоци за вредностите на хемоглобинот, леукоцитите и тромбоцитите во периферната крв при поставување на дијагнозата кај испитуваната група пациенти соАЛЛ

Параметар	хемоглобин (g/L)	леукоцити ($\times 10^9/L$)	тромбоцити ($\times 10^9/L$)
просечна вредност	78,51	29,10	90,82
минимална вредност	29,000	1,300	6,60
максимална вредност	138,00	230,00	337,00
Медијана	79,00	10,10	64,00
Варијанса	607,79	2171,60	6725,26
стандардна девијација	24,65	46,60	82,01

Просечната вредност на хемоглобинот при поставување на дијагнозата изнесуваше $78,51 \pm 24,65$ (g/L), просечната вредност на леукоцитите $29,10 \pm 46,60$ ($\times 10^9/L$), а на тромбоцитите $90,82 \pm 82,0$ ($\times 10^9/L$)



Графикон 4.5: Приказ на вредностите на А. хемоглобинот, Б. леукоцитите и В. тромбоцитите во периферната крв при поставување на дијагнозата кај пациенти со АЛЛ прикажани со *box-and-whiskers* графикони. Описот на овој тип на приказ е даден во легендата на **графиконот 4.3**.

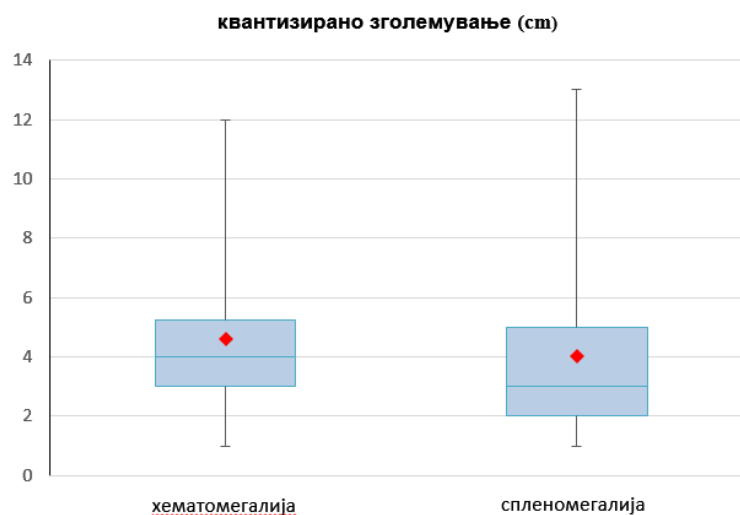
Клинички податоци

Определени клинички и клиничко-лабораториски податоците од пациентите со АЛЛ кои се релевантни за болеста се прикажани во **табелата 4.6**.

Табела 4.6: Податоци заопределени клинички параметри при поставување на дијагнозата кај испитуваната група пациенти соАЛЛ

параметар	позитивни		негативни		вкупно	
	п	%	п	%	п	%
медијастинална маса	9	13,85	56	86,15	65	100,00
хепатомегалија	44	67,69	21	32,31	65	100,00
спленомегалија	43	66,15	22	33,85	65	100,00
невролеукемија	1	1,54	64	98,46	65	100,00

Хепатомегалија и спленомегалија беа присутни кај 44, односно 43 деца, соодветно, што соодветствува на околу две третини од сите пациенти. Квантитативните вредности од мерењата на зголемувањето на црниот дроб и на слезенката се прикажани на **графиконот 4.6**.



Графикон 4.6: Приказ на статистички обработените вредности за **А.** хепатомегалија и **Б.** спленомегалија при поставување на дијагнозата кај пациенти со АЛЛ прикажани со *box-and-whiskers* графикони. Описот на овој тип на приказ е даден во легендата на **графиконот 4.3**.

При поставувањето на дијагнозата, медијастинална маса е утврдена кај 9 пациенти, а кај само кај едно дете е идентифицирана инвазија на централниот нервен систем со леукемични клетки (невролеукемија).

Концентрација на метотрексат во плазмата

Во текот на терапијата со метотрексат доза од 5g/m^2 , аплицирана во 4 последователни дози, определувана е концентрацијата на овој хемиотерапевтик во серумот веднаш по истекувањето на секоја доза кај сите 65 педијатриски пациенти од испитуваната група со АЛЛ. Од вкупно успешно направени 260 мерења на концентрациите на метотрексат во плазмата кај сите 65 пациенти, недостасуваат податоци за 14 мерења, што претставува 5,38% од вкупниот број анализи и истите се земени во предвид при статистичката обработка на податоците.

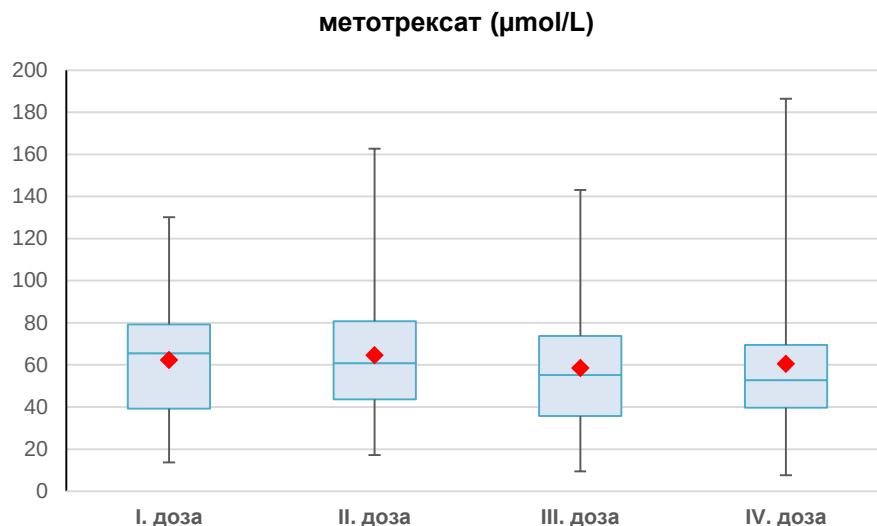
Вредностите и податоците добиени со нивната статистичка анализа се прикажани во табелата 4.7 и на графиконот 4.7.

Табела 4.7: Дескриптивни параметри од вредностите на метотрексат определени во плазмата по секоја аплицирана доза кај групата пациенти со АЛЛ

Параметар ¹	I.доза MTX	II.доза MTX	III.доза MTX	IV.доза MTX
просечна вредност	62,34	64,62	58,51	60,58
минимална вредност	13,64	17,13	9,46	7,62
максимална вредност	130,18	162,69	143,10	186,46
медијана	65,61	60,80	55,13	52,82
варијанса	797,56	859,19	965,29	1311,24
стандардна девијација	$\pm 28,24$	$\pm 29,31$	$\pm 31,07$	$\pm 36,21$

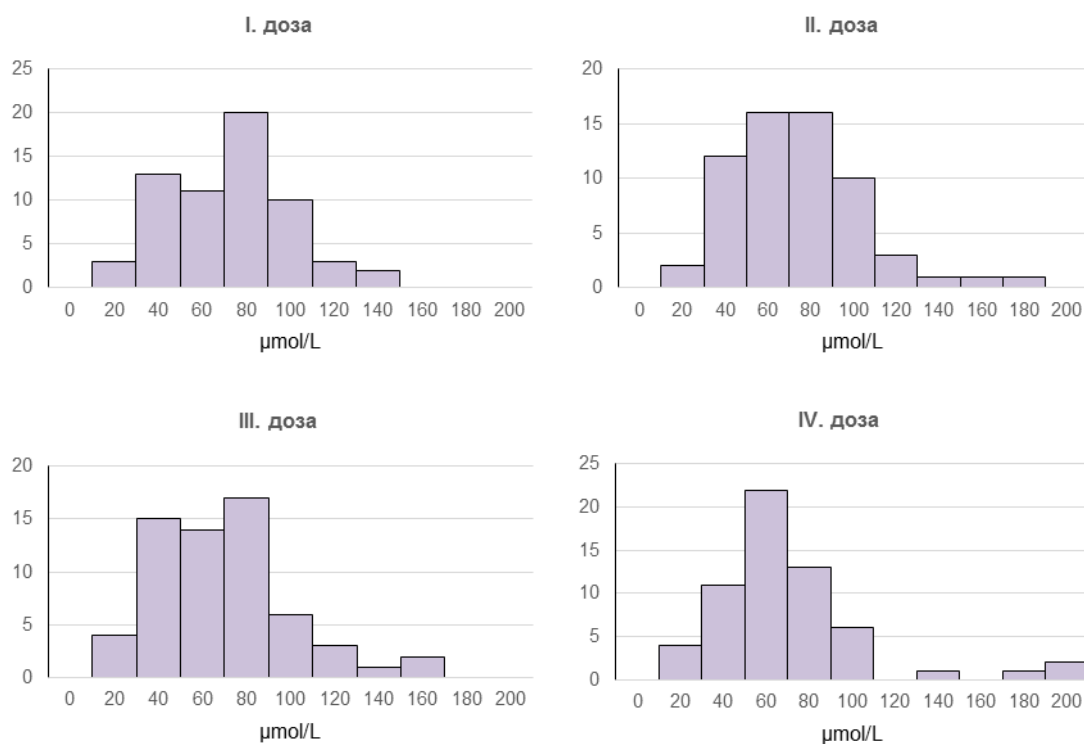
1 – вредностите на метотрексат се изразени во $\mu\text{mol/L}$. Секоја колона се однесува на истата група пациенти

Просечните вредности на концентрацијата на MTX веднаш по истекувањето на лекот, по првиот циклус на терапија изнесуваа $62,34 \pm 28,24 \mu\text{mol/L}$, по вториот циклус $64,62 \pm 29,31 \mu\text{mol/L}$, после третиот циклус $58,51 \pm 31,07$ и по четвртиот циклус $60,58 \pm 36,21 \mu\text{mol/L}$.



Графикон 4.7: Приказ на вредностите на метотрексат во плазмата кај групата пациенти со АЛЛ измерени по секоја доза прикажани *box-and-whiskers* графикони. Описот на овој тип на приказ е даден во легендата на **графиконот 4.3**.

Распределбата на измерените просечни вредности на метотрексат во плазмата на пациентите по секоја примена доза е прикажана во форма на хистограми во **графиконот 4.8**.



Графикон 4.8: Хистограми на дистрибуција на фреквенциите на вредностите од концентрациите на метотрексат во плазмата кај пациентите со АЛЛ по секоја примена доза

Токсични ефективно тек на терапијата со високи дози на метотрексат

Регистрираните токсични ефекти во тек на терапијата со високи дози на метотрексат и во периодот по него се прикажани во **табелата 4.8** и на **графиконот 4.9**. Овие вредности се однесуваат на постоењето на соодветниот ефект независно од клиничката изразеност, односно од градусот. Притоа, збирот на поединечниот број на пациенти со определен тип на компликација е поголем од вкупниот број на третирани пациенти (n=65) поради појавата на различни компликации кај еден ист пациент истовремено. Истото се однесува и на пресметки на процентната застапеност.

Табела 4.8: Преглед на регистрираните токсични ефекти од кој било степен кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

Тип на компликацијата	n	% ¹
хепатотоксичност	39	60,00
депресија на коскена срцевина	31	47,69
неутропенија	31	47,69
анемија	25	38,46
орален мукозитис	23	35,38
тромбоцитопенија	18	27,69
алергија	6	9,23
интестинален мукозитис	5	7,69
централна невротоксичност	2	3,08
периферна невротоксичност	2	3,08
кардиотоксичност	2	3,08
хеморагичен синдром	2	3,08
артериска хипертензија	1	1,54
дерматитис	1	1,54
нефротоксичност	1	1,54

Според податоците прикажани и во табеларната и во графиконската форма се забележува дека најчестите токсични ефекти во текот и по терапијата со метотрексат во групата од 65 пациенти со АЛЛ се хепатотоксичноста кај повеќе од половината пациенти, како и депресијата на коскената срцевина манифестирана со редукција на хемоглобинот и неутрофилните гранулоцити кај приближно половина од групата.

¹збирот на вредностите (апсолутен број и на проценти) е поголем од вкупниот број на пациенти

Тромбоцитопенијата се јавува кај нешто повеќе од една четвртина од оваа група пациенти третирани со метотрексат. Останатите токсични ефекти се јавуваат кај помалку од 10% од пациентите, но некои од нив се со сериозни клинички импликации или може да доведат до животозагрозувачки состојби.



Графикон 4.9: Приказ на фреквенциите на регистрираните токсични ефекти кај групата од 65 педијатриски пациенти со ALL третирани со метотрексат

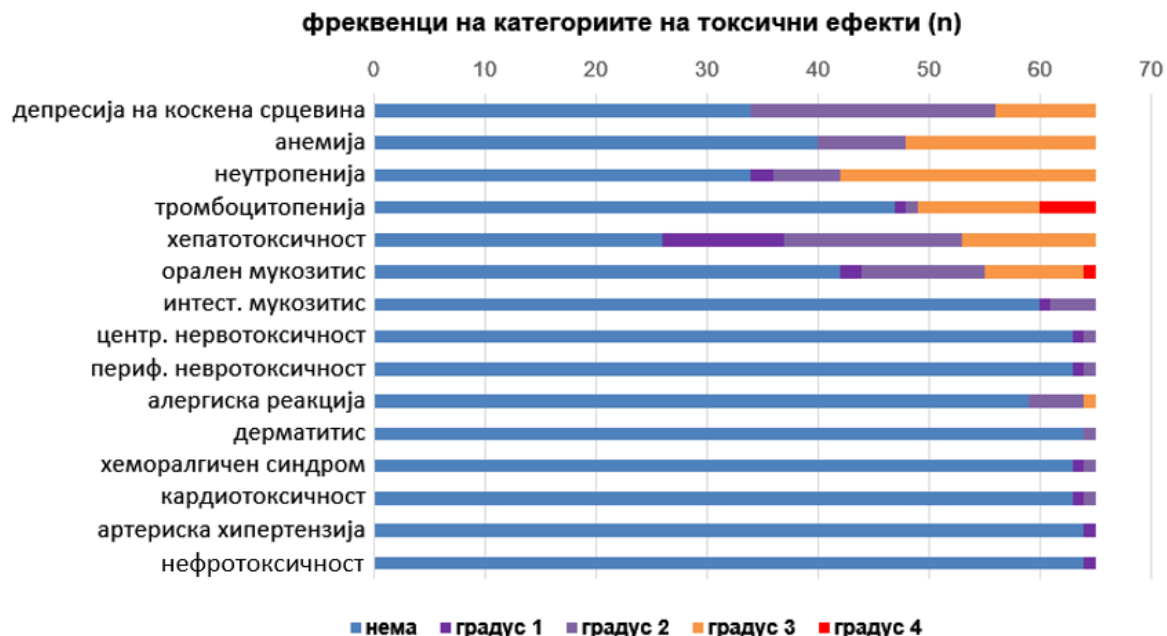
Покрај регистрирањето на присуството на одделните токсични ефекти преку опишаните клинички состојби, истите се следени и семиквантитативно, односно преку категориjsки величини означени како градуси. Притоа, градусот 0 се однесува на отсуство на токсичниот ефект, градусот 1 одговара на слаба изразеност на соодветниот токсичен ефект или состојба, градусот 2 на умерено изразен, градусот 3 на силно изразен и градусот 4 на екстремно изразентоксичен ефект кој може да претставува животозагрозувачка состојба за пациентот. На пример, при одредувањето на степенот на изразеност на инфекцијата при третманот со метотрексат, градусот 1 се однесува на блага инфекција, гр.2 на средна инфекција, неидентифициран патоген, 3 натешка инфекција, идентифициран патоген, а градусот 4 на животозагрозувачка инфекција.

Во табелата 4.9 и на графиконот 4.10 се прикажани категориjsките вредности за секоја од следните токсични ефекти.

Табела 4.9: Дистрибуција на регистрираните токсични ефекти според степенот кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

тип на токсичен ефект	воопшто не се појавиле		Градус ¹ 1		градус 2		Градус 3		градус 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
депрес. на коск. срц.	34	52,31	0	0,00	22	33,85	9	13,85	0	0,00
анемија	40	61,54	0	0,00	8	12,31	17	26,15	0	0,00
неутропенија	34	52,31	2	3,08	6	9,23	23	35,38	0	0,00
тромбоцитопенија	47	72,31	1	1,54	1	1,54	11	16,92	5	7,69
хепатотоксичност	26	40,00	11	16,92	16	24,62	12	18,46	0	0,00
орален мукозитис	42	64,62	2	3,08	11	16,92	9	13,85	1	1,54
интест. мукозитис	60	92,31	1	1,54	4	6,15	0	0,00	0	0,00
центр. невротокс.	63	96,92	1	1,54	1	1,54	0	0,00	0	0,00
периф. невротокс.	63	96,92	1	1,54	1	1,54	0	0,00	0	0,00
алергиска реакција	59	90,77	0	0,00	5	7,69	1	1,54	0	0,00
дерматитис	64	98,46	0	0,00	1	1,54	0	0,00	0	0,00
хемораг. синдром	63	96,92	1	1,54	1	1,54	0	0,00	0	0,00
кардиотоксичност	63	96,92	1	1,54	1	1,54	0	0,00	0	0,00
арт. хипертензија	64	98,46	1	1,54	0	0,00	0	0,00	0	0,00
нефротоксичност	64	98,46	1	1,54	0	0,00	0	0,00	0	0,00

1 – степен на изразеност на токсичниот нулефект: градус 1 =слабо изразен; градус 2= умерено изразен; градус 3 =силно изразен и градус4 = екстремно изразен - животозагрозувачка состојба

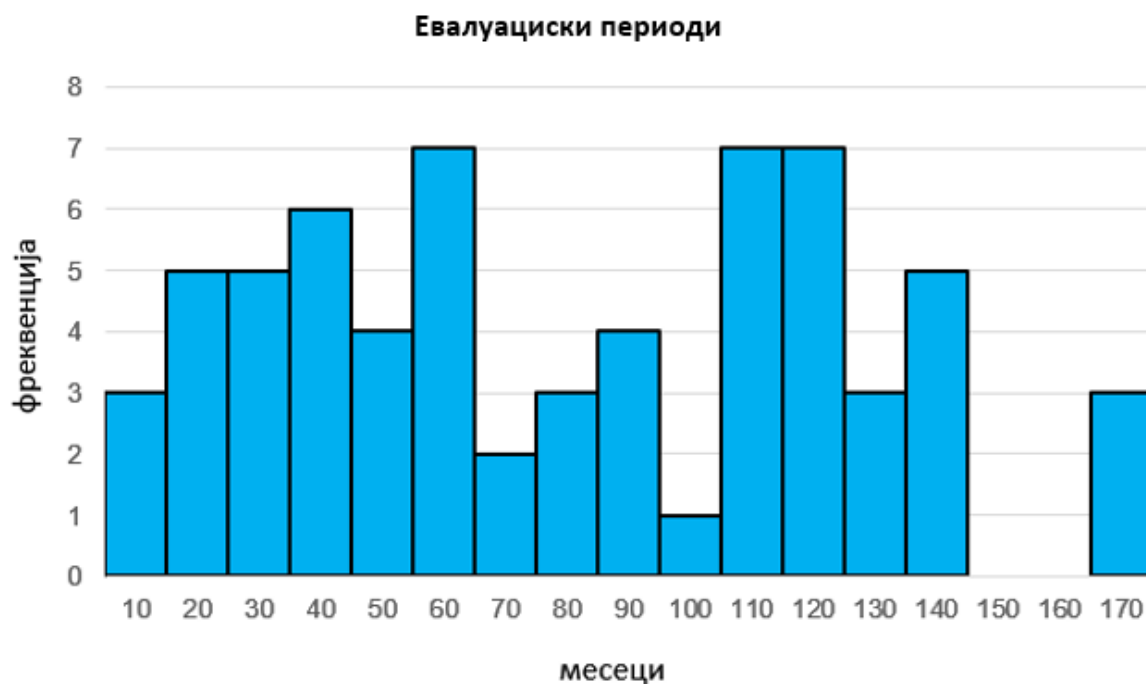


Графикон 4.10: Приказ на фреквенциите на регистрираните токсични ефекти според степенот кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

Од вкупно 189 епизоди на токсичност во тек и по завршување на терапијата со високи дози на МТХ, 82 (43,3%) епизоди на токсичност беа од трет степен, следат 78 (41,2%) епизоди на токсичност од втора степен, потоа 23 (12,1%) епизоди на токсичност од прва степен и 5(9,45%) епизоди на токсичност од најтежок, четврти степен. Тромбоцитопенијата (во пет циклуси на високи дози на МТХ) беше најзастапен токсичен ефект од четврти степен, додека најчесто манифестирани токсични ефекти од трет степен беа неутропенијата (во 23 циклуси), следеа анемијата (во 17) и хепатотоксичноста (во 12 циклуси).

Клинички исход од лекувањето

Пациентите со АЛЛ клинички се следени континуирано од поставувањето на дијагнозата, па сè до комплетирањето на периодот на следење, до леталниот исход или губењето на контактот со пациентот. Дистрибуцијата на временските интервали на следење на сите 65 педијатриски пациенти соАЛЛ е прикажана со хистограм во графиконот 4.11.



Графикон 4.11: Хистограм на фреквенциите на евалуациските периоди на клиничко следење на групата пациенти соАЛЛ третирани со метотрексат

Од оваа група, до комплетирањето на студијата преживеале со ремисија на болеста 60 пациенти, додека кај 5 се јавил релапс или летален исход (**табела 4.10** и **графикон 4.12**). Од 5-те пациенти со релапс на болеста, едно е во континуирана пролонгирана

ремисија, по завршен третман на релапсот, додека кај второто дете сè уште е во тек третман на релапсот. Останатите три пациенти егзистираа во текот на третманот на болеста.

Табела 4.10: Податоци за релапсот и преживувањето кај испитуваната група пациенти со АЛЛ

параметар	n	%
релапс или летален исход	5	7,69
преживеани	60	92,31
вкупно	65	100,00

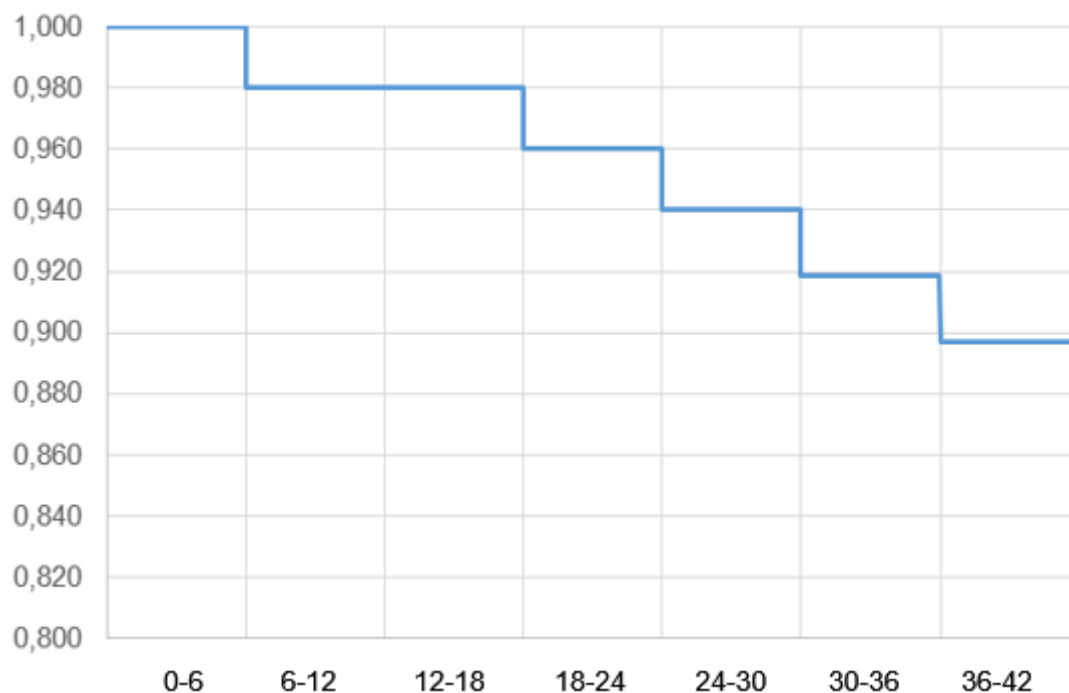
Кај овие 5 случаи, релапсот се случил апроксимативно: 11, 19, 25, 35 и 38 месеци по поставувањето на дијагнозата.



Графикон 4.12: Клинички тек на болеста кај испитуваната група пациенти со АЛЛ

За евалуација на стапката на преживување, воспоставен е евалуациски период во траење од 42 месеци по поставување на дијагнозата во кој се следени т.н. цензурирани случаи, и тоа со релапс и/или летален исход (кај наведените 5 пациенти), како и 4 пациенти кај кои целосно се аплицирани сите терапевтските процедури, но не биле достапни до крајот на евалуацискиот период на студијата.

На **графиконот 4.13** е прикажана Kaplan-Mayer-овата крива на преживување на пациентите со АЛЛ во текот на евалуацискиот период. На хоризонталната оска наведени се временските периоди изразени во месеци на следење на пациентите, а на вертикалната оска се означени вредностите на веројатноста за преживување.



Графикон 4.13: Каплан-Мејер-ова крива на преживување на пациентите со АЛЛ третирани со матотрексат. Вредностите на вертикалната оска означуваат веројатност за преживување

5.3 Генотипизација на полиморфизмите

За определувањето на генотипот за сите шест полиморфизми во студијата: *MTHFR* 667 C>T, *MTHFR* 1289 A>C, *TSE* 2R>3R, *MS* 2756 A>G, *SLCA1* 80 A>G И *ABCB1* 2677 G>A/T, направени се молекуларно-генетски анализи врз ДНА примероците од вкупно 108 испитаници (65 пациенти со АЛЛ и 43 контролни испитаници), односно 648 анализи.

Од нив, поради малото количество на геномска ДНА, неамплификабилност на изолираната ДНА или недостапност на пациентот за повторно земање на примерок, неуспешни се само четири генотипизации, што претставува 0,62% од вкупниот број анализи: три кај групата со АЛЛ и една кај контролната група. Иако незначителен, овој број е земен во предвид при статистичките и популациско-генетските пресметки.

Останатите 644 генотипизации, односно 99,38% од сите анализи, се успешно спроведени и податоците добиени од нив се соодветно обработени.

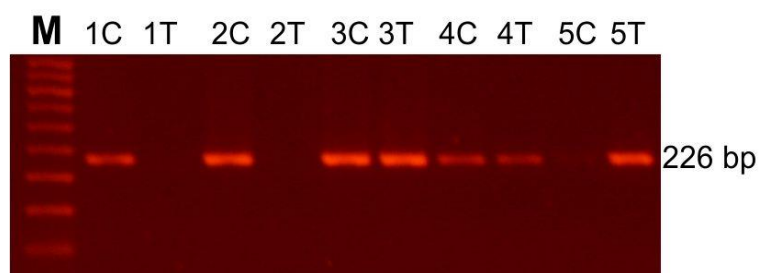
Репрезентативни делови од електрофоретограмите, фотографирани на УВ-трансилуминатор, се прикажани на сликите во натамошниот текст, за секој поединечен полиморфизам. На секој од електрофоретограмите, може да се забележи присуство на

барем по еден примерок од испитаник со секој од можните комбинации на генотипови за секој полиморфизам.

Кај полиморфизмите *MTHFR* 667 C>T, *MTHFR* 1289 A>C, *TS ER* 2R>3R, *MS* 2756 A>G и *SLCA1* 80 A>G застапени се три можни генотипови: хомозиготен за дивiot тип, хетерозиготен и хомозиготен за варијантниот (полиморфен) тип. Кај полиморфизмот *ABCB1* 2677 G>A/T, покрај хомозиготот за дивiot тип (GG) постојат три хетерозиготни комбинации на генотипови (GA, GT и AT), како и две хомозиготни варијантни форми (AA и TT). Сите овие комбинации на генотипови се земени предвид при статистичките пресметки и популациско-генетските анализи.

Полиморфизам *MTHFR*677 C>T

Определувањето на генотипот е вршено со амплификација со методот ARMS кој е всушност еквивалентен на алелно-специфичната PCR, а пример за резултатите од анализата се прикажани на **сликата 4.1**.



Слика 4.1: Електрофоретограм од ARMS-анализата за определување на генотипот на маркерот *MTHFR*677 C>T. Прикажани се резултатите од 5 примероци. За секој примерок направени се по 2 амплификации, засебно: за алелот со цитозин (C) и со тимин (T) на позицијата 677. Кај примероците 1 и 2, амплификацијата се извршила само во PCR-епруветата со прајмери специфични за алелот C, односно тие се хомозиготни за дивiot генотип (CC). Кај примероците 3 и 4 се присутни електрофоретски ленти и за алелот C и за T, односно се хетерозиготни (CT), додека кај примерокот 5 има амплификација само кај алелот T, па е хомозиготен на варијантниот генотип (TT).

Дистрибуцијата на генотиповите е прикажана во **табелата 4.11**.

Табела 4.11: Дистрибуција на генотиповите на *MTHFR* 677

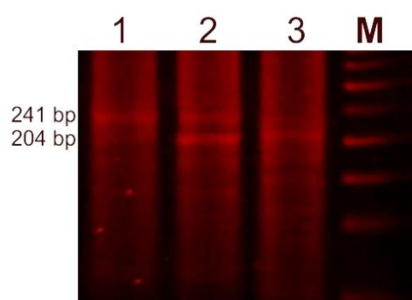
MTHFR 677	генотип	застапеност на генотипот	
		n	%
група пациенти со АЛЛ (n=64 ¹)	СС	35	54,69
	СТ	17	26,56
	ТТ	12	18,75
	вкупно	64	100,00
контролна група (n=43)	СС	21	48,84
	СТ	12	27,91
	ТТ	10	23,26
	вкупно	43	100,00
сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	СС	56	52,34
	СТ	29	27,10
	ТТ	22	20,56
	вкупно	107	100,00

1 – генотипот на овој полиморфизам не е определен кај еден испитаник од групата

Дивиот тип (СС) на *MTHFR* C677T полиморфизмот беше застапен кај 35 пациенти (54,69%) од студиската популација, и кај 21 (48,84%) од контролната група, СТ полиморфизмот е застапен кај 17 пациенти (26,56%) од студиската, односно 12 (27,91%) кај контролната и ТТ полиморфизмот беше застапен кај 12 пациенти (18,75%) од студиската и 10 (23,26%) кај контролната група.

Полиморфизам *MTHFR*1298 A>C

Генотипизацијата е вршена со PCR-амплификација и последователна рестрикциска анализа со ендонуклеазата *Mbo*II која пресекува при постоење на аденин во полиморфната нуклеотидна позиција 1298 на генот *MTHFR*. Пример за електрофоретограм е даден на **сликата 4.2** и во **табелата 4.12**.



Слика 4.2: Електрофоретограм од PCR-RFLP-анализата за генотипизирање на полиморфизмот *MTHFR*1298A>C.1-3: примероци од различни испитаници. М: маркер со DNA фрагменти со позната должина во базни парови (bp). На позицијата 1 се забележува една лента со должина до 204bp, па овој испитаник е хомозиготен за дивниот генотип (AA). Кај хетерозиготот (AG) на позицијата 2 има двеленти: 241и 204 и 37 bp, додека кај хомозиготите за варијантниот генотип (GG) се прикажува само една лента со дожина од 204 bp. Електрофоретските ленти со должина од 37 bp не се видливи на гелот.

Табела 4.12: Дистрибуција на генотиповите на *MTHFR*1298

MTHFR1298	генотип	застапеност на генотипот	
		n	%
група пациенти со АЛЛ (n=63 ¹)	AA	39	61,90
	AC	10	15,87
	CC	14	22,22
	вкупно	63	100,00
контролна група (n=42 ²)	AA	25	59,52
	AC	7	16,67
	CC	10	23,81
	вкупно	42	100,00
сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	AA	64	60,95
	AC	17	16,19
	CC	24	22,86
	вкупно	105	100,00

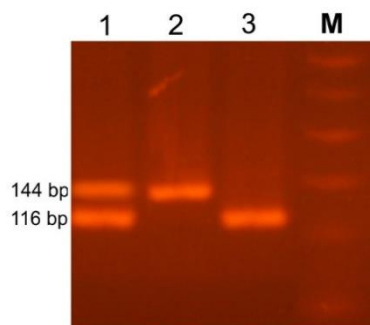
1 – генотипот на овој полиморфизам не е определен кај еден испитаник од групата

2 – генотипот на овој полиморфизам не е определен кај еден испитаник од групата

Дивниот тип AA на *MTHFR* A1298C полиморфизмот беше застапен кај 39 пациенти (61,90%) од студиската популација и кај 25 (59,52%) од контролната група, AC полиморфизмот беше застапен кај 10 пациенти (15,87%) од студиската, односно 7 (16,67%) од контролната и CC полиморфизмот беше застапен кај 14 пациенти (22,22%) од студиската и 10 (23,81%) пациенти од контролната група.

Полиморфизам *TS ER2R>3R*

За овој полиморфизам, определувањето на генотипот е вршено со директна PCR-амплификација. Репрезентативен пример за резултатите од анализата се прикажани на **сликата 4.3** и во **табелата 4.13** Разликата во должината меѓу двете алели од 28 bp, всушност, е должината на репетитивната секвенца во енхенсерниот регион на промоторот на генот за тимидин синтетаза.



Слика 4.3: Електрофоретограм од PCR-амплификацијата за определување на генотипот на полиморфизмот *TS ER2R>3R*. 1-3: примероци од различни испитаници. М: маркер со ДНА фрагменти со позната должина во базни парови (bp). Примерокот на позиција 2 е хомозиготен за дивниот генотип (2R/2R) поради што амплификатот е со должина од 116 bp. Наспроти тоа, примерокот 3 е хомозиготен за варијантниот алел 3R, односно електрофоретската лента има должина од 144 bp. Примерокот 1 е со хетерозиготен генотип (2R/3R) и ги содржи двете електрофоретски ленти (144 и 116 bp) што одговара на истовремено присуство и на двете алели: 2R и 3R.

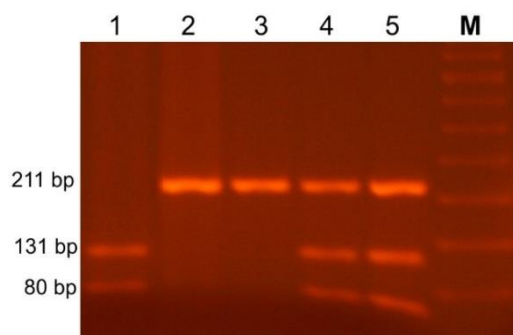
Табела 4.13: Дистрибуција на генотиповите на *TS ER 2R>3R*

TS	генотип	Застапеностна генотипот	
		n	%
група пациенти со АЛЛ (n=65)	2R/2R	17	26,15
	2R/3R	26	40,00
	3R/3R	22	33,85
	вкупно	65	100,00
контролна група (n=43)	2R/2R	5	11,63
	2R/3R	25	58,14
	3R/3R	13	30,23
	вкупно	43	100,00
сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	2R/2R	22	20,37
	2R/3R	51	47,22
	3R/3R	35	32,41
	вкупно	108	100,00

2R/2R генотипот на *TS ER* беше присутен кај 17 пациенти (26,15%) од студиската популација, и кај 5 (11,63%) од контролната група, 2R/3R полиморфизмот беше присутен кај 26 пациенти (40%) од студиската, односно 25 (58,14%) од контролната група и 3R/3R полиморфизмот беше присутен кај 22 пациенти (33,85%) од студиската и 13 (30,23%) од контролната група.

Полиморфизам *MS2756 A>G*

Определувањето на генотипот е вршено со амплификација и последователна RFLP-анализа, а пример за резултатите од анализата се прикажани на **сликата 4.4** и во **табелата 4.14**.



Слика 4.4: Електрофоретограм од ПЦР-РФЛП-анализата на амплифицираните сегменти од генот *MS*. 1-5: примероци од различни испитаници. М: маркер со ДНА фрагменти со позната должина во базни парови (бп). Примероците на позициите 2 и 3 од гелот имаат само една непресечена електрофоретска лента од 211 бп и се хомозиготни за дивiot генотип (АА). Примероците на позициите 4 и 5 содржат и непресечена лента (211 бп) и две ленти (131 и 80 бп) како резултат на дигестија со ендонуклеазата *HaeIII*, па се хетерозиготни (АГ), додека примерокот на позицијата 1 содржи само продукти на дигестијата и е хомозиготен за присуство на варијантниот генотип (ГГ).

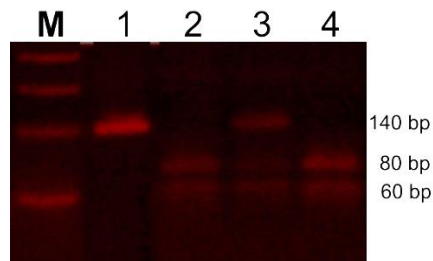
Табела 4.14: Дистрибуција на генотиповите на MS2756 A>G

MS 2756	Генотип	Застапеност на генотипот	
		п	%
Група пациенти со АЛЛ (n=65)	AA	36	55,38
	AG	28	43,08
	GG	1	1,54
	вкупно	65	100,00
Контролна група (n=43)	AA	33	76,74
	AG	10	23,26
	GG	0	0,00
	вкупно	43	100,00
Сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	AA	69	63,89
	AG	38	35,19
	GG	1	0,93
	вкупно	108	100,00

Дивiot генотип AA на полиморфизмот MS 2756 беше застапен кај 36 пациенти (55,38%) од студиската популација и кај 33 субјекти (76,74%) од контролната група, AG полиморфизмот беше застапен кај 28 пациенти (43,8%) од студиската, односно кај 10 субјекти (23,26%) од контролната група и GG полиморфизмот беше застапен само кај 1 пациент (1,54%) од студиската, истиот не беше присутен кај ниеден пациент од контролната група.

Полиморфизам *SLC19A1* 80 A>G

Генотипизацијата е вршена со PCR-амплификација и последователна рестрикциска анализа со ендонуклеазата *HhaI* која пресекува при постоење на гуанин во полиморфната нуклеотидна позиција 80 на генот *SCL19A1*. Пример за електрофоретограм е даден на **сликата 4.5** и во **табелата 4.15**.



Слика 4.5: Електрофоретограм од PCR-RFLP-анализата за генотипизирање на полиморфизмот *SLC19A1* 80 A>G. 1-4: примероци од различни испитаници. М: маркер со ДНА фрагменти со позната должина во базни парови (bp). Ензимот воопшто не пресекува кај примерокот кој е хомозиготен за дивниот генотип (AA), па на позицијата 1 се гледа само една електрофоретска лента со должина од 140 bp. Кај хетерозиготниот (AG) примерок 3 се прикажуваат три ленти: 140, 80 и 60 bp, додека кај хомозиготите 2 и 3 за варијантниот генотип (GG) има само дигестирани продукти со должина: 80 и 60 bp.

Табела 4.15: Дистрибуција на генотиповите на *SLC19A1* 80 A>G

SLC19A1 80	генотип	Застапеност на генотипот	
		n	%
група пациенти со АЛЛ (n=65)	AA	12	18,46
	AG	32	49,23
	GG	21	32,31
	вкупно	65	100,00
контролна група (n=43)	AA	21	48,84
	AG	12	27,91
	GG	10	23,26
	вкупно	43	100,00
сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	AA	33	30,56
	AG	44	40,74
	GG	31	28,70
	вкупно	108	100,00

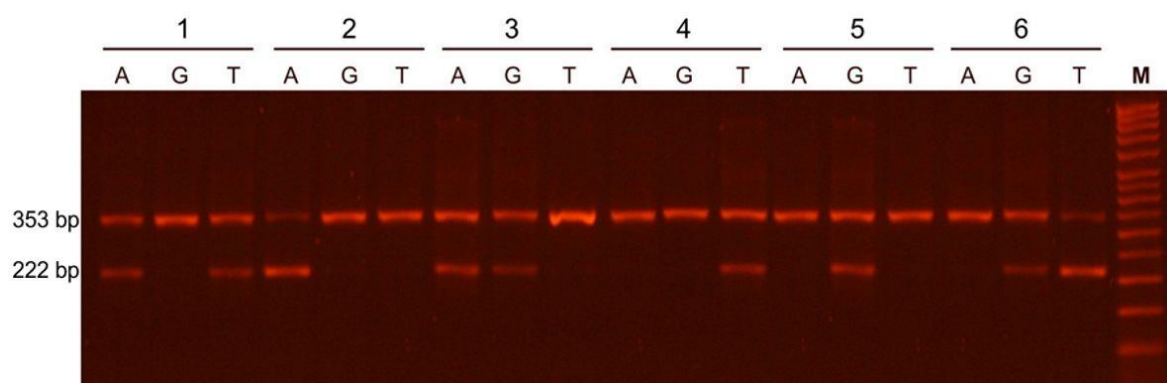
AA генотипот беше застапен кај 12 пациенти (18,46%) од студиската популација, и кај 21 (48,44%) субјект од контролната група, AG генотипот беше застапен кај 32 пациенти (49,23%) од студиската група, односно кај 12 (27,91%) субјекти од контролната и GG генотипот на *SLC19A1* 80 A>G полиморфизмот беше застапен кај 21 пациент (32,31%) од студиската и 10 (23,26%) од контролната група

Полиморфизам *ABCB1* 2677G>A/T

При определувањето на генотипот користена е алелно-специфичната PCR-амплификација при што еден од прајмерите во секоја од трите PCR-епрувети е строго специфичен за полиморфната нуклеотидна позиција 2677 на генот *ABCB1*.

Во однос на овој полиморфизам постојат три тип на алели (G, A и T), па можни се шест комбинации на генотипови. Покрај хомозиготните индивидуи за дивниот тип (GG), постојат три хетерозиготни генотипови (GA, GT и AT), како и две хомозиготни варијантни (полиморфни) форми (AA и TT).

Пример за електрофоретограм е даден на **сликата 4.6** и во **табелата 4.16**.



Слика 4.6: Електрофоретогам од алелно-специфичната PCR-анализа за генотипизирање на полиморфизмот *ABCB12677 G>C/T.1-6*: примероци од различни испитаници. М: маркер со DNA фрагменти со позната должина во базни парови (bp). Ознаки А, G и Т: присуство на прајмер специфичен за алелот А, G и Т, соодветно. Во секоја PCR-епрувета користена е и внатрешна контрола со која се амплифицира лента за верификација на амплификацијата и има должина од 353 bp. Специфичните електрофоретски ленти се со должина од 222 bp. Примерокот хомозиготен за дивниот генотип (GG) е на позицијата 5 каде се забележува една лента кај специфичната реакција G. Хетерозиготите GA, GT и AT се на позициите 3, 6 и 1, соодветно. Хомозиготните варијантни генотипови (AA и TT) се на позициите 2 и 4, соодветно.

Табела 4.16: Дистрибуција на генотиповите на ABCB12677 G>C/T

ABCB12677	генотип	застапеност на генотипот	
		n	%
група пациенти со АЛЛ (n=65)	GG	7	10,76
	GA	9	13,84
	GT	31	47,69
	AT	2	3,07
	AA	3	4,61
	TT	13	20
	вкупно	65	100,00
контролна група (n=43)	GG	12	27,91
	GA	5	11,63
	GT	16	37,21
	AT	3	6,98
	AA	1	2,33
	TT	6	13,95
	вкупно	43	100,00
сите испитаници од двете групи заедно (n=108)	GG	19	17,59
	GA	14	12,96
	GT	47	43,52
	AT	5	4,63
	AA	4	3,70
	TT	19	17,59
	вкупно	108	100,00

При анализа на фреквенцијата на генотиповите кај студиската и контролната група GG генотипот беше присутен кај 10,77% од студиската, односно 27,9% кај контролната, GA генотипот кај 13,85%, односно 11,63%, GT- 47,69 % односно 37,21% , AT – 3.08% односно 6,98%, AA – 4,62% односно 2,33% и TT – 20,0% односно 13,95%.

5.4 Популациско-генетска анализа

Група на пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат

Резултатите од популациско-генетската анализа на генотиповите кај групата на пациенти со АЛЛ се прикажани во табелата 4.17.

Табела 4.17: Популациско-генетска анализа на групата пациенти со АЛЛ

полимор- физам	гено- тип	фреквенција на генотипови		тест за HWE		хетерозиготност			број на алели		<i>I</i>
		опс.	очек.	χ^1	<i>p</i>	опс.	очек.	<i>F</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	
<i>MTHFR</i> 677	CC	35	29,57	9,733	0,002 ²	0,266	0,435	0,390	2	1,771	0,627
	CT	17	27,87								
	TT	12	6,57								
<i>MTHFR</i> 1298	AA	39	30,73	24,468	0,000 ²	0,159	0,421	0,623	2	1,728	0,612
	AC	10	26,54								
	CC	14	5,73								
<i>TS</i>	2R/2R	17	13,85	2,478	0,115	0,400	0,497	0,195	2	1,988	0,690
	2R/3R	26	32,31								
	3R/3R	22	18,85								
<i>MS 2756</i>	AA	36	38,46	2,958	0,085	0,431	0,355	-0,213	2	1,550	0,540
	AG	28	23,08								
	GG	1	3,46								
<i>SLC19A1</i> 80	AA	12	12,06	0,001	0,975	0,492	0,490	-0,004	2	1,962	0,684
	AG	32	31,88								
	GG	21	21,06								
<i>ABCB1</i> 2677	GG	7	11,22	11,290	0,010 _*	0,646	0,604	-0,069	3	2,528	0,990
	GA	9	7,06								
	AA	3	1,11								
	GT	31	24,51								
	AT	2	7,72								
	TT	13	13,39								
цела популација (n=65)		просечни вредности				0,399	0,467	0,154	2,16 ₇	1,921	0,690
		стандардна грешка (SE)				0,070	0,035	0,127	0,16 ₇	0,138	0,064

Кратенки: опс. = опсервирани; очек. = очекувани; *F* = фиксациски индекс;

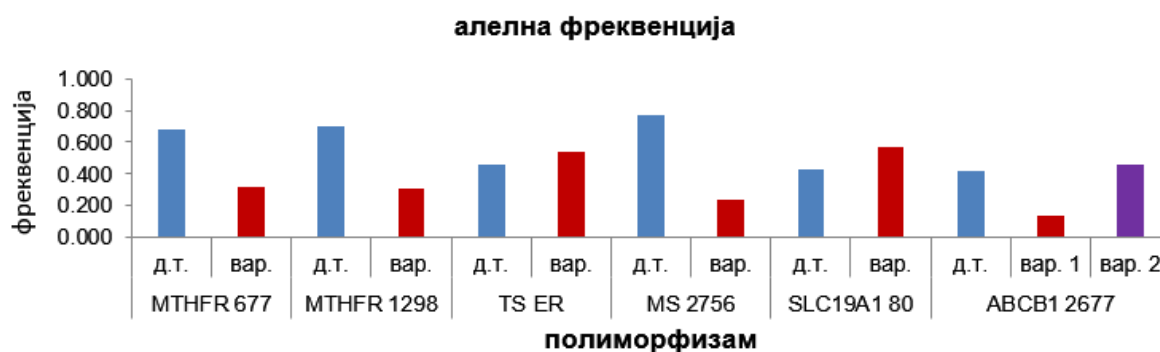
Na = број на алели во локусот; *Ne* = пресметан број на ефективни алели во локусот; *I* = Shannon-ов информативен индекс

1 – статистички сигнификантна разлика

2 – статистички сигнификантна разлика

Отстапувања од Харди-Вајнберговата рамнотежа се најдени кај групата на пациенти со АЛЛ кај полиморфизмите: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289 и *ABCB1* 2677.

Алелните фреквенции за секој од испитуваните полиморфизми: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289, *TS ER*, *MS* 2756, *SLCA1* 80 и *ABCB1* 2677 кај групата на пациенти со АЛЛ се прикажани на **графиконот 4.14**.



Графикон 4.14: Фреквенции на алелите од шесте испитувани полиморфизми кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=хомозиготен див тип алели вар.=хомозиготен варијантен тип алели.

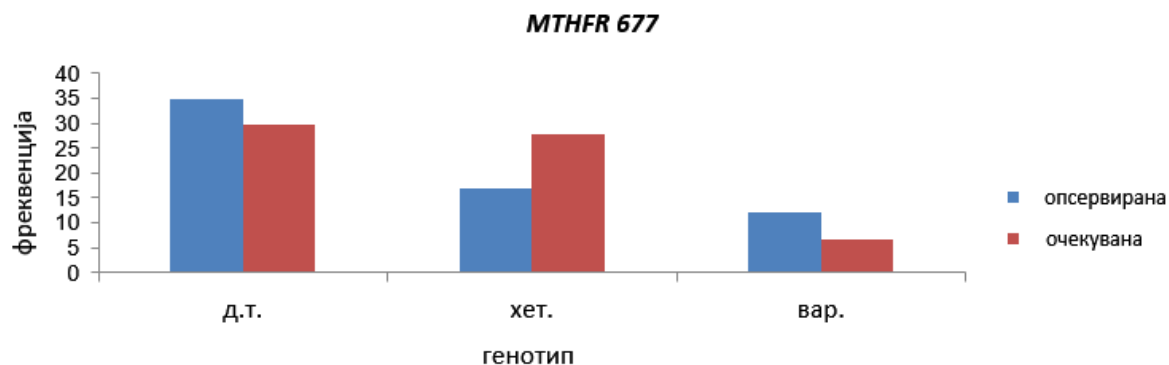
Кај полиморфизмот *ABCB1* 2677, вар. 1 е алелот А, додека вар. 2 е алелот Т.

За определување на Харди-Вајнбергова рамнотежа беше направена споредба на обсервираните наспроти очекуваните фреквенции на генотиповите за секој полиморфизам поединечно. Вредностите на p поголеми од 0,05 според χ^2 -тестот укажуваат на тоа дека се во согласност со Харди-Вајнберговиот принцип на рамнотежа за испитуваниот полиморфизам.

Кај испитуваната популација на пациенти со АЛЛ, дистрибуцијата на генотиповите кај пациентите не покажа статистички значајни отстапувања во однос на полиморфизмите: *TS ER*, *MS* 2756 и *SLCA1* 80.

Отстапувања од Харди-Вајнберговата рамнотежа се најдени кај групата на пациенти со АЛЛ кај полиморфизмите: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289 и *ABCB1* 2677.

Дистрибуцијата на обсервираните, наспроти очекуваните фреквенции на генотиповите за секој од испитуваните полиморфизми: *MTHFR* 677, *MTHFR* 1289, *TS ER*, *MS* 2756, *SLCA1* 80 и *ABCB1* 2677 кај групата на пациенти со АЛЛ се прикажани на **графиконите 4.15-4.20**



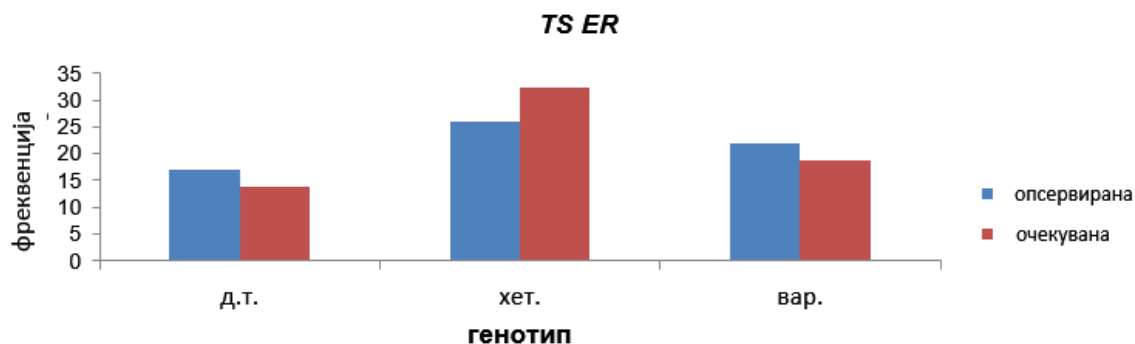
Графикон 4.15: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MTHFR* 667C>T кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=див генотип (CC); хет.=хетерозиготен генотип (CT) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (TT)



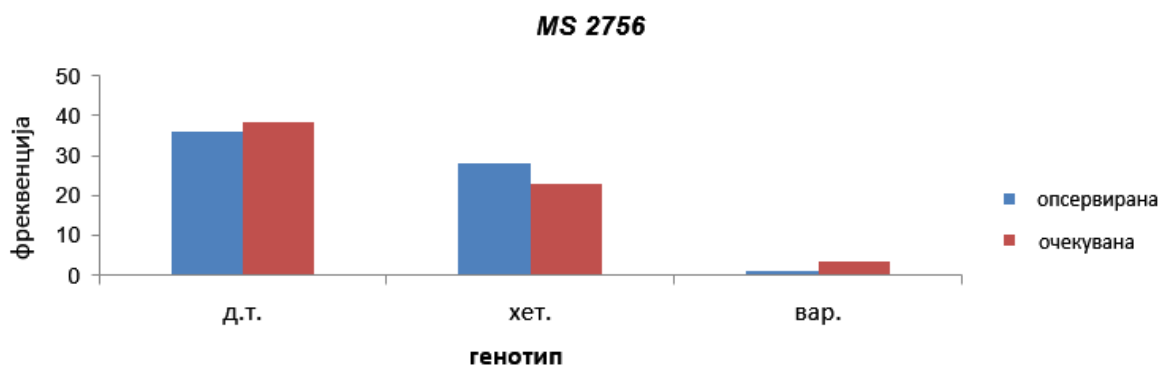
Графикон 4.16: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MTHFR* 1289A>C кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=див генотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AC) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (CC)



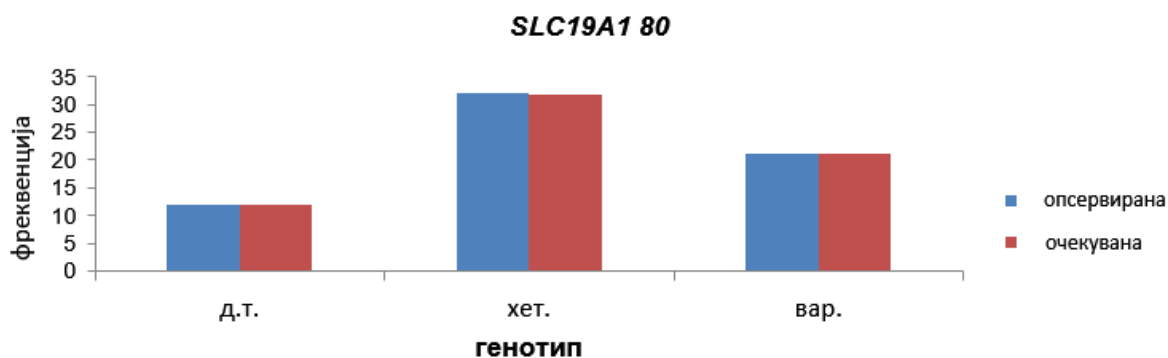
Графикон 4.17: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *TS ER* 2R>3R кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=див генотип (2R2R); хет.=хетерозиготен генотип (2R3R) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (3R3R)



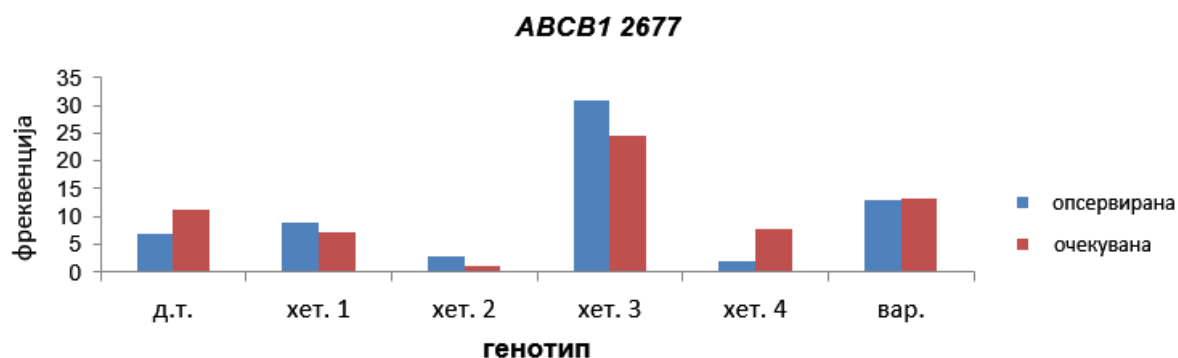
Графикон 4.18: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MS 2756 A>G* кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=див генотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AG) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)



Графикон 4.19: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *SLC19A1 80 A>G* кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т.=див генотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AG) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)



Графикон 4.20: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *ABCB1 2677 G>A/T* кај групата пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат.

Кратенки: д.т. = див генотип (GG); хет. 1 =хетерозиготен генотип (GA);
хет. 2 =хетерозиготен генотип (GT); хет. 3 =хетерозиготен генотип (AA);
хет.4 =хетерозиготен генотип (AT) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)

Контролна група

Резултатите од популациско-генетската анализа на генотиповите кај контролната група се прикажани во **табелата 4.18**.

Табела 4.18: Популациско-генетска анализа на контролната група

полимор- физам	гено- тип	фреквенција на генотипови		тест за HWE		хетерозиготност			број на алели		<i>I</i>
		опс.	очек.	χ^2	<i>p</i>	опс.	очек	<i>F</i>	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	
<i>MTHFR</i> 677	CC	21	16,953	6,976	0,008 ¹	0,279	0,467	0,403	2	1,877	0,660
	CT	12	20,093								
	TT	10	5,953								
<i>MTHFR</i> 1298	AA	21	16,953	16,037	0,000 ¹	0,167	0,436	0,618	2	1,774	0,628
	AC	12	20,093								
	CC	10	5,953								
<i>TSER</i>	2R/2R	5	7,122	1,798	0,180	0,581	0,483	-0,204	2	1,933	0,676
	2R/3R	25	20,756								
	3R/3R	13	15,122								
<i>MS</i> 2756	AA	33	33,581	0,744	0,388	0,233	0,206	-0,132	2	1,259	0,359
	AG	10	8,837								
	GG	0	0,581								
<i>SLC19A1</i> 80	AA	21	16,953	6,976	0,008 ¹	0,279	0,467	0,403	2	1,877	0,660
	AG	12	20,093								
	GG	10	5,953								
<i>ABCB1</i> 2677	GG	12	11,773	0,451	0,930	0,558	0,583	0,042	3	2,397	0,957
	GA	5	5,233								
	AA	1	0,581								
	GT	16	16,221								
	AT	3	3,605								
	TT	6	5,587								
цела популација (n=43)		просечни вредности				0,349	0,440	0,188	2,167	1,853	0,657
		стандардна грешка (SE)				0,072	0,051	0,136	0,167	0,149	0,077

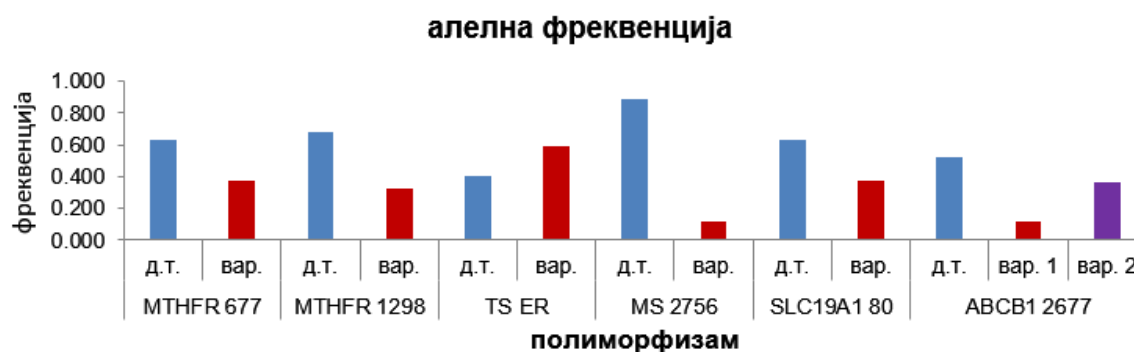
Кратенки: **опс.** = опсервирани; **очек.** = очекувани; ***F*** = фиксациски индекс;

N_a = број на алели во локусот; ***N_e*** = пресметан број на ефективни алели во локусот; ***I*** = Shannon-ов информативен индекс

1 – статистички сигнификантна разлика

Отстапувања од Харди-Вајнберговата рамнотежа се најдени кај контролната група кај полиморфизмите: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289 и *SLC19A1* 80.

Алелните фреквенции за секој од испитуваните полиморфизми: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289, *TS ER*, *MS* 2756, *SLCA1* 80 и *ABCB1* 2677 кај контролната група се прикажани на графиконот 4.21.



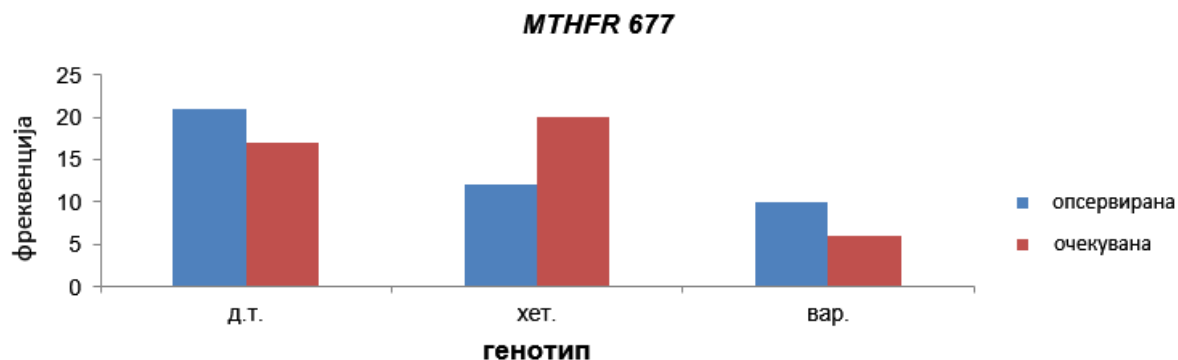
Графикон 4.21: Фреквенции на алелите од шесте испитувани полиморфизми кај контролната група.
Кратенки: д.т.=хомозиготен див генотип;
хет.=хетерозиготен генотип и вар.=хомозиготен веријантен генотип

И во оваа популација испитаници, Харди-Вајнбергова рамнотежа беше проверена со споредба на обсервираните и очекуваните фреквенции на генотиповите за секој полиморфизам поединечно.

Кај испитуваната популација на контролни испитаници, дистрибуцијата на генотиповите кај пациентите не покажа статистички значајни отстапувања во однос на полиморфизмите: *TS ER*, *MS* 2756 и *ABCB1* 2677.

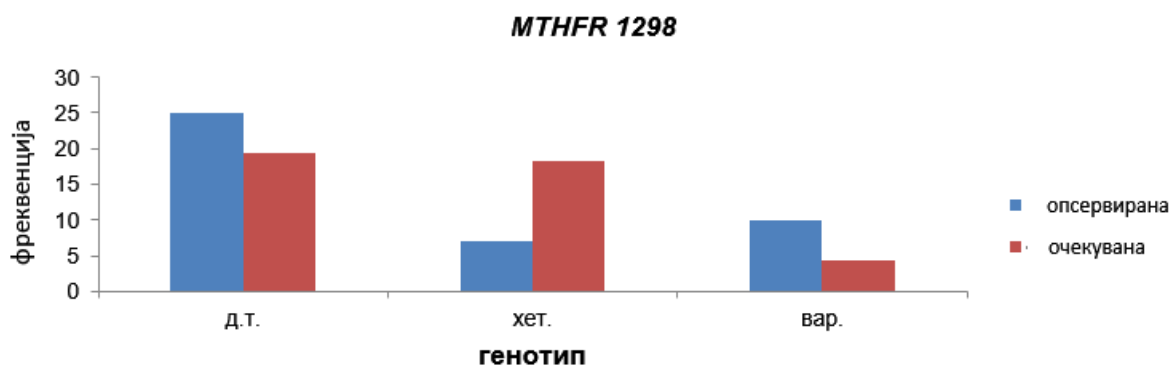
Отстапувања од Харди-Вајнберговата рамнотежа се најдени кај контролната група кај полиморфизмите: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289 и *SLC19A1* 80.

Дистрибуцијата на обсервираните, наспроти очекуваните фреквенции на генотиповите за секој од испитуваните полиморфизми: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289, *TS ER*, *MS* 2756, *SLC19A1* 80 и *ABCB1* 2677 кај контролната група се прикажани на **графиконите 4.22 – 4.27.**



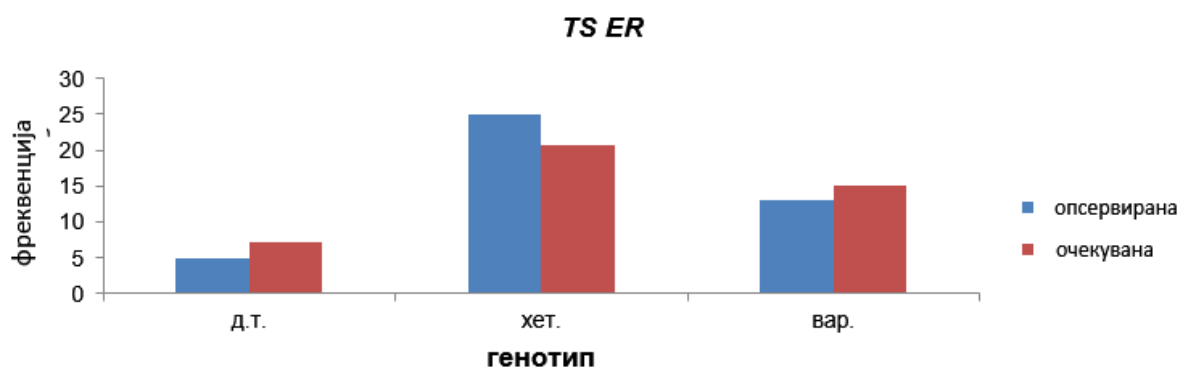
Графикон 4.22: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MTHFR 667C>T* кај контролната група.

Кратенки: д.т.=див генотип (CC); хет.=хетерозиготен генотип (CT) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (TT)



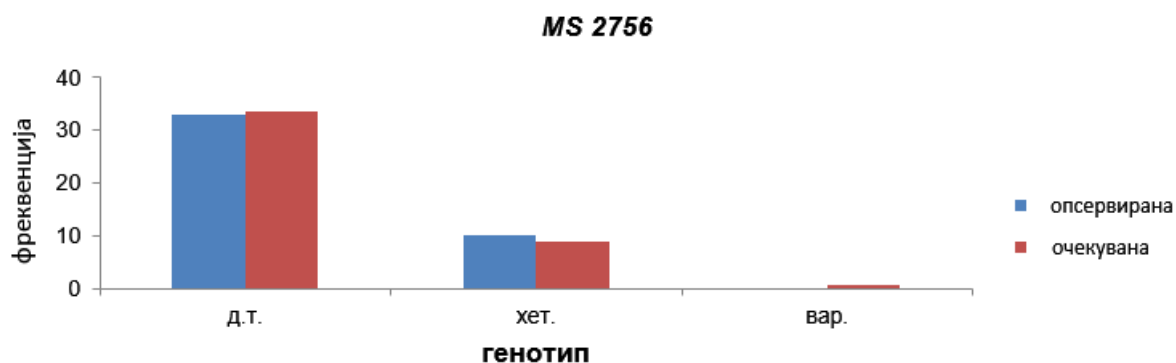
Графикон 4.23: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MTHFR 1289A>C* кај контролната група.

Кратенки: д.т.=див генотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AC) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (CC)



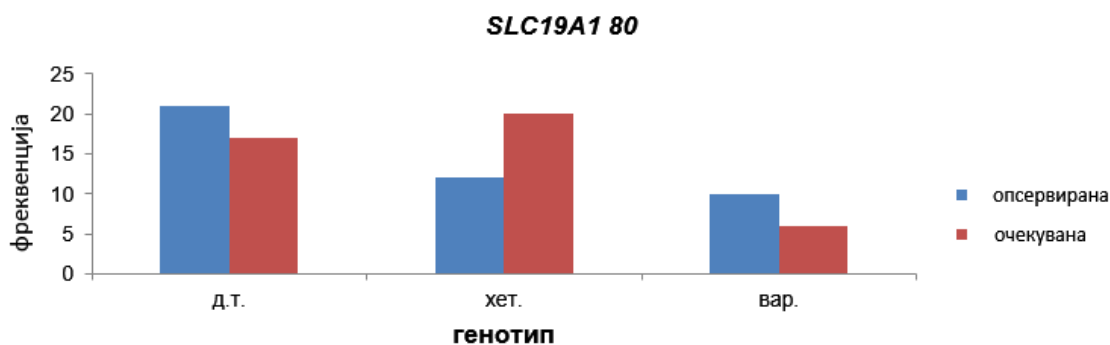
Графикон 4.24: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *TS ER 2R>3R* кај контролната група.

Кратенки: д.т.=див генотип (2R2R); хет.=хетерозиготен генотип (2R3R) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (3R3R)



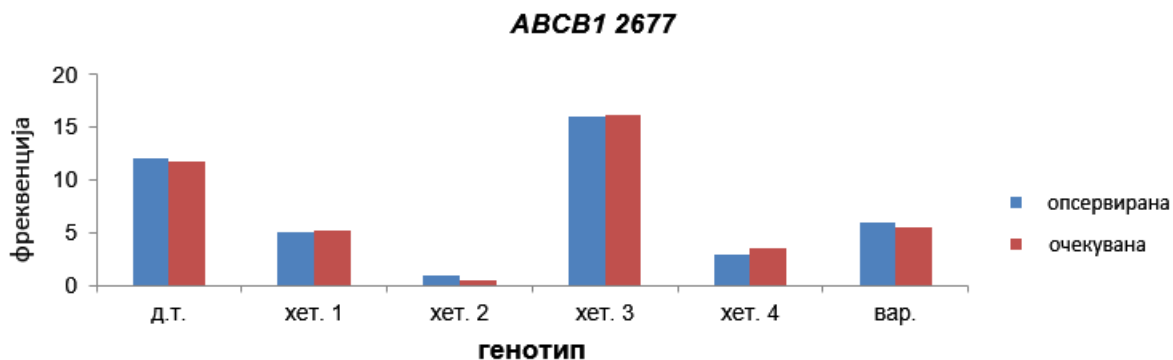
Графикон 4.25: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *MS 2756 A>G* кај контролната група.

Кратенки: д.т.=дивгенотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AG) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)



Графикон 4.26: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *SLC19A1 80 A>G* кај контролната група.

Кратенки: д.т.=див генотип (AA); хет.=хетерозиготен генотип (AG) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)



Графикон 4.27: Фреквенции на опсервираните наспроти очекуваните генотипови пресметани според принципот на Харди-Вајнберговата рамнотежа за полиморфизмот *ABCB1 2677 G>A* кај контролната група.

Кратенки: д.т. = див генотип (GG); хет. 1 =хетерозиготен генотип (GA); хет. 2 =хетерозиготен генотип (GT); хет. 3 =хетерозиготен генотип (AA); хет. 4 =хетерозиготен генотип (AT) и вар.=хомозиготен варијантен генотип (GG)

Популациско-генетска споредба на двете групи

Споредбата на групата пациенти со АЛЛ и на контролната група од аспект на популациска генетика е вршена со анализата на молекуларната варијанса (AMOVA од англ. *analysis of molecular variance*). Дистрибуцијата на генотиповите и алелните фреквенции на шесте испитувани полиморфизми од двете популации се споредени со Wright-овата F -статистичка анализа (F од фиксациски индикатори) во однос на очекуваното ниво на популациската хетерозиготност. Изработена е и матрица на алелни дистанци преку 999 пермутациски операции на податоците од вкупниот број на 108 испитаници, односно од двете популации: групата пациенти со АЛЛ и контролната група. Од фиксациските индикатори пресметани се вредностите на: F_{ST} , F_{IT} и F_{IS} .

Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 4.19**.

Табела 4.19: Wright-ова F -статистичка анализа на генетскиот диверзитет на двете групи

полиморфизам	просечна хетерозиготност		F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
	опс.	очек.			
<i>MTHFR</i> 677	0,451	0,272	0,397	0,398	0,003
<i>MTHFR</i> 1298	0,429	0,163	0,621	0,621	0,000
<i>TS</i> ER	0,490	0,491	-0,002	0,001	0,003
<i>MS</i> 2756	0,280	0,332	-0,183	-0,156	0,023
<i>SLC19A1</i> 80	0,479	0,386	0,195	0,226	0,039
<i>ABCB1</i> 2677	0,594	0,602	-0,014	-0,006	0,009
сите испитаници (n=108)	просечни вредности		0,169	0,181	0,013
	стандардна грешка (SE)		0,122	0,119	0,006

Кратенки: **опс.** = опсервирани; **очек.** = очекувани; F_{IS} = фиксациски индекс; F_{IT} = интрапопулациски коефициент на блискородствена репродукција; F_{ST} = фиксациски индекс; Nm = број на ефективни мигранти

Фиксацискиот индекс F_{ST} се определува како однос на генетските варијации меѓу две популации наспроти варијациите во самата популација или субпопулација. Ознаката F_{ST} се однесува на (S од англ. *subpopulation*) наспроти целата популација (T од англ. *total population*).

Во принцип, колку се поголеми вредностите на коефициентот F_{ST} , толку се поголеми и генетските разлики меѓу индивидуите од споредуваните популации. Теоретски, максималната вредност на овој индекс е 1 при целосно различни алели, додека има

вредност 0 кога популацијата е генетски целосно хомогена. Генерално, вредностите поголеми од 0,25 означуваат значајна диференцијација меѓу субпопулациите, односно групите испитаници, вредностите 0,15 - 0,25 означуваат умерена диференцијација, а вредностите помали од 0,15 ниско ниво на генска диференцијација меѓу субпопулациите.

Во хуманата популациска генетика, варијациите на индексот F_{ST} се многу помали, па често пати при висока генетска разновидност индексот има вредности на приближно 0,2, додека вредностите блиски до 0 укажуваат на ниска диференцијација, односно на висока стапка на консангвизам. Интрапопулацискиот инбридинг-коэффициент F_{IT} се нарекува и коэффициент на блискосродствена репродукција (англ. *inbreeding*) на ниво на индивидуите во определена популација. Оттаму и ознаката F_{IT} (I одангл. *individual*) наспроти целата популација (T од англ. *total*). Коэффициентот F_{IT} има вредности блиски до 0 кога нема вишок ниту дефицит на хетерозиготност во популацијата.

F_{IS} означува инбридинг-коэффициент, односно намалување на хетерозиготноста на индивидуата во однос на субпопулацијата или групата испитаници. Ознаката F_{IS} потекнува од: I (од *individual*) наспроти субпопулација (S од *subpopulation*). Намалувањето на хетерозиготноста се случува поради неслучајната репродукција во рамките на испитуваната субпопулација. Оттаму, вредностите на овој коэффициент се повисоки при блискосродствено размножување.

Пресметаните популациско-генетски параметри, а особено F_{IS} индексот, укажуваат на дефицит на хетерозиготноста и зголемување на веројатноста од инбридинг поради консангвизам кај полиморфизмите: *MTHFR* 667, *MTHFR* 1289и во помала мерка кај *SLCA1* 80.

Сумарните резултати во форма на просечни вредности и соодветните стандардни грешки од популациско-генетската анализа на целокупната популација на 108 испитаници (65 пациенти со АЛЛ и 43 контролни испитаници) се прикажани во **табелата 4.20**.

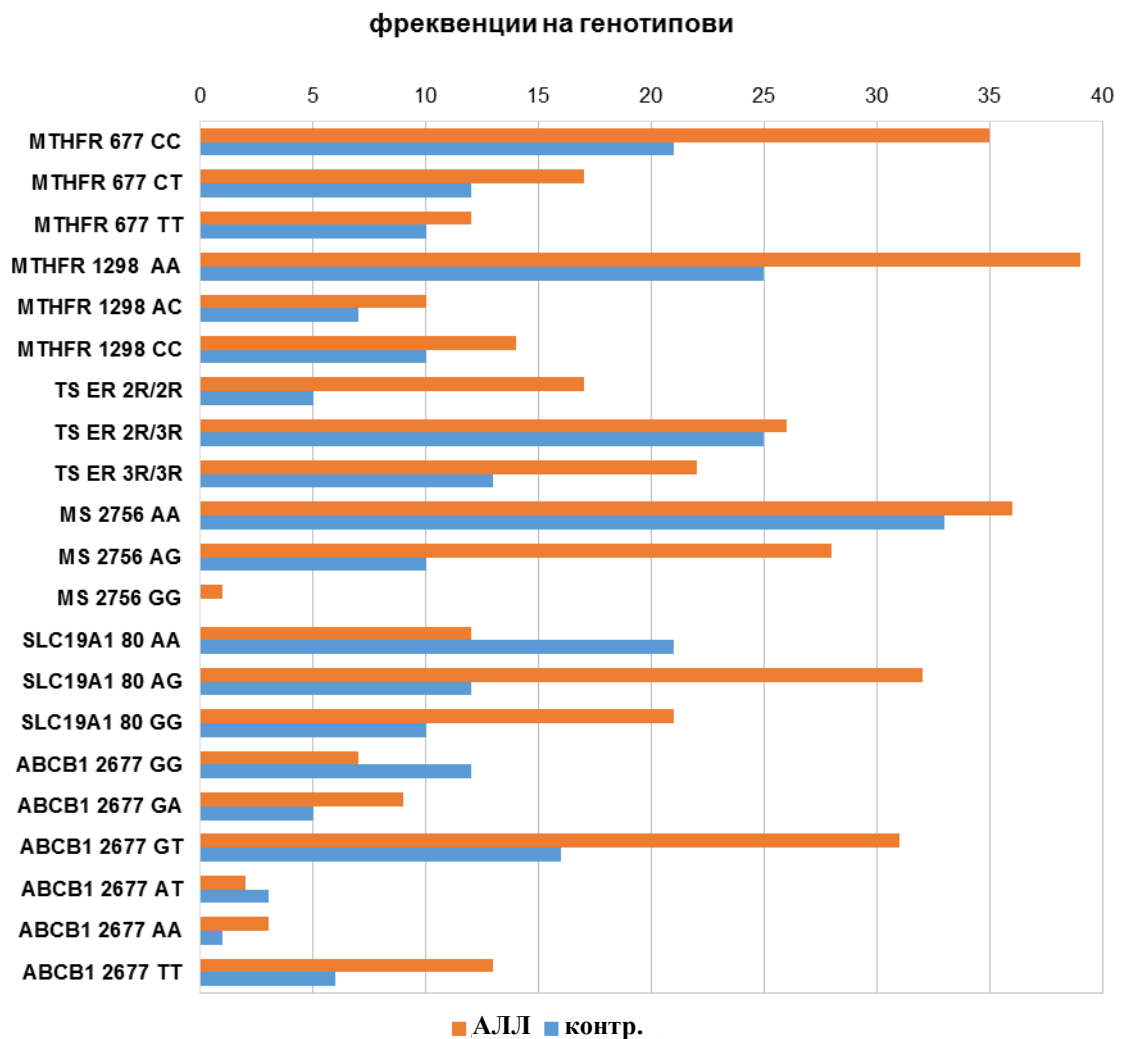
Табела 4.20: Популациско-генетска споредба на двете групи

сите испитаници (n=108)	параметар	хетерозиготност			број на алели		I
		опс.	очек.	F	Na	Ne	
	просечни вредности	0,374	0,454	0,171	2,167	1,887	0,674
	стандардна грешка (SE)	0,048	0,030	0,089	0,112	0,097	0,048

Кратенки: **опс.** = опсервирани; **очек.** = очекувани; **F** = фиксациски индекс на инбридинг;
Na = број на алели во локусот; **Ne** = пресметан број на ефективни алели во локусот;
I = Shannon-ов информативен индекс

5.5 Статистичка споредба на генотиповите на полиморфизмите кај двете групи испитаници

Споредбениот приказ на дистрибуцијата на генотиповите на испитуваните полиморфизми кај двете групи испитаници (65 пациенти со АЛЛ и 43 контролни испитаници) се прикажани на **графиконот 4.28** во **табелата 4.21**.



Графикон 4.28: Фреквенции на испитуваните генотипови кај двете групи. Броевите означуваат број на испитаници.

Кратенки: АЛЛ=група на пациенти со АЛЛ; контр.=контролна група

Табела 4.21: Споредба на дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај двете групи

полимор- физам	генотип	група на пациенти со АЛЛ		контролна група		разлика меѓу двете групи испитаници [†]		однос на шанси OR (95%CI)[†]
		п	%	п	%	χ^2	p	
MTHFR 677	CC	35	54,69	21	48,84	1	1	1
	CT	17	26,56	12	27,91	0,121	0,728	0,850 (0,34-2,12)
	TT	12	18,75	10	23,26	0,417	0,518	0,720 (0,27-1,95)
	вкупно	64	100,00	43	100,00	0,353	0,552	0,791 (0,36-1,72)
MTHFR1 298	AA	39	61,90	25	59,52	1	1	1
	AC	10	15,87	7	16,67	0,025	0,874	0,916 (0,31-2,72)
	CC	14	22,22	10	23,81	0,049	0,824	0,897 (0,35-2,33)
	вкупно	63	100,00	42	100,00	0,060	0,806	0,905 (0,41-2,01)
TS ER	2R/2R	17	26,15	5	11,63	1	1	1
	2R/3R	26	40,00	25	58,14	4,389	0,036*	0,306 (0,10-0,95)
	3R/3R	22	33,85	13	30,23	1,299	0,254	0,498 (0,15-1,67)
	вкупно	65	100,00	43	100,00	3,366	0,067	0,372 (0,13-1,10)
MS 2756	AA	36	55,38	33	76,74	1	1	1
	AG	28	43,08	10	23,26	4,717	0,030*	2,567 (1,08-6,08)
	GG	1	1,54	0	0,00	0,905	0,341	н.п.
	вкупно	65	100,00	43	100,00	5,118	0,024*	2,658 (1,12-6,28)
SLC19A1 80	AA	12	18,46	21	48,84	1	1	1
	AG	32	49,23	12	27,91	10,182	0,001*	4,667 (1,77-12,33)
	GG	21	32,31	10	23,26	6,301	0,012*	3,675 (1,31-10,34)
	вкупно	65	100,00	43	100,00	11,253	0,001*	4,216 (1,77-10,02)
ABCB1 2677	GG	7	13,85	12	27,91	1	1	1
	GA	9	47,69	5	11,63	2,431	0,119	3,086 (0,73-12,98)
	GT	31	3,08	16	37,21	4,696	0,030*	3,321 (1,09-10,08)
	AT	2	4,62	3	6,98	0,017	0,897	1,143 (0,15-8,59)
	AA	3	20,00	1	2,33	1,958	0,162	5,143 (0,44-59,46)
	TT	13	13,85	6	13,95	3,800	0,051	3,714(0,97-14,23)
	вкупно	65	100,00	43	100,00	5,243	0,022*	3,207 (1,15-8,98)

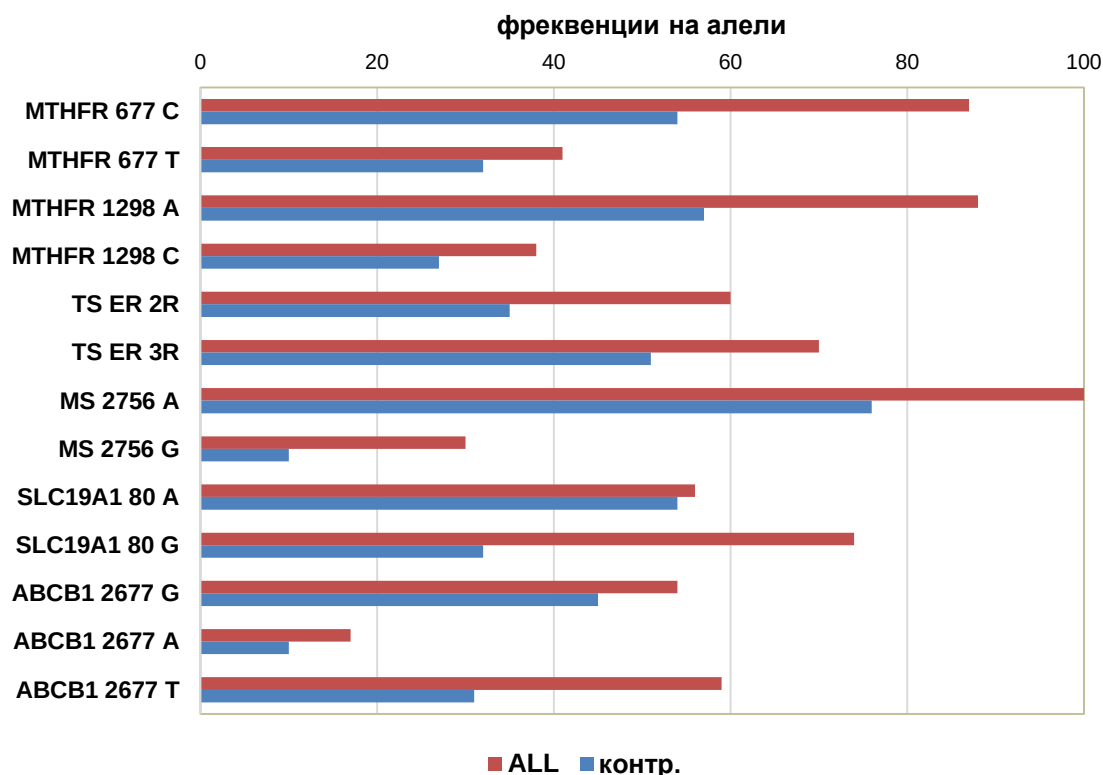
*статистички сигнификантна разлика

[†] вредностите се определувани со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест за секој поединечен хетерозиготен или хомозиготен варијантен генотип во однос на индивидуите со дивiot (неваријантен) хомозиготен генотип за секој полимор-физам. Оттаму, вредностите пресметани за дивiot генотип се референтни и се еднакви на 1. Исклучок е вкупната пресметка (последен ред за секој полиморфизам) каде вредностите се определувани за дивiot (неваријантен) хомозиготен генотип во однос на збирот на сите хетерозиготни и хомозиготниот варијантен генотип од истиот полиморфизам

н.п.непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип

Споредувајќи ја дистрибуцијата на испитуваните генотипови меѓу студиската и контролната група, беше регистрирана статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на **TS 2R/3R** [OR (95%CI) 0,306 (0,10-0,95), p=0.036], **MS 2756 AG** [OR (95%CI) 2,567 (1,08-6,08), p=0.03], **SLC19A1 80 AG** [OR (95%CI) 4,667 (1,77-12,33), p=0.001], **SLC19A1 80 GG**[OR (95%CI) 3,675 (1,31-10,34), p=0.012], како и **ABCB1 GT**[OR (95%CI) 3,321 (1,09-10,08), p=0.03] полиморфизмот кај студиската популација во однос на контролната група.

Споредбениот приказ на дистрибуцијата на алелите на испитуваните полиморфизми кај двете групи испитаници (65 пациенти со АЛЛ и 43 контролни испитаници) се прикажани на **графиконот 4.29** во **табелата 4.22**.



Графикон 4.29: Фреквенции на испитуваните алели кај двете групи. Броевите означуваат број на испитаници. Кратенки: АЛЛ=група на пациенти со АЛЛ; контр.=контролна група

Табела 4.22: Споредба на дистрибуцијата на испитуваните алели кај двете групи

полимор- физам	алел	група на пациенти со АЛЛ		контролна група		разлика меѓу двете групи испитаници Fisher-ов егзактен тест [†]		однос на шанси OR (95%CI) [†]
		n	f	n	f	χ^2	p	
MTHFR 677	C	87	0,680	54	0,628	0,614	0,433	0,795 (0,45-1,41)
	T	41	0,320	32	0,372			
	вкупно	128	1,000	86	1,000			
MTHFR 1298	A	88	0,698	57	0,679	0,093	0,761	0,912 (0,50-1,65)
	C	38	0,302	27	0,321			
	вкупно	126	1,000	84	1,000			
TS ER	2R	60	0,462	35	0,407	0,625	0,429	0,801(0,46-1,39)
	3R	70	0,538	51	0,593			
	вкупно	130	1,000	86	1,000			
MS 2756	A	100	0,769	76	0,884	4,496	0,034*	2,280(1,05-4,95)
	G	30	0,231	10	0,116			
	вкупно	130	1,000	86	1,000			
SLC19A1 80	A	56	0,431	54	0,628	8,049	0,005*	2,230 (1,28-3,90)
	G	74	0,569	32	0,372			
	вкупно	130	1,000	86	1,000			
ABCB1 2677	G	54	0,415	45	0,523			
	A	17	0,131	10	0,116	0,533 [‡]	0,465 [‡]	1,385 (0,58-3,33) [‡]
	T	59	0,454	31	0,360	1,859 [§]	0,173 [§]	1,502 (0,84-2,70) [§]
	вкупно	130	1,000	86	1,000			

F фреквенција

***** статистички сигнификантна разлика

[†] определуваниво однос на индивидуите со дивиот (неваријантен) але

[‡] вредност пресметана за варијантниот алел А во однос на дивиот алел G

[§] вредност пресметана за варијантниот алел Т во однос на дивиот алел G

При споредба на дистрибуцијата на испитуваните алели меѓу студиската и контролната група беше утврдена статистички сигнификантна разлика во присуството на G алелот на MS2756 и G алелот на SLC19A1 80 полиморфизмот кај студиската во однос на контролната популација.

5.6 Поврзаност на генотиповите од испитуваните полиморфизми кај пациентите со АЛЛ и токсичните ефекти во тек и по завршувањето на терапијата со високи дози на метотрексат

Со цел да се утврди постоење на поврзаност меѓу испитуваните шест полиморфизми кај групата од 65 пациенти со АЛЛ со токсичните ефекти при третманот со метотрексат, направени се споредби на фреквенциите на генотиповите и на алелите, засебно, со фреквенциите на пациентите кај кои се јавиле соодветните токсични ефекти.

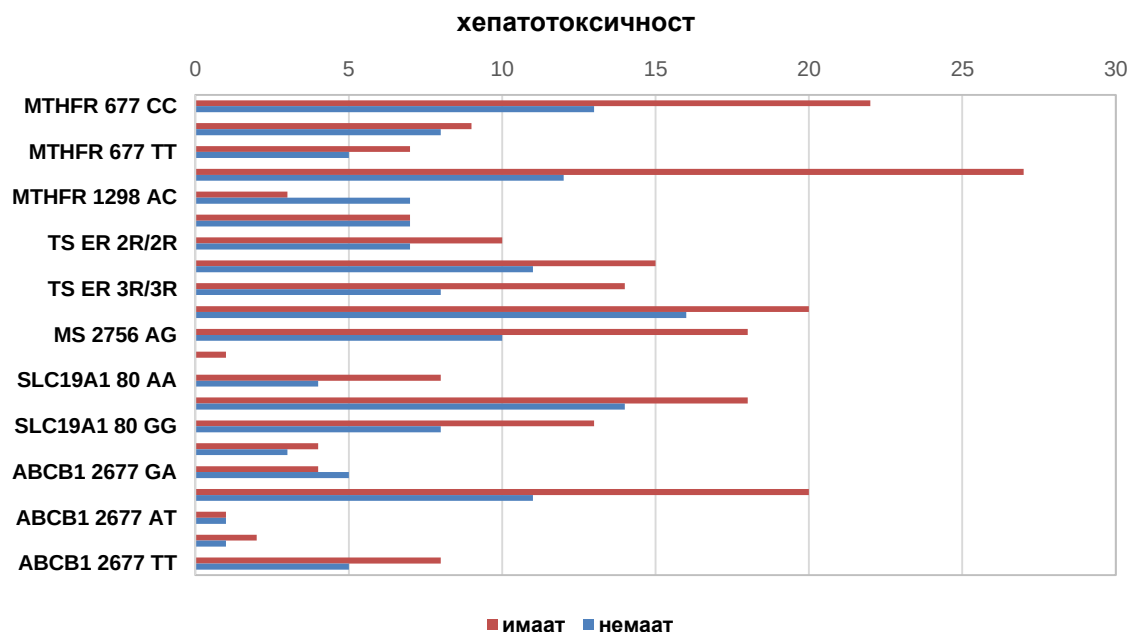
Во првиот дел од резултатите, прикажани се споредбите на фреквенциите на испитаниците со дивiot генотип, со хетерозиготниот, како и со варијантниот генотип за секој полиморфизам, поединечно, од една страна, со отсуството или присуството на определен токсичен ефект, независно од неговиот градус, односно, интензитет, од друга страна.

Резултатите се прикажани во **табелите 4.23-4.31** и на **графиконите 4.30-4.38**

Табела 4.23: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при хепатотоксичен ефект во тек и по завршување на терапијата со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	22	13	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	9	8	0,467	0,494	0,665 (0,21 - 2,15)	0,842 (0,50 - 1,41)
	TT	7	5	0,077	0,781	0,827 (0,22 - 3,15)	0,928 (0,54 - 1,60)
MTHFR 1298	AA	27	12	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	3	7	5,160	0,023*	0,190 (0,04 - 0,87)	0,433 (0,16 - 1,14)
	CC	7	7	1,657	0,198	0,444 (0,13 - 1,55)	0,722 (0,41 - 1,27)
TS ER	2R/2R	10	7	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	15	11	0,005	0,941	0,955 (0,28 - 3,30)	0,981 (0,59 - 1,64)
	3R/3R	14	8	0,094	0,759	1,225 (0,33 - 4,49)	1,082 (0,65 - 1,80)
MS 2756	AA	20	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	18	10	0,498	0,759	1,440 (0,52 - 3,97)	1,157 (0,77 - 1,73)
	GG	1	0	0,783	0,481	н.п.	1,800 (1,34 - 2,41)
SLC19A 1 80	AA	8	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	18	14	0,392	0,531	0,643 (0,16 - 2,58)	0,844 (0,51 - 1,40)
	GG	13	8	0,075	0,784	0,813 (0,18 - 3,60)	0,929 (0,55 - 1,57)
ABCB1 2677	GG	4	3	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	4	5	0,254	0,614	0,600 (0,08 - 4,40)	0,778 (0,29 - 2,06)
	GT	20	11	0,133	0,715	1,364 (0,26 - 7,23)	1,129 (0,56 - 2,26)
	AT	1	1	0,032	0,858	0,750 (0,03 - 17,51)	0,875 (0,19 - 4,03)
	AA	2	1	0,079	0,778	1,500 (0,09 - 25,39)	1,167 (0,42 - 3,25)
	TT	8	5	0,037	0,848	1,200 (0,19 - 7,77)	1,077 (0,50 - 2,33)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивот (неваријантен) генотип се референтниво однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



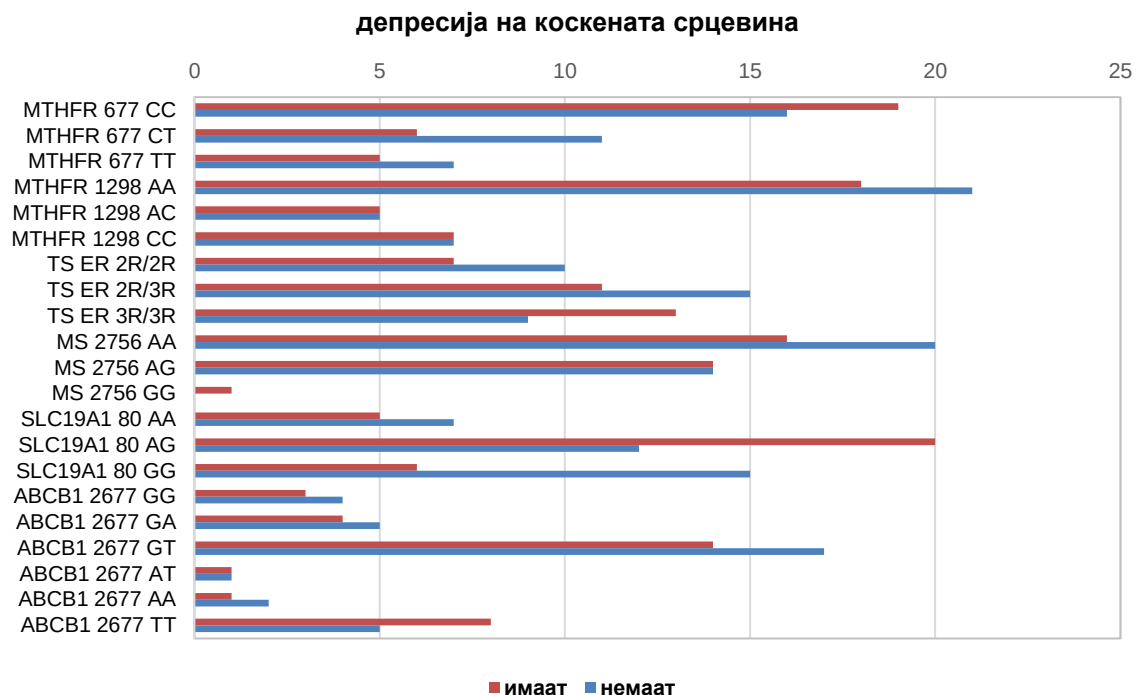
Графикон 4.30: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти соАЛЛ при хепатотоксичен ефект по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на хепатотоксичност во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена статистички сигнификантна разлика во застапеноста на ***MTHFR1298CC*** полиморфизмот кај пациентите кои не манифестираше хепатотоксичност [*OR* (95%CI) 0,190 (0,04 - 0,87) *RR* (95%CI) 0,433 (0,16 - 1,14), $p=0,023$].

Табела 4.24: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при депресија на коскената срцевина по третманот со метотрексат

полимор-физам	геноти-п	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	19	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	6	11	1,653	0,199	0,459 (0,14 - 1,52)	0,650 (0,32 - 1,32)
	TT	5	7	0,569	0,450	0,602 (0,16 - 2,27)	0,768 (0,37 - 1,60)
MTHFR 1298	AA	18	21	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	5	5	0,047	0,828	1,167 (0,29 - 4,69)	1,083 (0,53 - 2,20)
	CC	7	7	0,061	0,805	1,167 (0,34 - 3,96)	1,083 (0,58 - 2,02)
TS ER	2R/2R	7	10	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	11	15	0,005	0,941	1,048 (0,30 - 3,62)	1,027 (0,50 - 2,12)
	3R/3R	13	9	1,232	0,267	2,063 (0,57 - 7,47)	1,435 (0,74 - 2,79)
MS 2756	AA	16	20	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	14	14	0,195	0,267	1,250 (0,46 - 3,37)	1,125 (0,67 - 1,89)
	GG	1	0	1,209	0,659	н.п.	2,250 (1,56 - 3,24)
SLC19A 1 80	AA	5	7	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	20	12	1,544	0,214	2,333 (0,60 - 9,02)	1,500 (0,73 - 3,09)
	GG	6	15	0,589	0,443	0,560 (0,13 - 2,48)	0,686 (0,26 - 1,78)
ABCB1 2677	GG	3	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	4	5	0,004	0,949	1,067 (0,15 - 7,82)	1,037 (0,34 - 3,19)
	GT	14	17	0,012	0,912	1,098 (0,21 - 5,75)	1,054 (0,41 - 2,70)
	AT	1	1	0,032	0,858	1,333 (0,06 - 31,12)	1,167 (0,23 - 5,95)
	AA	1	2	0,079	0,778	0,667 (0,04 - 11,29)	0,778 (0,13 - 4,77)
	TT	8	5	0,642	0,423	2,133 (0,33 - 13,81)	1,436 (0,55 - 3,74)

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтни во однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



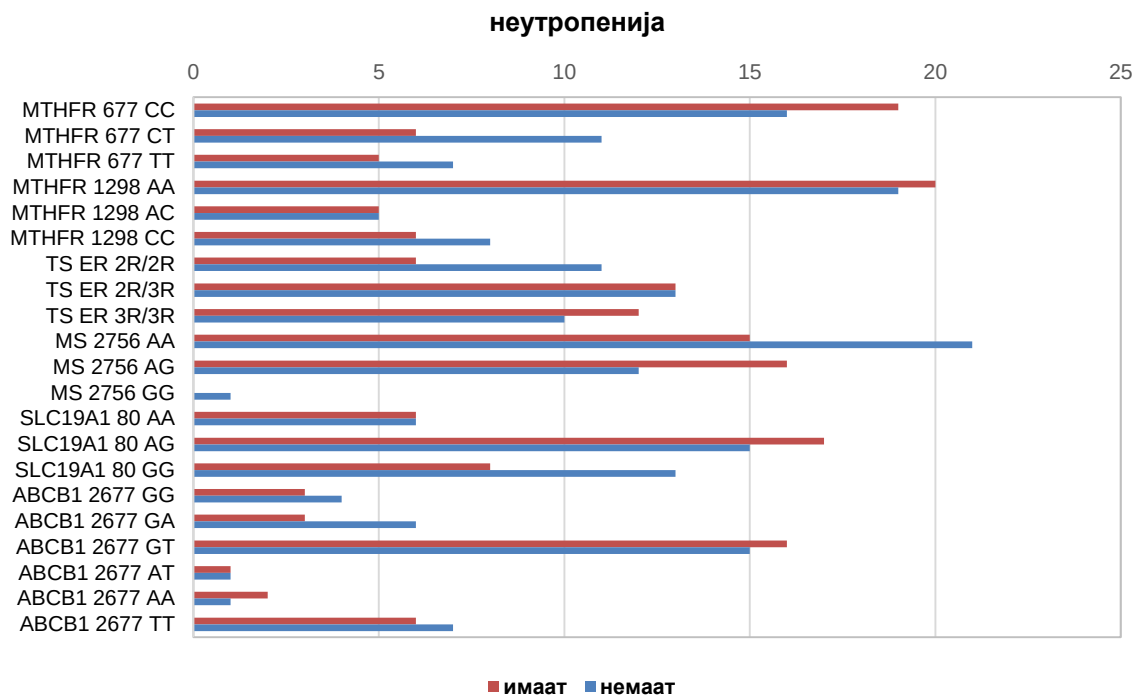
Графикон 4.31: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при депресија на коскената срцевина по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на депресија на коскената срцевина во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена поголема застапеност на **SLC19A1 80GG** полиморфизмот кај пациентите кои манифестирале депресија на коскената срцевина [OR (95%CI) 2,333 (0,60 – 9,02) RR (95%CI) 1,500 (0,73 – 3,09), $p=0,214$] и на **ABCB1 2677 TT** полиморфизмот [OR (95%CI) 2,133 (0,33 – 13,81) RR (95%CI) 1,436 (0,55 – 3,74), $p=0,423$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.25: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	19	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	6	11	1,653	0,199	0,459 (0,14 - 1,52)	0,650 (0,32 - 1,32)
	TT	5	7	0,569	0,450	0,602 (0,16 - 2,27)	0,768 (0,37 - 1,60)
MTHFR 1298	AA	20	19	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	5	5	0,005	0,942	0,950 (0,24 - 3,81)	0,975 (0,49 - 1,95)
	CC	6	8	0,293	0,589	0,713 (0,21 - 2,44)	0,836 (0,42 - 1,65)
TS ER	2R/2R	6	11	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	13	13	0,901	0,342	1,833 (0,52 - 6,45)	1,417 (0,67 - 3,00)
	3R/3R	12	10	1,430	0,232	2,200 (0,60 - 8,08)	1,545 (0,73 - 3,27)
MS 2756	AA	15	21	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	16	12	1,510	0,232	1,867 (0,69 - 5,07)	1,371 (0,83 - 2,27)
	GG	0	1	0,701	0,219	н.п.	н.п.
SLC19A 1 80	AA	6	6	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	17	15	0,034	0,853	1,133 (0,30 - 4,28)	1,063 (0,55 - 2,04)
	GG	8	13	0,443	0,506	0,615 (0,15 - 2,58)	0,762 (0,35 - 1,67)
ABCB1 2677	GG	3	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	3	6	0,152	0,696	0,667 (0,09 - 5,13)	0,778 (0,22 - 2,74)
	GT	16	15	0,175	0,676	1,422 (0,27 - 7,44)	1,204 (0,48 - 3,02)
	AT	1	1	0,032	0,858	1,333 (0,06 - 31,12)	1,167 (0,23 - 5,95)
	AA	2	1	0,476	0,490	2,667 (0,16 - 45,14)	1,556 (0,48 - 5,02)
	TT	6	7	0,020	0,888	1,143 (0,18 - 7,28)	1,077 (0,38 - 3,04)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтни во однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



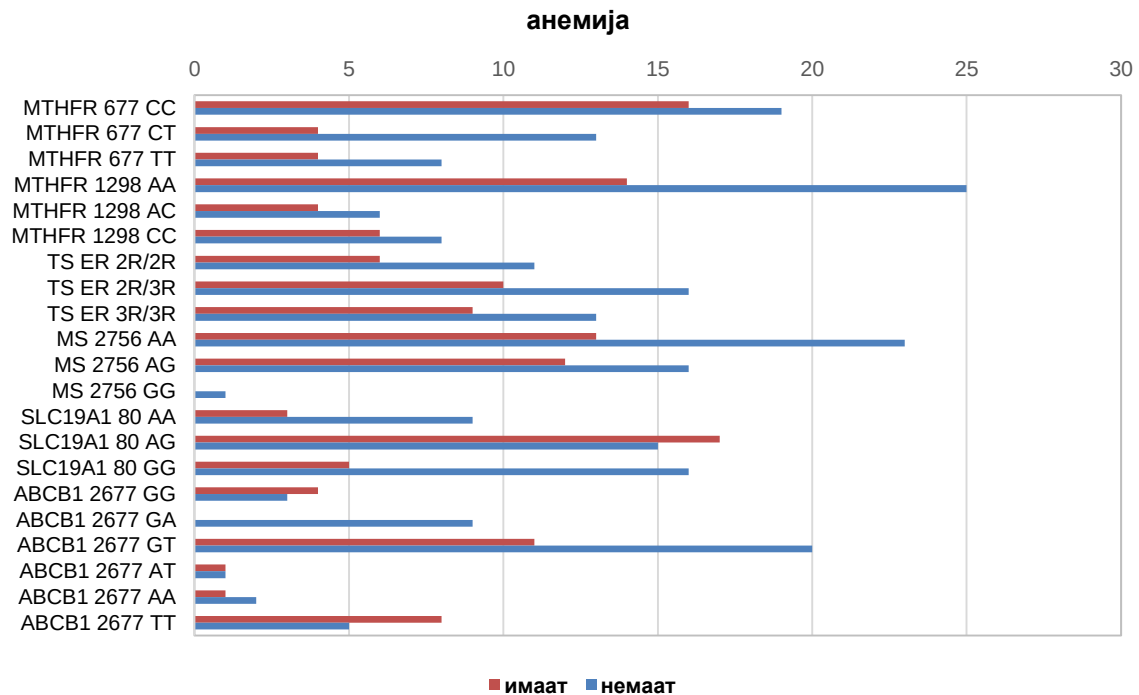
Графикон 4.32: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти соАЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на неутропенија во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена поголема застапеност на **TS ER3R/3R** полиморфизмот кај пациентите кои манифестираа неутропенија [OR (95%CI) 2,200 (0,60 – 8,08) RR (95%CI) 1,545 (0,73 – 3,27), $p=0,232$] и на **ABCB1 2677 AA** полиморфизмот [OR (95%CI) 2,667 (0,16 – 45,14) RR (95%CI) 1,556 (0,48 – 5,02), $p=0,490$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.26: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при анемија по третманот со метотрексат

полимор-физам	геноти-п	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	16	19	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	4	13	2,379	0,123	0,365 (0,10 - 1,34)	0,515 (0,20 - 1,30)
	TT	4	8	0,560	0,454	0,594 (0,15 - 2,34)	0,729 (0,30 - 1,75)
MTHFR 1298	AA	14	25	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	4	6	0,058	0,810	1,190 (0,29 - 4,95)	1,114 (0,47 - 2,65)
	CC	6	8	0,212	0,645	1,339 (0,39 - 4,65)	1,194 (0,57 - 2,49)
TS ER	2R/2R	6	11	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	10	16	0,044	0,834	1,146 (0,32 - 4,08)	1,090 (0,49 - 2,44)
	3R/3R	9	13	0,128	0,721	1,269 (0,34 - 4,70)	1,159 (0,51 - 2,62)
MS 2756	AA	13	23	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	12	16	0,301	0,721	1,327 (0,48 - 3,65)	1,187 (0,65 - 2,18)
	GG	0	1	0,557	0,583	н.п.	н.п.
SLC19A 1 80	AA	3	9	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	17	15	2,784	0,095	3,400 (0,77 - 14,93)	2,125 (0,76 - 5,97)
	GG	5	16	0,006	0,939	0,938 (0,18 - 4,87)	0,952 (0,27 - 3,30)
ABCB1 2677	GG	4	3	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	0	9	6,857	0,009*	н.п.	н.п.
	GT	11	20	1,121	0,290	0,413 (0,08 - 2,19)	0,621 (0,28 - 1,38)
	AT	1	1	0,032	0,858	0,750 (0,03 - 17,51)	0,875 (0,19 - 4,03)
	AA	1	2	0,476	0,490	0,375 (0,02 - 6,35)	0,583 (0,10 - 3,27)
	TT	8	5	0,037	0,848	1,200 (0,19 - 7,77)	1,077 (0,50 - 2,33)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтни во однос на
 хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



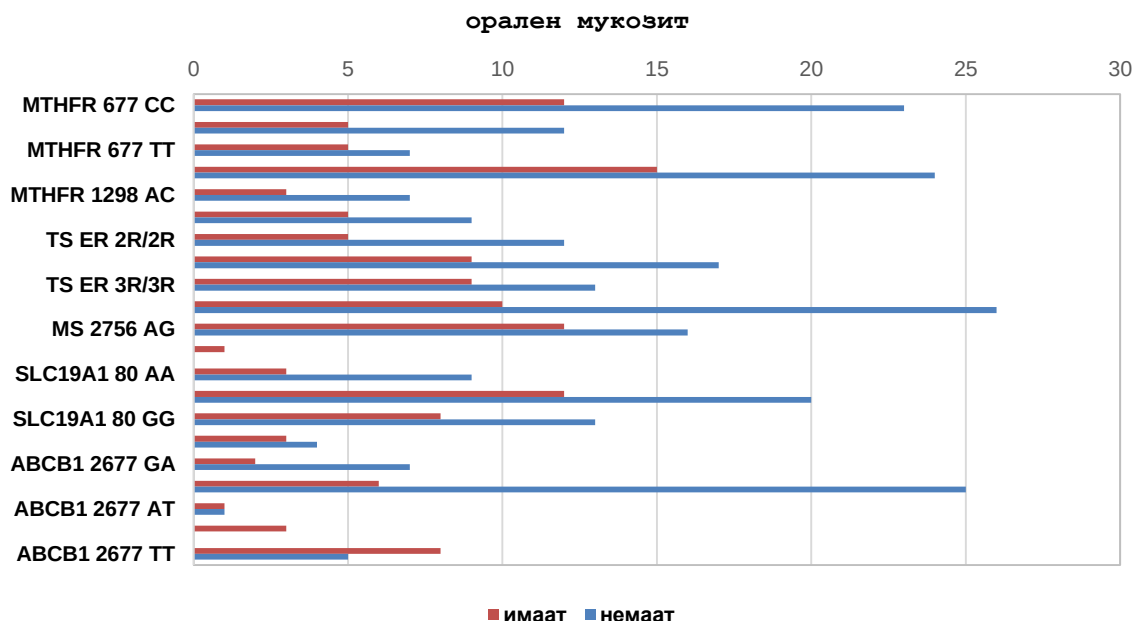
Графикон 4.33: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти соАЛЛ прианемија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на анемија во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена сигнификантна разлика во застапеноста на **ABCB1 2677 GA** полиморфизмот, но истата беше непресметлива заради малиот број на индивидуи. Исто така **SLC19A1 80 AG** полиморфизмот беше позастапен кај пациентите со анемија [OR (95%CI) 3,400 (0,77 – 14,93) RR (95%CI) 2,125 (0,76 – 5,97), $p=0,095$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.27: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при орален мукозитис по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	12	23	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	5	12	0,124	0,725	0,799 (0,23 - 2,80)	0,858 (0,36 - 2,04)
	TT	5	7	0,211	0,646	1,369 (0,36 - 5,25)	1,215 (0,54 - 2,74)
MTHFR 1298	AA	15	24	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	3	7	0,245	0,620	0,686 (0,15 - 3,07)	0,780 (0,28 - 2,18)
	CC	5	9	0,033	0,856	0,889 (0,25 - 3,16)	0,929 (0,41 - 2,08)
TS ER	2R/2R	5	12	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	9	17	0,127	0,722	1,271 (0,34 - 4,75)	1,177 (0,48 - 2,91)
	3R/3R	9	13	0,551	0,458	1,662 (0,43 - 6,38)	1,391 (0,57 - 3,39)
MS 2756	AA	10	26	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	12	16	1,588	0,458	1,950 (0,69 - 5,54)	1,543 (0,78 - 3,04)
	GG	1	0	2,429	0,208	н.п.	3,600 (2,13 - 6,10)
SLC19A1 80	AA	3	9	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	12	20	0,607	0,436	1,800 (0,41 - 7,99)	1,500 (0,51 - 4,40)
	GG	8	13	0,589	0,443	1,846 (0,38 - 8,93)	1,524 (0,50 - 4,68)
ABCB1 2677	GG	3	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	2	7	0,780	0,377	0,381 (0,04 - 3,34)	0,519 (0,12 - 2,31)
	GT	6	25	1,745	0,186	0,320 (0,06 - 1,83)	0,452 (0,15 - 1,38)
	AT	1	1	0,032	0,858	1,333 (0,06 - 31,12)	1,167 (0,23 - 5,95)
	AA	3	0	2,857	0,091	н.п.	2,333 (0,99 - 5,49)
	TT	8	5	0,642	0,423	2,133 (0,33 - 13,81)	1,436 (0,55 - 3,74)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивниот (неваријантен) генотип се референтниво однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



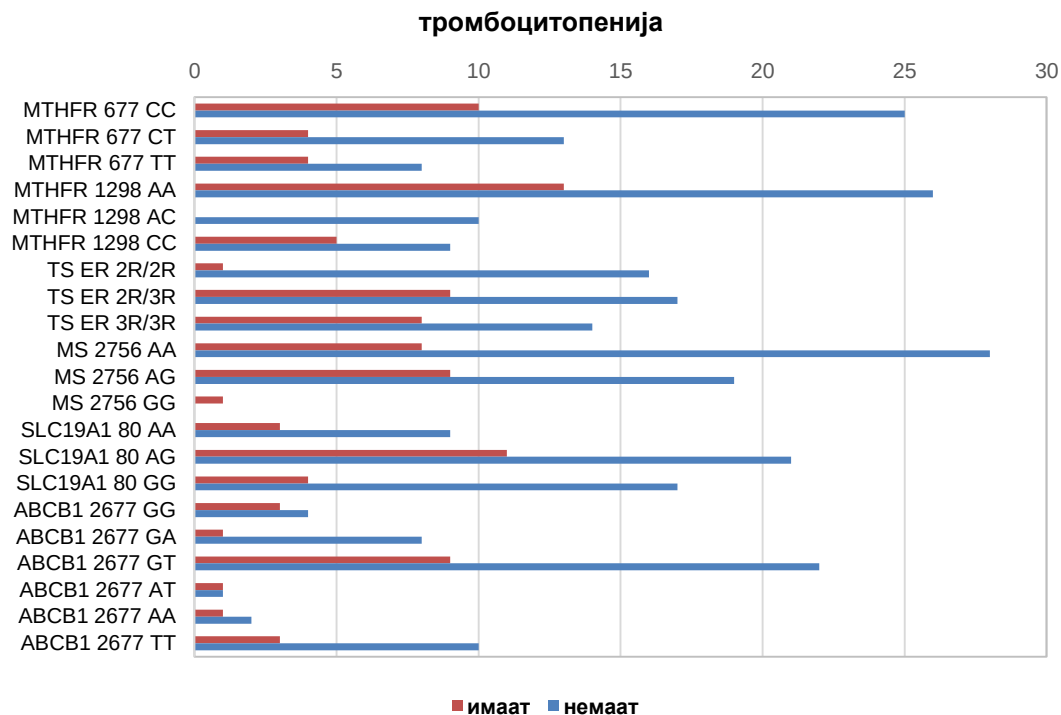
Графикон 4.34: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти соАЛЛ при орален мукозитис по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на орален мукозит во тек и по завршување на терапијата со МТХ не беше утврдена разлика во застапеноста на испитуваните генотипови меѓу пациентите со и без манифестација на орален мукозит.

Табела 4.28: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при тромбоцитопенија по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95% CI)	релативен ризик RR (95% CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	10	25	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	4	13	0,148	0,701	0,769 (0,20 - 2,94)	0,824 (0,30 - 2,25)
	TT	4	8	0,097	0,756	1,250 (0,31 - 5,10)	1,167 (0,45 - 3,04)
MTHFR 1298	AA	13	26	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	0	10	4,537	0,033*	н.п.	н.п.
	CC	5	9	0,026	0,872	1,111 (0,31 - 4,00)	1,071 (0,47 - 2,46)
TS ER	2R/2R	1	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	9	17	4,755	0,029*	8,471 (0,96 - 74,63)	5,885 (0,82 - 42,34)
	3R/3R	8	14	5,019	0,025*	9,143 (1,01 - 82,45)	6,182 (0,85 - 44,78)
MS 2756	AA	8	28	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	9	19	0,795	0,025*	1,658 (0,54 - 5,06)	1,446 (0,64 - 3,27)
	GG	1	0	3,198	0,373	н.п.	4,500 (2,44 - 8,29)
SLC19A 1 80	AA	3	9	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	11	21	0,354	0,552	1,571 (0,35 - 7,02)	1,375 (0,46 - 4,09)
	GG	4	17	0,162	0,687	0,706 (0,13 - 3,87)	0,762 (0,20 - 2,85)
ABCB1 2677	GG	3	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	1	8	2,116	0,146	0,167 (0,01 - 2,16)	0,259 (0,03 - 1,99)
	GT	9	22	0,505	0,477	0,545 (0,10 - 2,94)	0,677 (0,24 - 1,87)
	AT	1	1	0,032	0,858	1,333 (0,06 - 31,12)	1,167 (0,23 - 5,95)
	AA	1	2	0,079	0,778	0,667 (0,04 - 11,29)	0,778 (0,13 - 4,77)
	TT	3	10	0,848	0,357	0,400 (0,06 - 2,89)	0,538 (0,15 - 2,00)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивниот (неваријантен) генотип се референтни во однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



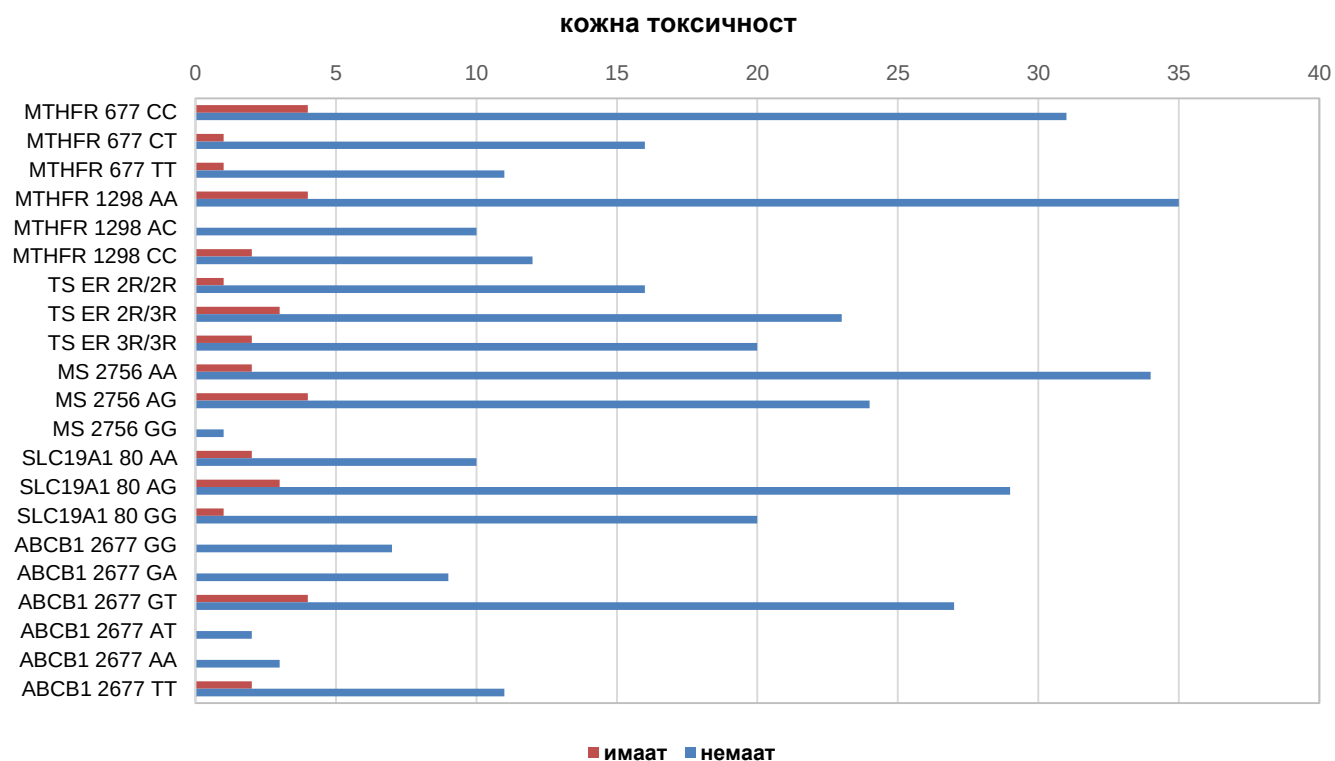
Графикон 4.35: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти соАЛЛ притромбоцитопенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на тромбоцитопенија во тек и по завршување на терапијата со MTX беше утврдена статистички сигнификантна разлика во застапеноста на ***MTHFR 1298 AC*** $p=0,033$, ***TS ER 2R/3R*** [OR (95%CI) 8,471 (0,96 – 74,63) RR (95%CI) 5,885 (0,82 – 42,34), $p=0,029$], ***TS ER 3R/3R*** [OR (95%CI) 9,143 (1,01 – 82,45) RR (95%CI) 6,182 (0,85 – 44,78), $p=0,025$] и ***MS 2756 AG*** [OR (95%CI) 1,658 (0,54 – 5,06) RR (95%CI) 1,446 (0,64 – 3,27), $p=0,025$]

Табела 4.29: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95% CI)	релативен ризик RR (95% CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	4	31	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	1	16	0,405	0,525	0,484 (0,05 - 4,70)	0,515 (0,06 - 4,26)
	TT	1	11	0,090	0,764	0,705 (0,07 - 7,00)	0,729 (0,09 - 5,90)
MTHFR 1298	AA	4	35	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	0	10	1,117	0,291	н.п.	н.п.
	CC	2	12	0,167	0,683	1,458 (0,24 - 9,00)	1,393 (0,29 - 6,79)
TS ER	2R/2R	1	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	3	23	0,390	0,532	2,087 (0,20 - 21,91)	1,962 (0,22 - 17,34)
	3R/3R	2	20	0,139	0,709	1,600 (0,13 - 19,28)	1,545 (0,15 - 15,66)
MS 2756	AA	2	34	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	4	24	1,413	0,709	2,833 (0,48 - 16,73)	2,571 (0,51 - 13,05)
	GG	0	1	0,059	0,235	н.п.	н.п.
SLC19A 1 80	AA	2	10	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	3	29	0,461	0,497	0,517 (0,08 - 3,56)	0,563 (0,11 - 2,96)
	GG	1	20	1,310	0,252	0,250 (0,02 - 3,10)	0,286 (0,03 - 2,83)
ABCB1 2677	GG	0	7	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	0	9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
	GT	4	27	1,009	0,315	н.п.	н.п.
	AT	0	2	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
	AA	0	3	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
	TT	2	11	1,197	0,274	н.п.	н.п.

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивот (неваријантен) генотип се референтни во однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



Графикон 4.36: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници

При евалуација на поврзаност на испитуваните генотипови со појавата на кожна токсичност во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена разлика во застапеноста на **MS 2756 AG** [*OR* (95%CI) 2,833 (0,48 – 16,73) *RR* (95%CI)2,571 (0,51 – 13,05), $p=0,709$] и на **TS ER 2R/3R** генотипот [*OR* (95%CI)2,087 (0,20 – 21,91) *RR* (95%CI) 1,962 (0,22 – 17,34), $p=0,532$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.30: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при интестинален мукозитис по третманот со метотрексат

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	3	32	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	0	17	1,546	0,214	н.п.	н.п.
	TT	2	10	0,616	0,433	2,133 (0,31 - 14,62)	1,944 (0,37 - 10,28)
MTHFR 1298	AA	4	35	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	1	9	0,001	0,981	0,972 (0,10 - 9,80)	0,975 (0,12 - 7,79)
	CC	0	14	1,553	0,213	н.п.	н.п.
TS ER	2R/2R	1	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	2	24	0,052	0,820	1,333 (0,11 - 15,96)	1,308 (0,13 - 13,32)
	3R/3R	2	20	0,139	0,709	1,600 (0,13 - 19,28)	1,545 (0,15 - 15,66)
MS 2756	AA	2	34	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	3	25	0,582	0,709	2,040 (0,32 - 13,13)	1,929 (0,35 - 10,77)
	GG	0	1	0,059	0,446	н.п.	н.п.
SLC19A 1 80	AA	2	10	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	2	30	1,146	0,284	0,333 (0,04 - 2,69)	0,375 (0,06 - 2,37)
	GG	1	20	1,310	0,252	0,250 (0,02 - 3,10)	0,286 (0,03 - 2,83)
ABCB1 2677	GG	1	6	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	0	9	1,371	0,242	н.п.	н.п.
	GT	2	29	0,482	0,488	0,414 (0,03 - 5,33)	0,452 (0,05 - 4,31)
	AT	0	2	0,321	0,571	н.п.	н.п.
	AA	0	3	0,476	0,490	н.п.	н.п.
	TT	2	11	0,004	0,948	1,091 (0,08 - 14,66)	1,077 (0,12 - 9,89)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтниво однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



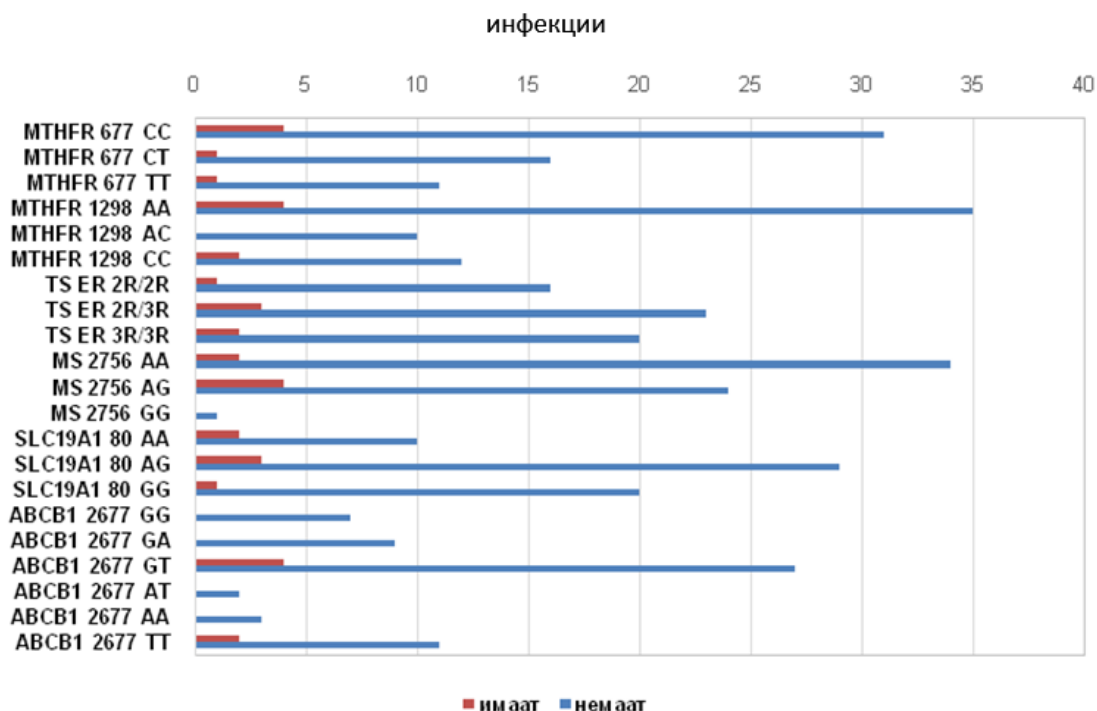
Графикон 4.37: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при интестинален мукозитис по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на интестинален мукозит во тек и по завршување на терапијата со MTX беше утврдена разлика во застапеноста на **MTHFR 677 TT** генотипот [$OR(95\%CI) 2,133 (0,31 - 14,62)$ $RR (95\%CI) 1,944 (0,37 - 10,28)$, $p=0,433$] и на **MS 2756 AG** генотипот [$OR (95\%CI) 2,040 (0,32 - 13,13)$ $RR (95\%CI) 1,929 (0,35 - 10,77)$, $p=0,709$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.31: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при инфекцииво текот или непосредно по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичк а разлика		однос на шанси OR (95% CI)	релативен ризик RR (95% CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	19	16	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	13	4	2,379	0,123	2,737 (0,74 - 10,07)	1,409 (0,94 - 2,11)
	TT	9	3	1,592	0,207	2,526 (0,58 - 10,95)	1,382 (0,88 - 2,16)
MTHFR 1298	AA	25	14	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	9	1	2,513	0,113	5,040 (0,58 - 44,02)	1,404 (1,03 - 1,92)
	CC	7	7	0,856	0,355	0,560 (0,16 - 1,93)	0,780 (0,44 - 1,38)
TS ER	2R/2R	11	6	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	15	11	0,212	0,646	0,744 (0,21 - 2,63)	0,892 (0,55 - 1,44)
	3R/3R	16	6	0,290	0,590	1,455 (0,37 - 5,71)	1,124 (0,73 - 1,74)
MS 2756	AA	24	12	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	17	11	0,242	0,590	0,773 (0,28 - 2,16)	0,911 (0,62 - 1,33)
	GG	1	0	0,493	0,622	н.п.	1,500 (1,19 - 1,89)
SLC19A 1 80	AA	8	4	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	23	9	0,114	0,736	1,278 (0,31 - 5,32)	1,078 (0,68 - 1,70)
	GG	11	10	0,638	0,424	0,550 (0,13 - 2,40)	0,786 (0,44 - 1,39)
ABCB1 2677	GG	4	3	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	5	4	0,004	0,949	0,938 (0,13 - 6,87)	0,972 (0,41 - 2,32)
	GT	20	11	0,133	0,715	1,364 (0,26 - 7,23)	1,129 (0,56 - 2,26)
	AT	1	1	0,032	0,858	0,750 (0,03 - 17,51)	0,875 (0,19 - 4,03)
	AA	2	1	0,079	0,778	1,500 (0,09 - 25,39)	1,167 (0,42 - 3,25)
	TT	10	3	0,848	0,357	2,500 (0,35 - 18,04)	1,346 (0,66 - 2,73)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтниво однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



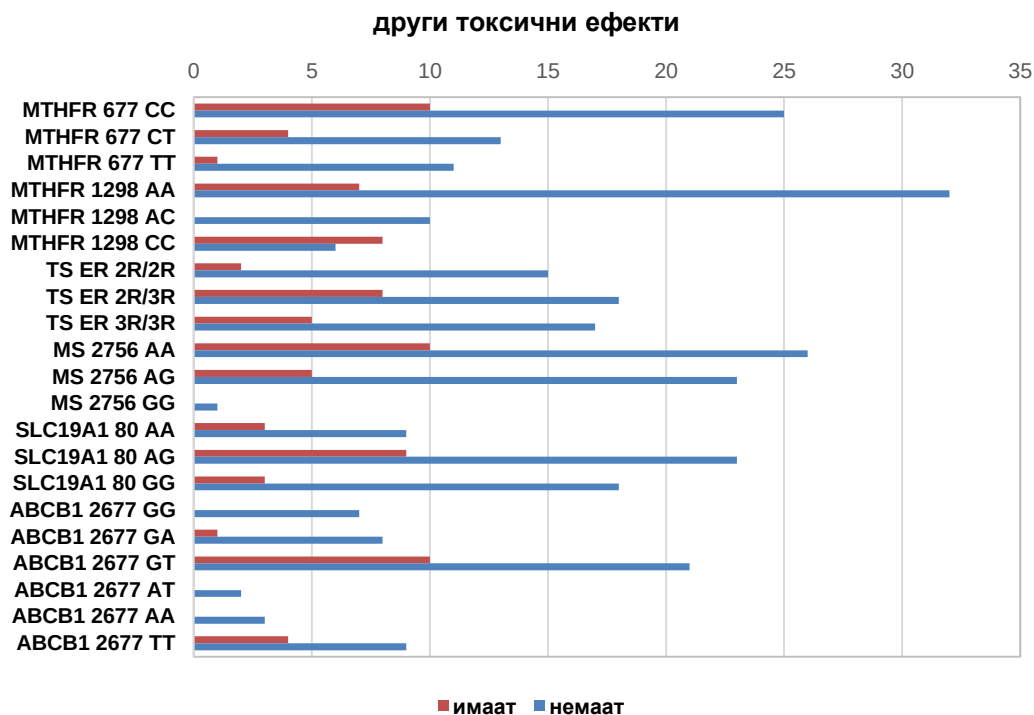
Графикон 4.38: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при инфекцији во текот или непосредно по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на инфекции во тек и по завршување на терапијата со МТХ беше утврдена разлика во застапеноста на **MTHFR 677 CT** генотипот [OR (95%CI) 2,737 (0,74 – 10,07) RR (95%CI) 1,409 (0,94 – 2,11), $p=0,123$] и на **MTHFR 677 TT** генотипот [OR (95%CI) 2,526 (0,58 – 10,95) RR (95%CI) 1,382 (0,88 – 2,16), $p=0,207$] во однос на **MTHFR 677 CC** генотипот, потоа на **MTHFR 1298 AC** генотипот во однос на **MTHFR 1298 AA** и **MTHFR 1298 CC** генотипот [OR (95%CI) 5,040 (0,58 – 44,02) RR (95%CI) 1,404 (1,03 – 1,92), $p=0,113$] и на **ABCB1 2677 TT** генотипот во однос на останатите генотипови од **ABCB1 2677** полиморфизмот [OR (95%CI) 2,500 (0,35 – 18,04) RR (95%CI) 1,346 (0,66 – 2,73)] без статистичка сигнификантност.

Табела 4.32: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти** по третманот со метотрексат

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	10	25	реф.	реф.	реф.	реф.
	CT	4	13	0,148	0,701	0,769 (0,20 - 2,94)	0,824 (0,30 - 2,25)
	TT	1	11	2,042	0,153	0,227 (0,03 - 2,00)	0,292 (0,04 - 2,05)
MTHFR 1298	AA	7	32	реф.	реф.	реф.	реф.
	AC	0	10	2,094	0,148	н.п.	н.п.
	CC	8	6	7,799	0,005*	6,095 (1,60 - 23,22)	3,184 (1,42 - 7,16)
TS ER	2R/2R	2	15	реф.	реф.	реф.	реф.
	2R/3R	8	18	2,080	0,149	3,333 (0,61 - 18,14)	2,615 (0,63 - 10,86)
	3R/3R	5	17	0,783	0,376	2,206 (0,37 - 13,09)	1,932 (0,43 - 8,77)
MS 2756	AA	10	26	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	5	23	0,864	0,376	0,565 (0,17 - 1,90)	0,643 (0,25 - 1,67)
	GG	0	1	0,381	0,353	н.п.	н.п.
SLC19A1 80	AA	3	9	реф.	реф.	реф.	реф.
	AG	9	23	0,043	0,836	1,174 (0,26 - 5,35)	1,125 (0,36 - 3,47)
	GG	3	18	0,589	0,443	0,500 (0,08 - 2,99)	0,571 (0,14 - 2,40)
ABCB1 2677	GG	0	7	реф.	реф.	реф.	реф.
	GA	1	8	0,830	0,362	н.п.	н.п.
	GT	10	21	3,065	0,080	н.п.	н.п.
	AT	0	2	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
	AA	0	3	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
	TT	4	9	2,692	0,101	н.п.	н.п.

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивниот (неваријантен) генотип се референтниво однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип
 ** други токсични ефекти застапени кај помалку од 2 деца (<5%) од групата за секој ефект: централна и периферна невротоксичност, кардиотоксичност, хеморагичен синдром, дерматитис, артериска хипертензија и нефротоксичност



Графикон 4.39: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

При евалуација на поврзаноста на испитуваните генотипови со појавата на други токсични ефекти во тек и по завршување на терапијата со MTX беше утврдена статистички сигнификантна разлика во застапеноста **MTHFR 1298 CC** генотипот [OR (95%CI) 6,095 (1,60 – 23,22) RR (95%CI) 3,184 (1,42 – 7,16), $p=0,005$]. Исто така беше утврдена поголема застапеност на **TS ER 2R/3R** генотипот [OR (95%CI) 3,333 (0,61 – 18,14) RR (95%CI) 2,615 (0,63 – 10,86), $p=0,149$] и на **TS ER 2R/3R** генотипот [OR (95%CI) 2,206 (0,37 – 13,09) RR (95%CI) 1,932 (0,43 – 8,77), $p=0,376$], без статистичка сигнификантност.

Поради релативно малиот број на пациенти, споредбите се правени и со бинарни варијабли. Имено, фреквенциите на испитаниците со дивниот генотип или збирот на испитаници со хетерозиготните и варијантните генотипови на секој полиморфизам, од една страна, се споредувани со отсуството или присуството на определен токсичен ефект, независно од неговиот градус, односно, интензитет, од друга страна.

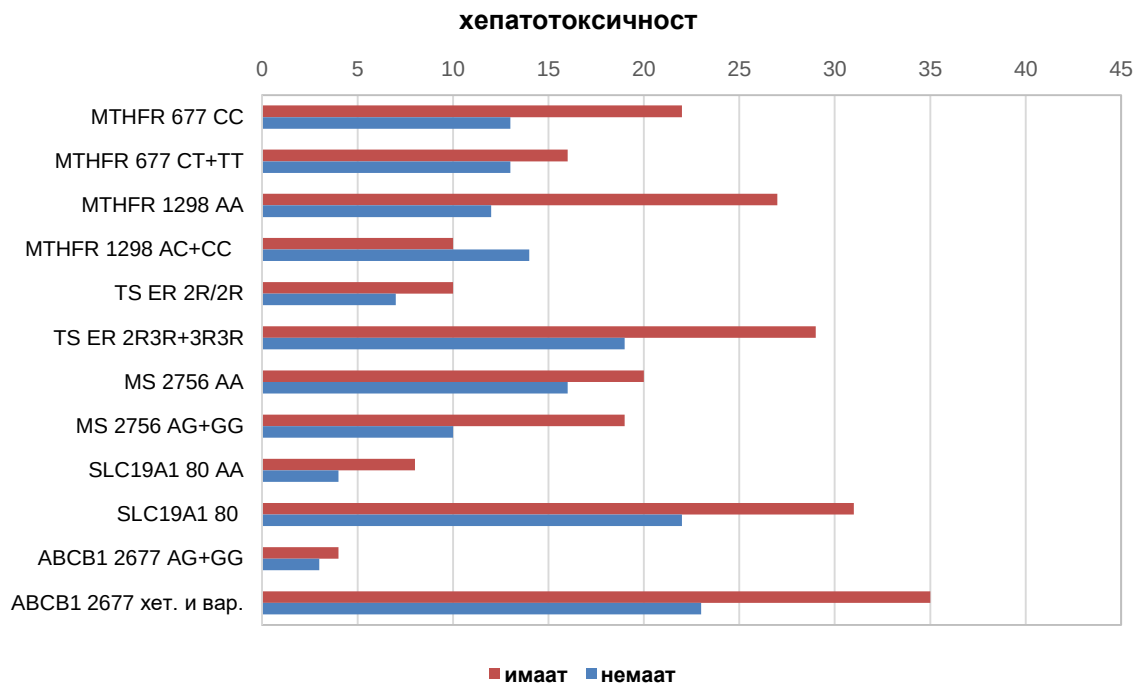
Овие резултати се прикажани понатаму во **табелите 4.32-4.40** и на **графиконите 4.39-4.47**.

Табела 4.33: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при хепатотоксичен ефект по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	22	13	0,388	0,533	0,727 (0,27 - 1,98)	0,878 (0,58 - 1,33)
	CT + TT	16	13				
MTHFR 1298	AA	27	12	4,657	0,031*	0,317 (0,11 - 0,92)	0,602 (0,36 - 1,01)
	AC + CC	10	14				
TSER	2R/2R	10	7	0,013	0,908	1,068 (0,35 - 3,29)	1,027 (0,65 - 1,63)
	2R/3R+3R/3R	29	19				
MS 2756	AA	20	16	0,664	0,415	1,520 (0,55 - 4,17)	1,179 (0,80 - 1,75)
	AG + GG	19	10				
SLC19A1 80	AA	8	4	0,273	0,602	0,705 (0,19 - 2,63)	0,877 (0,55 - 1,39)
	AG + GG	31	22				
ABCB1 2677	GG	4	3	0,027	0,870	1,141 (0,23 - 5,58)	1,056 (0,54 - 2,07)
	хет. и вар. [†]	35	23				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.40: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛП при хепатотоксичен ефект по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

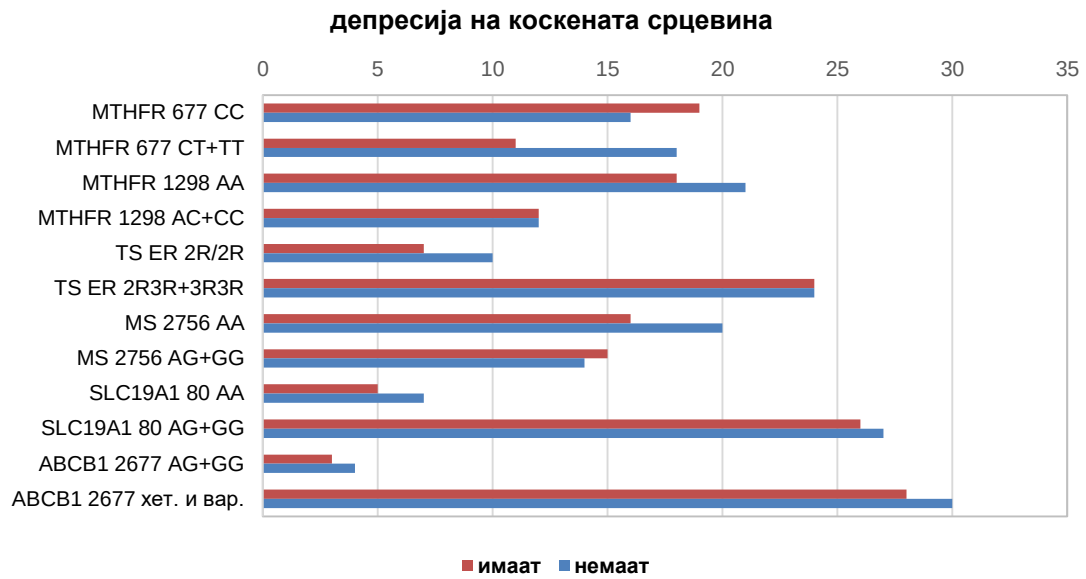
Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на **MTHFR 1298 AC+MTHFR 1298 CC** генотиповите во однос на **MTHFR 1298 AA** генотипот со хепато-токсичноста [*OR* (95%CI) 0,317 (0,11 – 0,92) *RR* (95%CI) 0,602 (0,36 – 1,01), $p=0,031$]

Табела 4.34: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при депресија на коскената срцевина по третманот со метотрексат

полимо р-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	19	16	1,703	0,192	0,515 (0,19 - 1,40)	0,699 (0,40 - 1,22)
	CT + TT	11	18				
MTHFR 1298	AA	18	21	0,088	0,767	1,167 (0,42 - 3,23)	1,083 (0,64 - 1,83)
	AC + CC	12	12				
TS ER	2R/2R	7	10	0,392	0,531	1,429 (0,47 - 4,38)	1,214 (0,64 - 2,29)
	2R/3R+3R/3R	24	24				
MS 2756	AA	16	20	0,341	0,559	1,339 (0,50 - 3,57)	1,164 (0,70 - 1,93)
	AG + GG	15	14				
SLC19A 1 80	AA	5	7	0,214	0,643	1,348 (0,38 - 4,79)	1,177 (0,57 - 2,43)
	AG + GG	26	27				
ABCB1 2677	GG	3	4	0,074	0,786	1,244 (0,26 - 6,06)	1,126 (0,46 - 2,76)
	хет. и вар. [†]	28	30				

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.41: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при депресија на коскената срцевина по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

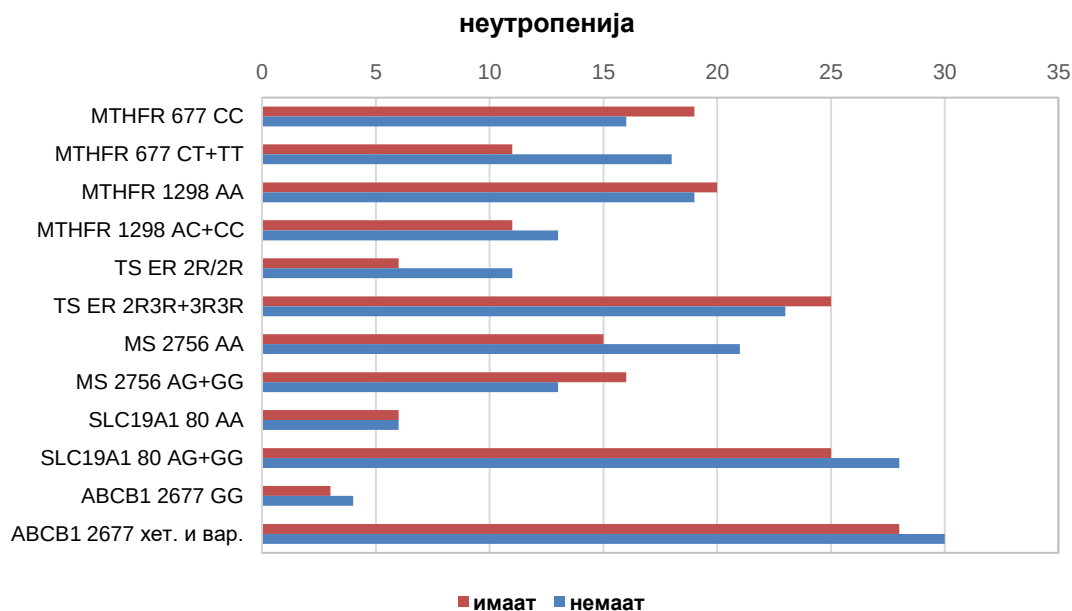
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на генотиповите со депресија на коскената срцевина.

Табела 4.35: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат

полимо р-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	19	16	1,703	0,192	0,515 (0,19 - 1,40)	0,699 (0,40 - 1,22)
	CT + TT	11	18				
MTHFR 1298	AA	20	19	0,176	0,674	0,804 (0,29 - 2,23)	0,894 (0,53 - 1,52)
	AC + CC	11	13				
TS ER	2R/2R	6	11	1,418	0,234	1,993 (0,63 - 6,26)	1,476 (0,73 - 2,97)
	2R/3R+3R/3R	25	23				
MS 2756	AA	15	21	1,174	0,279	1,723 (0,64 - 4,62)	1,324 (0,80 - 2,20)
	AG + GG	16	13				
SLC19A 1 80	AA	6	6	0,031	0,859	0,893 (0,25 - 3,13)	0,943 (0,50 - 1,78)
	AG + GG	25	28				
ABCB1 2677	GG	3	4	0,074	0,786	1,244 (0,26 - 6,06)	1,126 (0,46 - 2,76)
	хет. и вар. [†]	28	30				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA, GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.42: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

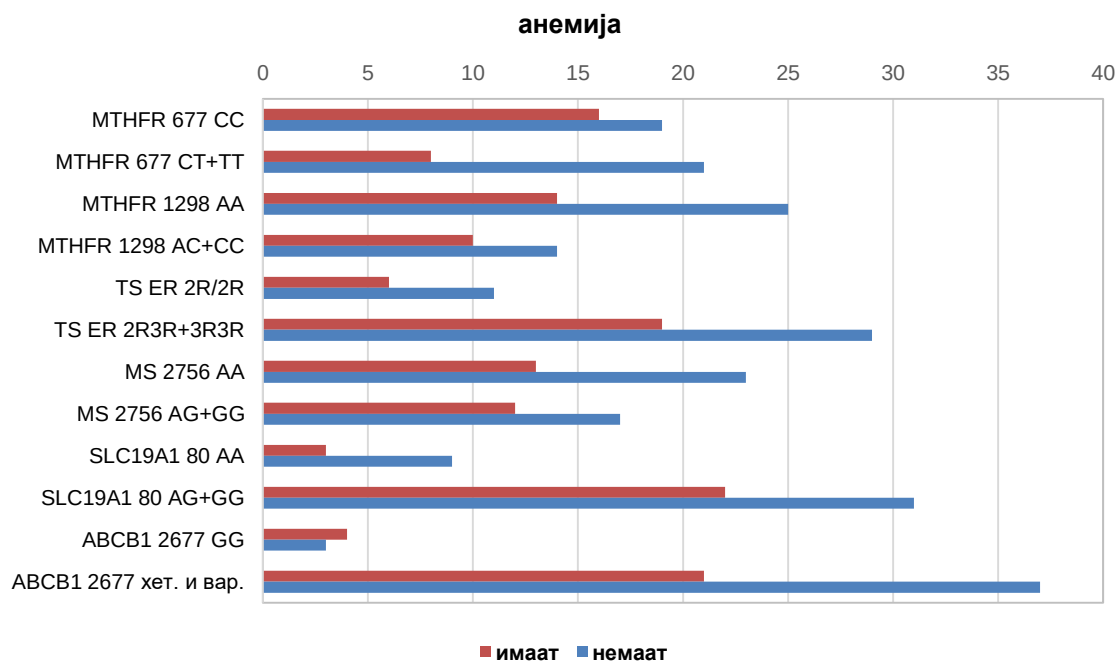
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на генотиповите со неутропенијата.

Табела 4.36: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при анемија по третманот со метотрексат

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	16	19	2,224	0,136	0,452 (0,16 - 1,29)	0,603 (0,30 - 1,20)
	CT + TT	8	21				
MTHFR1 298	AA	14	25	0,210	0,647	1,276 (0,45 - 3,62)	1,161 (0,62 - 2,18)
	AC + CC	10	14				
TS ER	2R/2R	6	11	0,098	0,755	1,201 (0,38 - 3,80)	1,122 (0,54 - 2,33)
	2R/3R+3R/3R	19	29				
MS 2756	AA	13	23	0,188	0,664	1,249 (0,46 - 3,41)	1,146 (0,62 - 2,12)
	AG + GG	12	17				
SLC19A1 80	AA	3	9	1,127	0,288	2,129 (0,52 - 8,78)	1,660 (0,59 - 4,65)
	AG + GG	22	31				
ABCB1 2677	GG	4	3	1,157	0,282	0,426 (0,09 - 2,09)	0,634 (0,31 - 1,31)
	хет. и вар. [†]	21	37				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: GA, GT и AT и варијантни генотипови: AA и TT



Графикон 4.43: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при анемија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

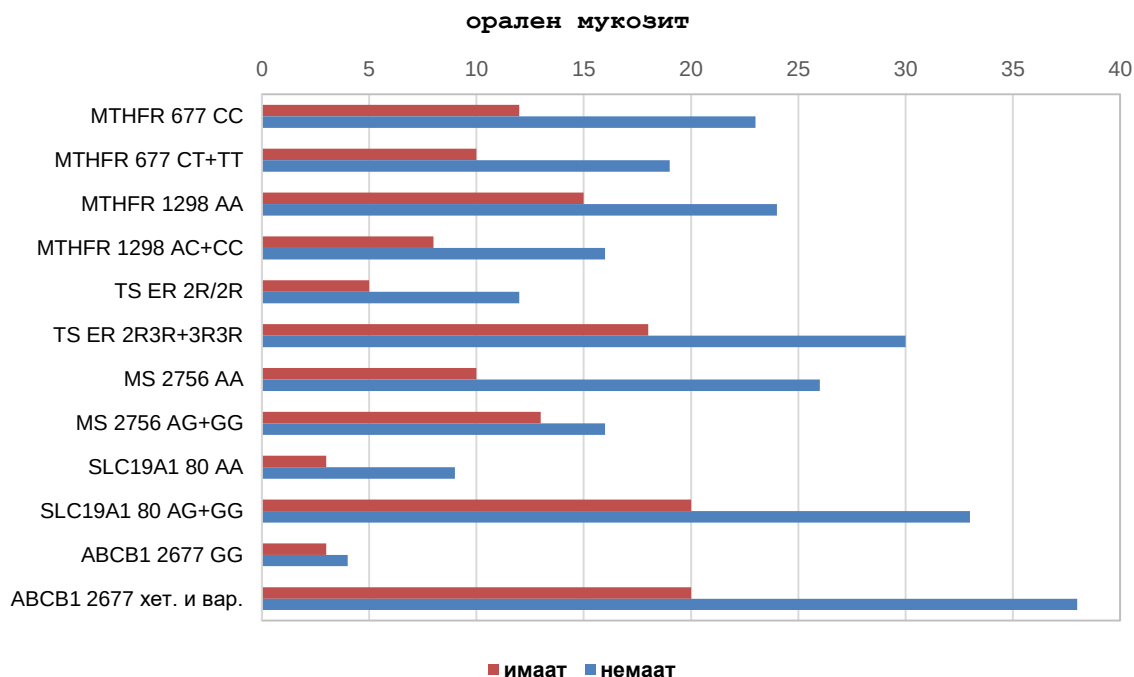
Присатна е разлика во поврзаноста на **SLC19A1 AG +GG** генотиповите со анемија [OR (95%CI) 2,129 (0,52 – 8,78) RR (95%CI) 1,660 (0,59 – 4,65), p=0,288], која не беше статистички сигнификантна.

Табела 4.37: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при орален мукозит по третманот со метотрексат

полимор- физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	12	23	0,000	0,987	1,009 (0,36 - 2,84)	1,006 (0,51 - 1,98)
	CT + TT	10	19				
MTHFR 1298	AA	15	24	0,169	0,681	0,800 (0,28 - 2,32)	0,867 (0,43 - 1,73)
	AC + CC	8	16				
TS ER	2R/2R	5	12	0,359	0,549	1,440 (0,44 - 4,76)	1,275 (0,56 - 2,90)
	2R/3R+3R/3R	18	30				
MS 2756	AA	10	26	2,042	0,153	2,113 (0,75 - 5,94)	1,614 (0,83 - 3,13)
	AG + GG	13	16				
SLC19A1 80	AA	3	9	0,694	0,405	1,818 (0,44 - 7,52)	1,509 (0,53 - 4,27)
	AG + GG	20	33				
ABCB1 2677	GG	3	4	0,192	0,662	0,702 (0,14 - 3,45)	0,805 (0,32 - 2,03)
	хет. и вар. [†]	20	38				

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA, GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.44: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при орален мукозит по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

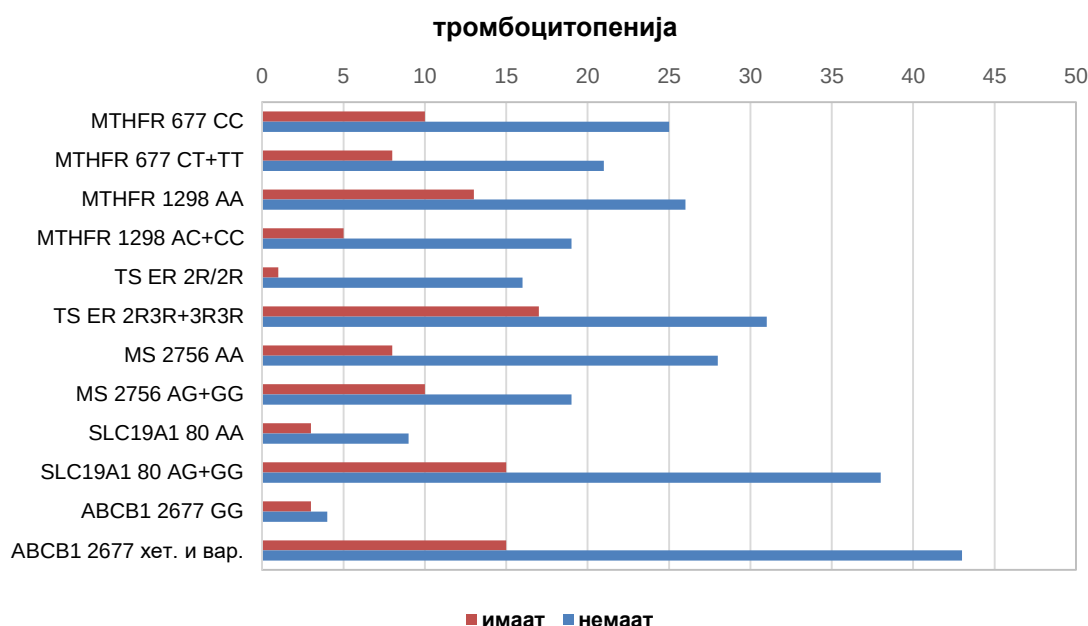
Присатна е разлика во поврзаноста на **MS 2756 AG+GG** генотиповите со орален мукозит [OR (95%CI) 2,113 (0,75 – 5,94) RR (95%CI) 1,614 (0,83 – 3,13), p=0,153], која не беше статистички сигнификантна.

Табела 4.38: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при тромбоцитопенија по третманот со метотрексат

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	10	25	0,008	0,930	0,952 (0,32 - 2,85)	0,966 (0,44 - 2,12)
	CT + TT	8	21				
MTHFR1 298	AA	13	26	1,138	0,286	0,526 (0,16 - 1,73)	0,625 (0,25 - 1,53)
	AC + CC	5	19				
TS ER	2R/2R	1	16	5,469	0,019*	8,774 (1,07 - 72,02)	6,021 (0,87 - 41,88)
	2R/3R+3R/3R	17	31				
MS 2756	AA	8	28	1,206	0,272	1,842 (0,61 - 5,52)	1,552 (0,70 - 3,42)
	AG + GG	10	19				
SLC19A1 80	AA	3	9	0,053	0,817	1,184 (0,28 - 4,98)	1,132 (0,39 - 3,30)
	AG + GG	15	38				
ABCB1 2677	GG	3	4	0,901	0,343	0,465 (0,09 - 2,32)	0,603 (0,23 - 1,58)
	хет. и вар. [†]	15	43				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.45: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при тромбоцитопенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на **TS ER 2R/3R+3R/3R** генотиповите со тромбоцитопенија OR (95%CI) 8,774 (1,07 – 72,02) RR (95%CI) 6,021 (0,87 – 41,88), $p=0,019$.

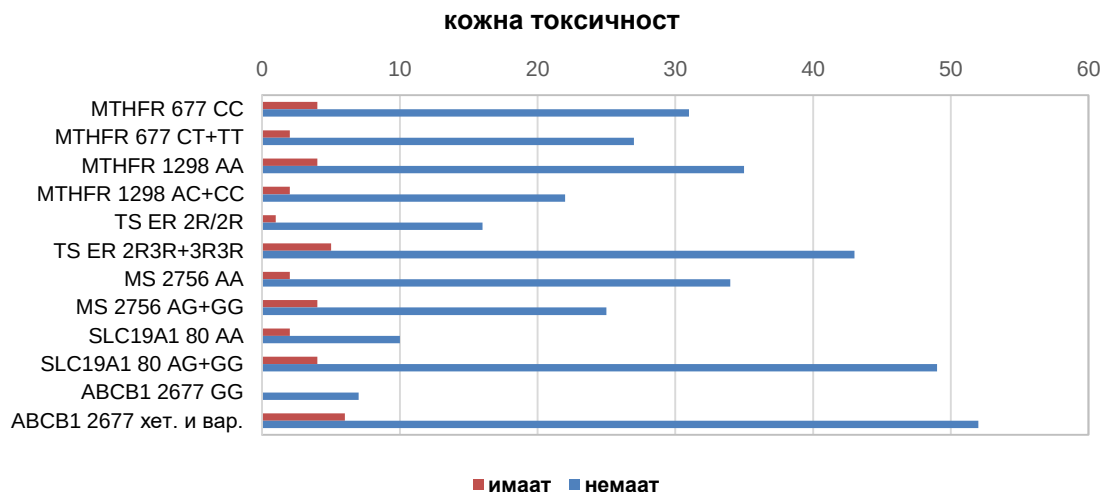
Табела 4.39: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат

полимор- физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
<i>MTHFR</i> 677	CC	4	31	0,383	0,536	0,574 (0,10 - 3,38)	0,603 (0,12 - 3,06)
	CT + TT	2	27				
<i>MTHFR</i> 1298	AA	4	35	0,064	0,801	0,795 (0,13 - 4,71)	0,813 (0,16 - 4,10)
	AC + CC	2	22				
<i>TS ER</i>	2R/2R	1	16	0,308	0,579	1,860 (0,20 - 17,17)	1,771 (0,22 - 14,10)
	2R/3R+3R/3R	5	43				
<i>MS</i> 2756	AA	2	34	1,301	0,254	2,720 (0,46 - 16,04)	2,483 (0,49 - 12,61)
	AG + GG	4	25				
<i>SLC19A1</i> 80	AA	2	10	0,971	0,324	0,408 (0,07 - 2,54)	0,453 (0,09 - 2,19)
	AG + GG	4	49				
<i>ABCB1</i> 2677	GG	0	7	0,798	0,372	н.п.	н.п.
	хет. и вар. [†]	6	52				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**

н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



Графикон 4.46: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е разлика во поврзаноста на **MS 2756 AG+GG** генотиповите со кожна токсичност [*OR* (95%CI) 2,720 (0,46 – 16,04) *RR* (95%CI) 2,483 (0,49 – 12,61), *p*=0,254], која не беше статистички сигнификантна.

Табела 4.40: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при интестинален мукозит по третманот со метотрексат

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси <i>OR</i> (95%CI)	релативен ризик <i>RR</i> (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	<i>p</i>		
MTHFR 677	CC	3	32	0,062	0,804	0,790 (0,12 - 5,08)	0,805 (0,14 - 4,49)
	CT + TT	2	27				
MTHFR1298	AA	4	35	0,754	0,385	0,380 (0,04 - 3,62)	0,406 (0,05 - 3,42)
	AC + CC	1	23				
TS ER	2R/2R	1	16	0,106	0,745	1,455 (0,15 - 14,01)	1,417 (0,17 - 11,81)
	2R/3R+3R/3R	4	44				
MS 2756	AA	2	34	0,519	0,471	1,962 (0,31 - 12,61)	1,862 (0,33 - 10,41)
	AG + GG	3	26				
SLC19A1 80	AA	2	10	1,669	0,196	0,300 (0,04 - 2,03)	0,340 (0,06 - 1,81)
	AG + GG	3	50				
ABCB1 2677	GG	1	6	0,480	0,488	0,444 (0,04 - 4,65)	0,483 (0,06 - 3,74)
	хет. и вар. [†]	4	54				

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**



Графикон 4.47: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при интестинален мукозит по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

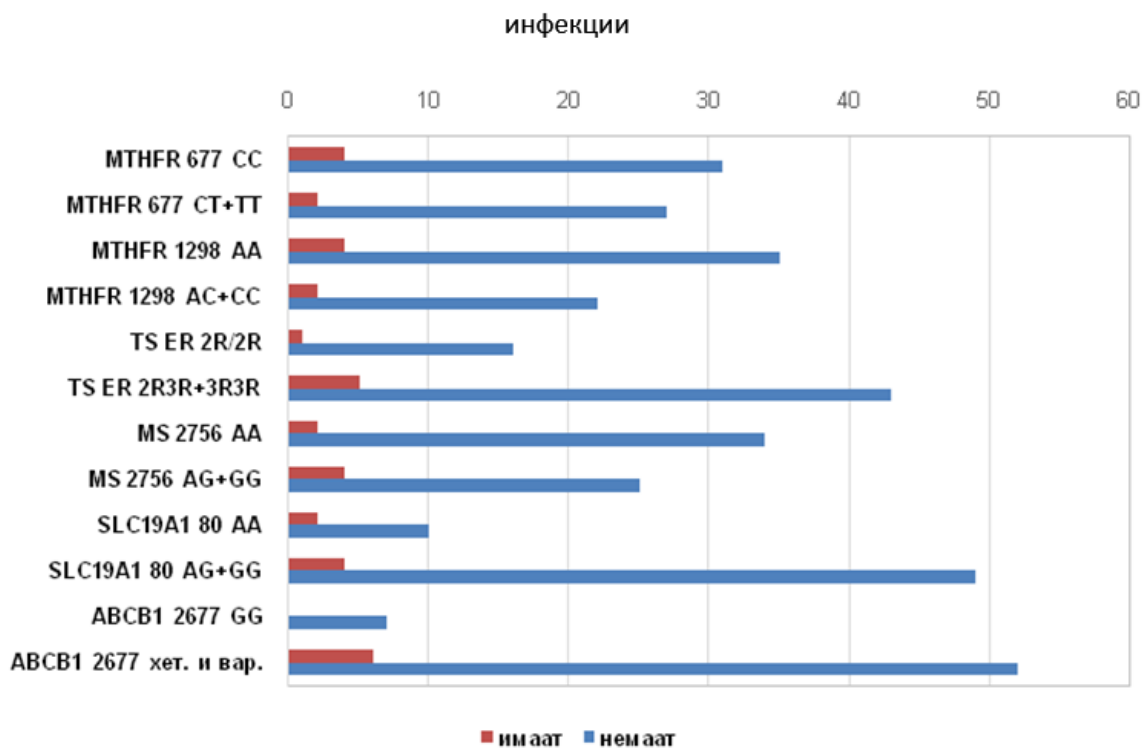
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните генотипови со интестинален мукозит.

Табела 4.41: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при инфекции во текот или непосредно по третманот со метотрексат

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	<i>p</i>		
MTHFR 677	CC	19	16	3,207	0,073	2,647 (0,90 - 7,79)	1,397 (0,97 - 2,02)
	CT + TT	22	7				
MTHFR1298	AA	25	14	0,043	0,836	1,120 (0,38 - 3,27)	1,040 (0,72 - 1,50)
	AC + CC	16	8				
TS ER	2R/2R	11	6	0,000	0,993	0,995 (0,31 - 3,16)	0,998 (0,66 - 1,50)
	2R/3R+3R/3R	31	17				
MS 2756	AA	24	12	0,148	0,700	0,818 (0,29 - 2,27)	0,931 (0,65 - 1,34)
	AG + GG	18	11				
SLC19A1 80	AA	8	4	0,027	0,869	0,895 (0,24 - 3,37)	0,962 (0,61 - 1,51)
	AG + GG	34	19				
ABCB1 2677	GG	4	3	0,192	0,662	1,425 (0,29 - 7,00)	1,147 (0,59 - 2,24)
	хет. и вар. [†]	38	20				

*статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

[†]хетерозиготни генотипови: GA, GT и AT и варијантни генотипови: AA и TT



Графикон 4.48: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при инфекцииво текот или непосредно по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е разлика во поврзаноста на **MTHFR 677 CT + TT** генотиповите во однос на **MTHFR 677 CC** генотипот со инфекции [*OR* (95%CI) 2,647(0,90 – 7,79) *RR* (95%CI) 1,397 (0,97 – 2,02), $p=0,073$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.42: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти [#] по третманот со метотрексат

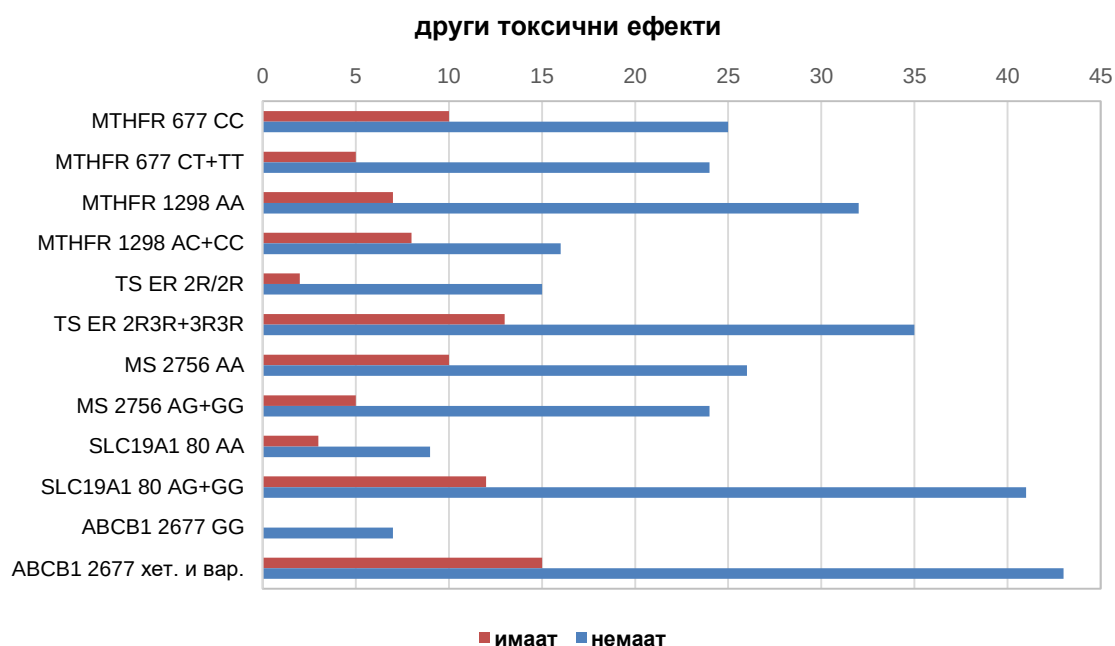
полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имат	немаат	χ^2	<i>p</i>		
MTHFR 677	CC	10	25	1,135	0,287	0,521 (0,16 - 1,75)	0,603 (0,23 - 1,57)
	CT + TT	5	24				
MTHFR1298	AA	7	32	1,938	0,164	2,286 (0,70 - 7,43)	1,857 (0,77 - 4,47)
	AC + CC	8	16				
TSER	2R/2R	2	15	1,660	0,198	2,786 (0,56 - 13,89)	2,302 (0,58 - 9,17)
	2R/3R+3R/3R	13	35				
MS 2756	AA	10	26	1,004	0,316	0,542 (0,16 - 1,81)	0,621 (0,24 - 1,61)
	AG + GG	5	24				
SLC19A1 80	AA	3	9	0,031	0,861	0,878 (0,20 - 3,77)	0,906 (0,30 - 2,72)
	AG + GG	12	41				
ABCB1 2677	GG	0	7	2,353	0,125	н.п.	н.п.
	хет. и вар. [†]	15	43				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**

н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип

други токсични ефекти застапени кај помалку од 2 деца(<5%) од групатаза секојефект: централна и периферна невротоксичност, кардиотоксичност, хеморагиченсиндром, дерматитис, артерискахипертензија и нефротоксичност



Графикон 4.49: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е разлика во поврзаноста на ***MTHFR 1298 AC +CC*** генотиповите во однос на ***MTHFR 1298 AA*** генотипот [OR (95%CI) 2,286 (0,70 – 7,43) RR (95%CI) 1,857 (0,77 – 4,47), p=0,146] и на ***TS ER 2R/3R +3R/3R*** генотиповите во однос на ***TS ER 2R/2R*** генотипот [OR (95%CI) 2,786 (0,56 – 13,89) RR (95%CI) 2,302 (0,58 – 9,17), p=0,198] со други токсични ефекти, без статистичка сигнификантност.

5.7 Поврзаност на алелите од испитуваните полиморфизми кај

пациентите со АЛЛ и токсичните ефекти по третманот со метотрексат

Поради релативно малиот број на пациенти, фреквенциите на испитаниците со дивиот или со варијантниот тип алели на секој полиморфизам, од една страна, се споредувани со отсуството или присуството на определен токсичен ефект, независно од неговиот градус, односно, интензитет, од друга страна.

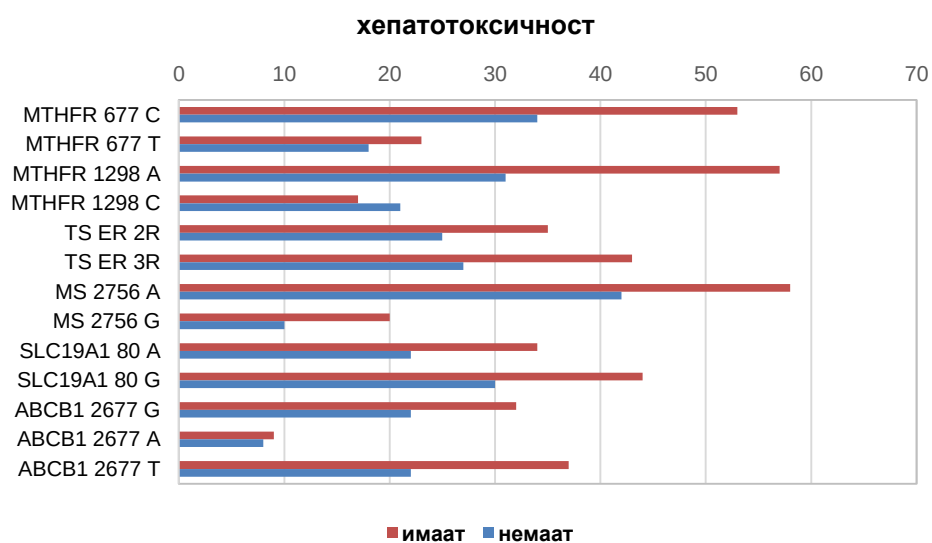
Резултатите се прикажани во табелите 4.41-4.49 и на графиконите 4.48-4.56

Табела 4.43: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при хепатотоксичност по третманот со метотрексат

полиморфизам	алели	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	53	34	0,269	0,604	0,820 (0,39 - 1,74)	0,921 (0,67 - 1,27)
	T	23	18				
MTHFR1298	A	57	31	4,396	0,036 *	0,440 (0,20 - 0,96)	0,691 (0,47 - 1,02)
	C	17	21				
TSER	2R	35	25	0,129	0,720	1,138 (0,56 - 2,30)	1,053 (0,79 - 1,40)
	3R	43	27				
MS 2756	A	58	42	0,722	0,395	1,448 (0,61 - 3,41)	1,149 (0,85 - 1,56)
	G	20	10				
SLC19A1 80	A	34	22	0,021	0,885	0,949 (0,47 - 1,93)	0,979 (0,74 - 1,30)
	G	44	30				
ABCB1 2677	G	32	22	0,212	0,646	0,773 (0,26 - 2,31)	0,893 (0,54 - 1,47)
	A [†]	9	8				
	T [†]	37	22	0,141	0,707	1,156 (0,54 - 2,47)	1,058 (0,79 - 1,42)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.50: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при хепатотоксичен ефект по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

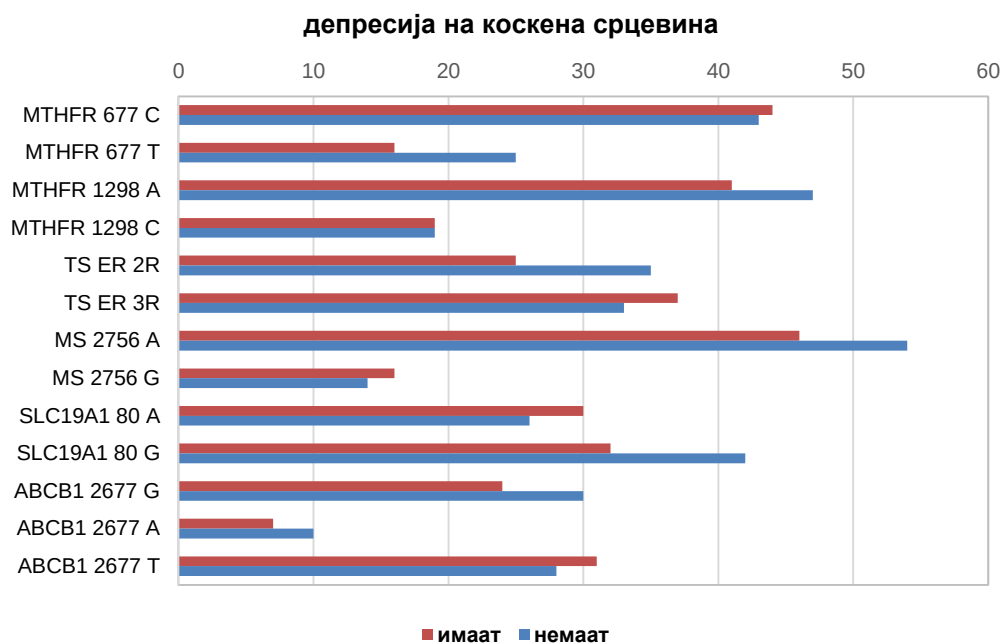
Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на **C** алелот на **MTHFRA1298C** полиморфизмот со хепатотоксичност [*OR* (95%CI) 0,440(0,20 – 0,96) *RR* (95%CI) 0,691 (0,47 – 1,02), *p*=0,036].

Табела 4.44: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при депресија на коскена срцевина по третманот со метотрексат

полимор- физам	але- ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси <i>OR</i> (95%CI)	релативен ризик <i>RR</i> (95%CI)
		имаат	немаа T	χ^2	<i>p</i>		
<i>MTHFR</i> 677	C	44	43	1,493	0,222	0,625 (0,29 - 1,33)	0,772 (0,50 - 1,19)
	T	16	25				
<i>MTHFR</i> 1298	A	41	47	0,124	0,725	1,146 (0,54 - 2,45)	1,073 (0,73 - 1,58)
	C	19	19				
<i>TSER</i>	2R	25	35	1,622	0,203	1,570 (0,78 - 3,15)	1,269 (0,87 - 1,84)
	3R	37	33				
<i>MS</i> 2756	A	46	54	0,497	0,481	1,342 (0,59 - 3,04)	1,159 (0,78 - 1,72)
	G	16	14				
<i>SLC19A1</i> 80	A	30	26	1,363	0,243	0,660 (0,33 - 1,33)	0,807 (0,56 - 1,15)
	G	32	42				
<i>ABCB1</i> 2677	G	24	30	0,056	0,813	0,875 (0,29 - 2,64)	0,926 (0,49 - 1,76)
	A [†]	7	10				
	T [†]	31	28	0,740	0,390	1,384 (0,66 - 2,90)	1,182 (0,80 - 1,74)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.51: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЈ при депресија на коскена срцевина по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

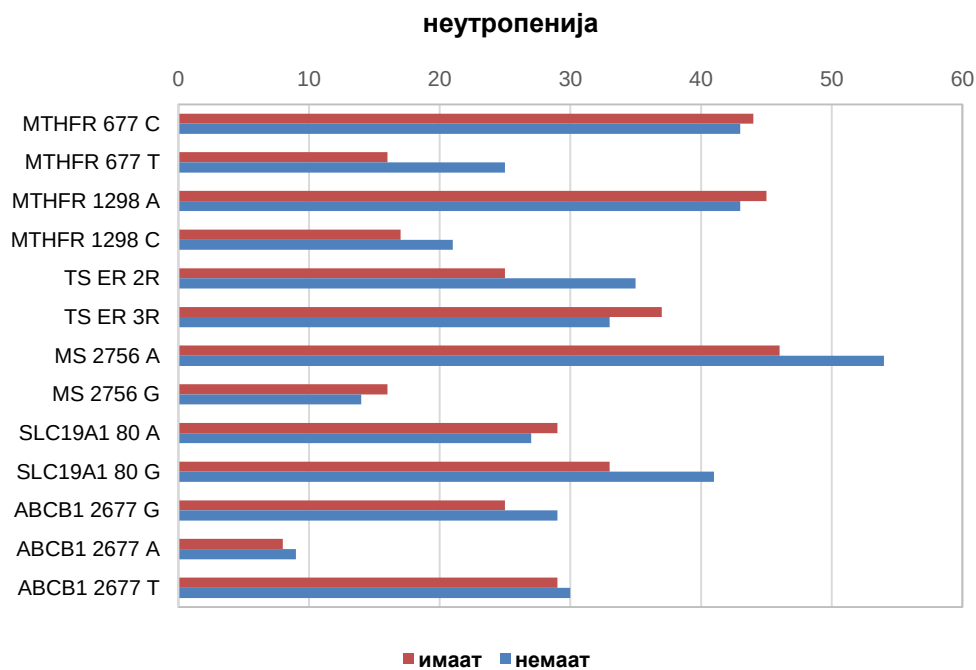
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните алели со депресија на коскена срцевина.

Табела 4.45: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните адели кај групата пациенти со АЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат

полимор- физам	але- ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	44	43	1,493	0,222	0,625 (0,29 - 1,33)	0,772 (0,50 - 1,19)
	T	16	25				
MTHFR1298	A	45	43	0,435	0,510	0,774 (0,36 - 1,66)	0,875 (0,58 - 1,32)
	C	17	21				
TSER	2R	25	35	1,622	0,203	1,570 (0,78 - 3,15)	1,269 (0,87 - 1,84)
	3R	37	33				
MS 2756	A	46	54	0,497	0,481	1,342 (0,59 - 3,04)	1,159 (0,78 - 1,72)
	G	16	14				
SLC19A1 80	A	29	27	0,661	0,416	0,749 (0,37 - 1,50)	0,861 (0,60 - 1,23)
	G	33	41				
ABCB1 2677	G	25	29	0,003	0,956	1,031 (0,35 - 3,07)	1,016 (0,57 - 1,82)
	A [†]	8	9	0,092	0,761	1,121 (0,54 - 2,35)	1,062 (0,72 - 1,56)
	T [†]	29	30				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.52: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните адели кај групата пациенти со АЛЛ при неутропенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

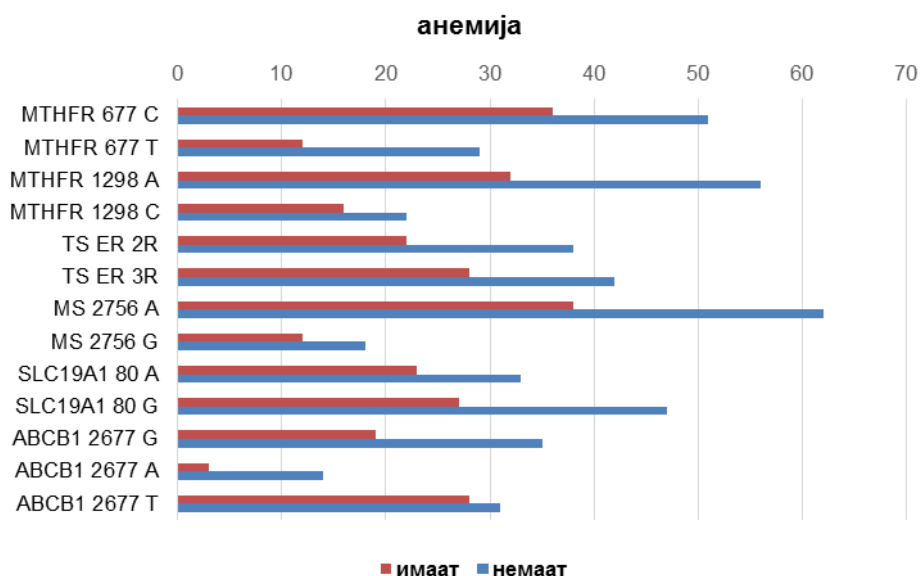
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните алели со неутропенија.

Табела 4.46: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при анемија по третманот со метотрексат

полимор- физам	але- ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	36	51	1,744	0,187	0,586 (0,26 - 1,30)	0,707 (0,41 - 1,21)
	T	12	29				
MTHFR1298	A	32	56	0,371	0,542	1,273 (0,59 - 2,77)	1,158 (0,73 - 1,84)
	C	16	22				
TSER	2R	22	38	0,152	0,697	1,152 (0,57 - 2,34)	1,091 (0,70 - 1,69)
	3R	28	42				
MS 2756	A	38	62	0,039	0,843	1,088 (0,47 - 2,51)	1,053 (0,64 - 1,74)
	G	12	18				
SLC19A1 80	A	23	33	0,283	0,595	0,824 (0,40 - 1,68)	0,888 (0,58 - 1,37)
	G	27	47				
ABCB1 2677	G	19	35	1,860	0,173	0,395 (0,10 - 1,55)	0,502 (0,17 - 1,49)
	A [†]	3	14				
	T [†]	28	31	1,748	0,186	1,664 (0,78 - 3,55)	1,349 (0,86 - 2,12)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.53: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при анемија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

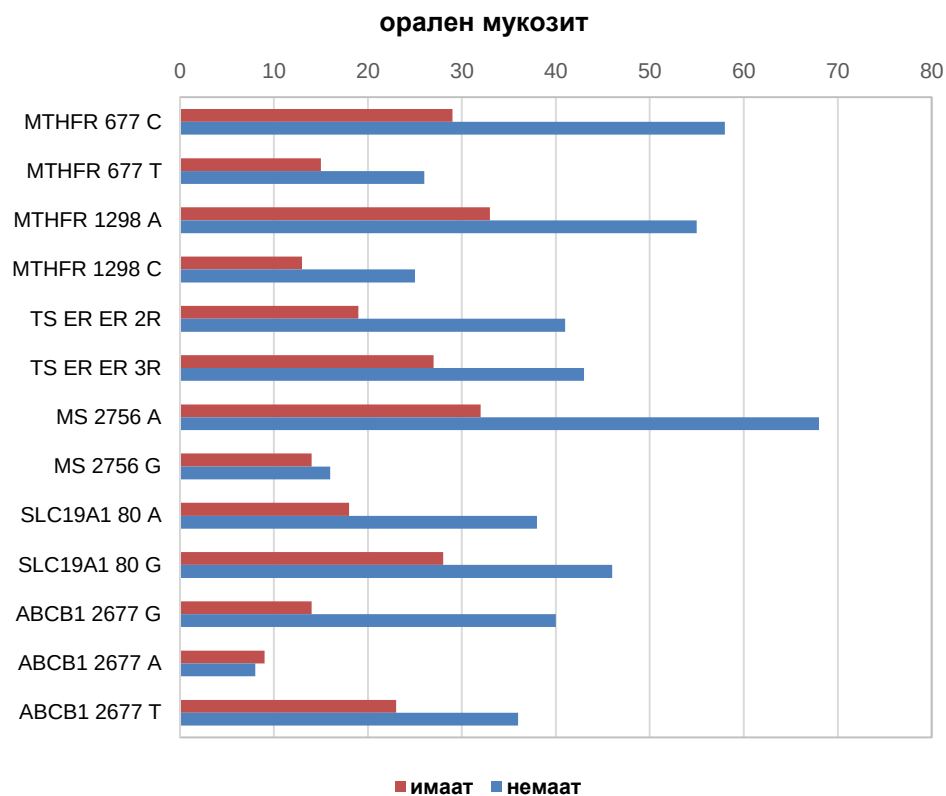
Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните алели со анемија.

Табела 4.47: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЈ при орален мукозит по третманот со метотрексат

полимор- физам	але- ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	29	58	0,131	0,718	1,154 (0,53 - 2,51)	1,098 (0,67 - 1,81)
	T	15	26				
MTHFR1298	A	33	55	0,124	0,725	0,867 (0,39 - 1,92)	0,912 (0,54 - 1,53)
	C	13	25				
TSER	2R	19	41	0,674	0,412	1,355 (0,66 - 2,80)	1,218 (0,76 - 1,96)
	3R	27	43				
MS 2756	A	32	68	2,171	0,141	1,859 (0,81 - 4,27)	1,458 (0,90 - 2,35)
	G	14	16				
SLC19A1 80	A	18	38	0,452	0,501	1,285 (0,62 - 2,67)	1,177 (0,73 - 1,90)
	G	28	46				
ABCB1 2677	G	14	40	4,309	0,038*	3,214 (1,04 - 9,95)	2,042 (1,08 - 3,86)
	A [†]	9	8				
	T [†]	23	36	2,183	0,140	1,825 (0,82 - 4,07)	1,504 (0,87 - 2,61)

*статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

[†]пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.54: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при орален мукозит по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

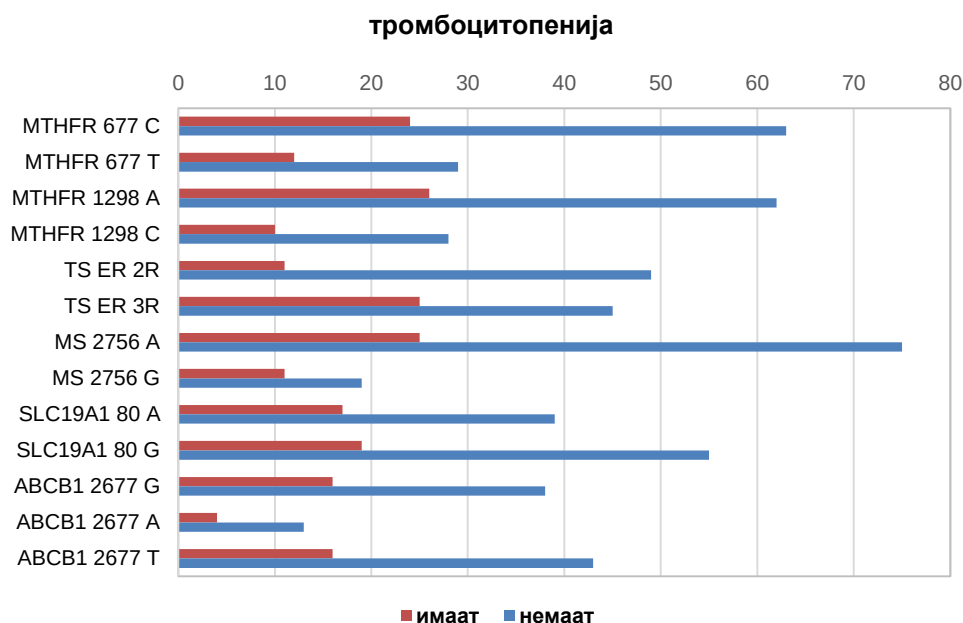
Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на **G** алелот на **ABCB1 2677** полиморфизмот со орален мукозит во однос на **A** и **T** алелите [*OR* (95%CI) 3,214(1,04 – 9,95) *RR* (95%CI) 2,042 (1,08 – 3,86), *p*=0,038].

Табела 4.48: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при тромбоцитопенија по третманот со метотрексат

полимор-физам	але-ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	24	63	0,039	0,843	1,086 (0,48 - 2,47)	1,061 (0,59 - 1,90)
	T	12	29				
MTHFR1298	A	26	62	0,136	0,713	0,852 (0,36 - 2,00)	0,891 (0,48 - 1,66)
	C	10	28				
TSER	2R	11	49	4,874	0,027 *	2,475 (1,09 - 5,60)	1,948 (1,05 - 3,62)
	3R	25	45				
MS 2756	A	25	75	1,569	0,210	1,737 (0,73 - 4,14)	1,467 (0,82 - 2,62)
	G	11	19				
SLC19A1 80	A	17	39	0,349	0,555	0,793 (0,37 - 1,72)	0,846 (0,49 - 1,47)
	G	19	55				
ABCB1 2677	G	16	38	0,238	0,626	0,731 (0,21 - 2,59)	0,794 (0,31 - 2,05)
	A †	4	13				
				0,088	0,767	0,884 (0,39 - 2,00)	0,915 (0,51 - 1,65)
	T †	16	43				

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.55: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при тромбоцитопенија по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници

Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на 3R алелот на *TSER* со тромбоцитопенија во однос на 2R алелот [OR (95%CI) 2,475 (1,09 – 5,60) RR (95%CI) 1,948(1,05–3,62),p=0,027].

Табела 4.49: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат

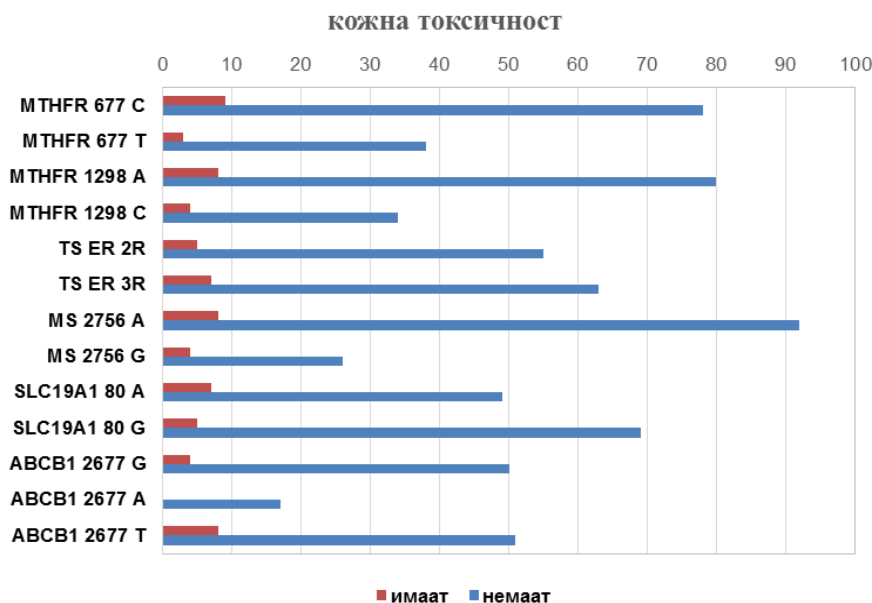
полиморфизам	алели	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	9	78	0,301	0,583	0,684 (0,18 - 2,67)	0,707 (0,20 - 2,48)
	T	3	38				
MTHFR1298	A	8	80	0,063	0,801	1,176 (0,33 - 4,17)	1,158 (0,37 - 3,61)
	C	4	34				
TSER	2R	5	55	0,107	0,743	1,222 (0,37 - 4,07)	1,200 (0,40 - 3,59)
	3R	7	63				
MS 2756	A	8	92	0,783	0,376	1,769 (0,49 - 6,34)	1,667 (0,54 - 5,15)
	G	4	26				
SLC19A1 80	A	7	49	1,255	0,263	0,507 (0,15 - 1,69)	0,541 (0,18 - 1,61)
	G	5	69				
ABCB1 2677	G	4	50	1,334	0,248	н.п.	н.п.
	A †	0	17				
	T †	8	51	1,124	0,289	1,961 (0,56 - 6,93)	1,831 (0,58 - 5,74)

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G

н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со алелот

Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните алели со кожна токсичност.



Графикон 4.56: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при кожна токсичност по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

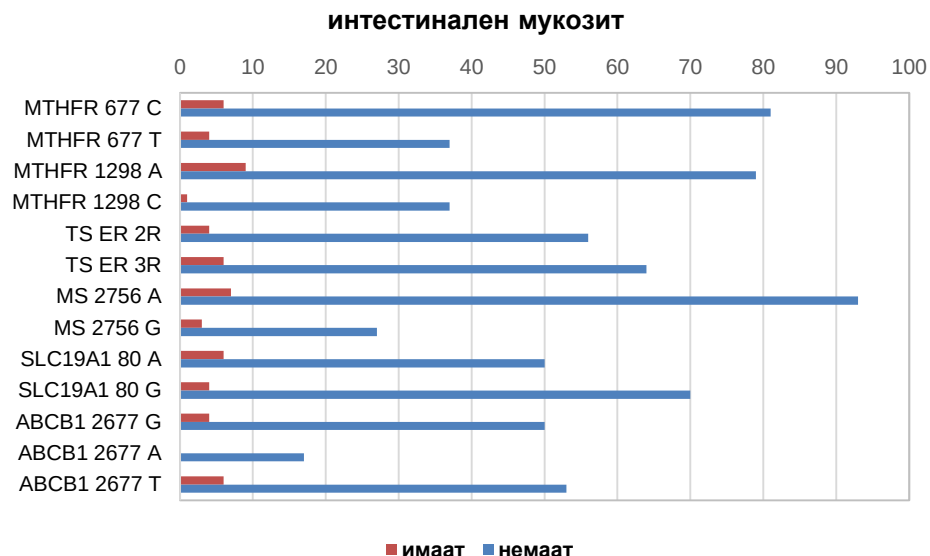
Табела 4.50: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЈ при интестинален мукозит по третманот со метотрексат

полимор-физам	але-ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	6	81	0,316	0,574	1,459 (0,39 - 5,48)	1,415 (0,42 - 4,74)
	T	4	37				
MTHFR1298	A	9	79	2,096	0,148	0,237 (0,03 - 1,94)	0,257 (0,03 - 1,96)
	C	1	37				
TSER	2R	4	56	0,165	0,685	1,313 (0,35 - 4,89)	1,286 (0,38 - 4,34)
	3R	6	64				
MS 2756	A	7	93	0,293	0,589	1,476 (0,36 - 6,10)	1,429 (0,39 - 5,19)
	G	3	27				
SLC19A1 80	A	6	50	1,265	0,261	0,476 (0,13 - 1,78)	0,505 (0,15 - 1,70)
	G	4	70				
ABCB1 2677	G	4	50	1,334	0,248	н.п.	н.п.
	A †	0	17				
	T †	6	53	0,267	0,606	1,415 (0,38 - 5,31)	1,373 (0,41 - 4,60)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G

н.п. неспречметлива вредност поради малиот број индивидуи со алелот



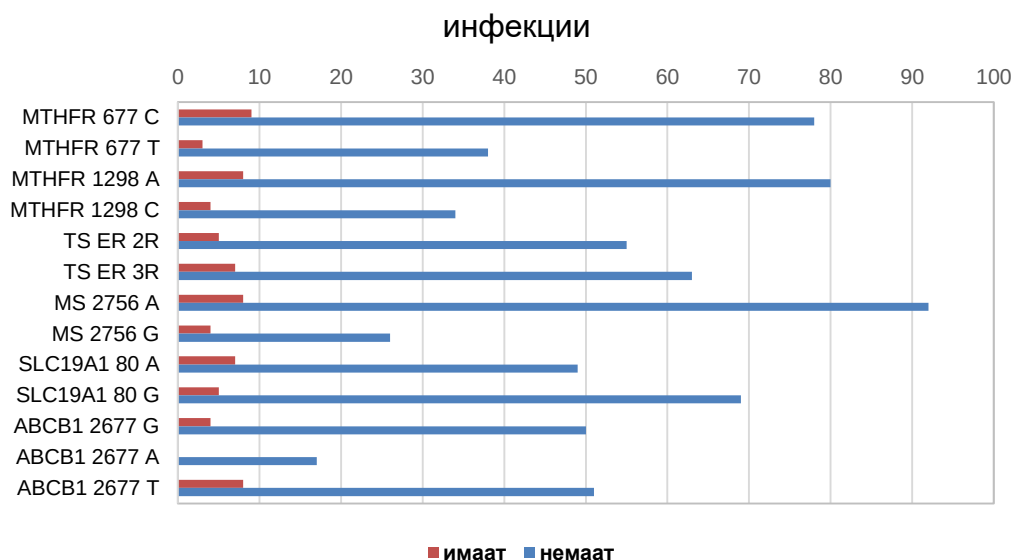
Графикон 4.57: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЈ при интестинален мукозит по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници. Не е утврдена сигнификантна разлика во поврзаноста на испитуваните алели со интестинален мукозит.

Табела 4.51: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ при инфекцииво текот или непосредно по третманот со метотрексат

полимор- физам	але- ли	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	51	36	3,494	0,062	2,188 (0,95 - 5,02)	1,290 (1,01 - 1,65)
	T	31	10				
MTHFR1298	A	59	29	0,496	0,481	0,754 (0,34 - 1,66)	0,903 (0,67 - 1,21)
	C	23	15				
TSER	2R	37	23	0,424	0,515	1,270 (0,62 - 2,61)	1,089 (0,84 - 1,41)
	3R	47	23				
MS 2756	A	65	35	0,028	0,867	0,930 (0,40 - 2,17)	0,974 (0,72 - 1,33)
	G	19	11				
SLC19A1 80	A	39	17	1,088	0,297	0,676 (0,32 - 1,41)	0,873 (0,68 - 1,12)
	G	45	29				
ABCB1 2677	G	33	21	0,028	0,866	0,909 (0,30 - 2,76)	0,963 (0,61 - 1,51)
	A [†]	10	7				
	T [†]	41	18	0,876	0,349	1,449 (0,67 - 3,16)	1,137 (0,87 - 1,49)

* статистички сигнификантна разликаопределена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G



Графикон 4.58: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при инфекцииво текот или непосредно по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е разлика во поврзаноста на **T** алелот на **MTHFR C677T** полиморфизмот со инфекции во однос на **C** алелот [**OR** (95%CI) 2,188(0,95 – 5,02) **RR** (95%CI) 1,290 (1,01 – 1,65), $p=0,062$], без статистичка сигнификантност.

Табела 4.52: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти[#] по третманот со метотрексат

полиморфизам	алели	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		имаат	немаат	χ^2	p		
MTHFR 677	C	24	63	2,605	0,107	0,450 (0,17 - 1,21)	0,530 (0,24 - 1,20)
	T	6	35				
MTHFR1298	A	14	74	10,040	0,002*	3,844 (1,63 - 9,09)	2,647 (1,44 - 4,86)
	C	16	22				
TSER	2R	12	48	0,594	0,441	1,385 (0,60 - 3,17)	1,286 (0,68 - 2,45)
	3R	18	52				
MS 2756	A	25	75	0,903	0,342	0,600 (0,21 - 1,73)	0,667 (0,28 - 1,59)
	G	5	25				
SLC19A1 80	A	15	41	0,762	0,383	0,695 (0,31 - 1,58)	0,757 (0,40 - 1,42)
	G	15	59				
ABCB1 2677	G	11	43	1,932	0,165	0,244 (0,03 - 2,05)	0,289 (0,04 - 2,08)
	A [†]	1	16				
	T [†]	18	41	1,519	0,218	1,716 (0,72 - 4,07)	1,498 (0,78 - 2,88)

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† пресметките се правени во однос на дивниот тип алел G

други токсични ефекти застапени кај помалку од 2 деца (<5%) од групата за секој ефект: централна и периферна невротоксичност, кардиотоксичност, хеморагичен синдром, дерматитис, артериска хипертензија и нефротоксичност



Графикон 4.59: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните алели кај групата пациенти со АЛЛ при други токсични ефекти по третманот со метотрексат. Броевите означуваат број на испитаници.

Присатна е статистички сигнификантна разлика во поврзаноста на С алелот во однос на А алелот на *MTHFR* C677T полиморфизмот со други токсични ефекти [*OR* (95%CI) 3,844(1,63 – 9,09) *RR* (95%CI) 2,647 (1,44 – 4,86), $p=0,002$].

Кумулативен приказ на полиморфизмите кај кои е пресметана сигнификантна поврзаност со токсични ефекти

Заради поголема прегледност, во табелата 4.50 прикажани се сите полиморфизми (генотипови и алели) на испитуваните генски маркери кај кои е најдена статистички значајна асоцираност со определени токсични ефекти при терапијата со метотрексат.

Табела 4.53: Кумулативен приказ на полиморфизми со статистички сигнификантна поврзаност со определени токсични ефекти кај групата пациенти со АЛЛ по третманот со метотрексат

полиморфизам (генотип или алел)	токсичен ефект	влијание	$p^{\dagger}$	однос на шанси † OR (95%CI)
<i>MTHFR</i> 1298 AC	хепатотоксичност	↓	0,023	0,190 (0,04 - 0,87)
<i>MTHFR</i> 1298 C	хепатотоксичност	↓	0,036	0,440 (0,20 - 0,96)
<i>MTHFR</i> 1298 AC	тромбоцитопенија	↓	0,033	н.п.
<i>MTHFR</i> 1298 AC	други токсични ефекти [#]	↑	0,005	6,095 (1,60 - 23,22)
<i>MTHFR</i> 1298 C	други токсични ефекти [#]	↑	0,002	3,844 (1,63 - 9,09)
<i>ABCB1</i> 2677GA	анемија	↓	0,009	н.п.
<i>ABCB1</i> 2677 A	орален мукозитис	↑	0,038	3,214 (1,04 - 9,95)
<i>TS ER</i> 2R/3R	тромбоцитопенија	↑	0,029	8,471 (0,96 - 74,63)
<i>TS ER</i> 3R/3R	тромбоцитопенија	↑	0,025	9,143 (1,01 - 82,45)
<i>TS ER</i> 3R	тромбоцитопенија	↑	0,027	2,475 (1,09 - 5,60)

† пресметките се вршени во однос на референтниот див-тип на генотип или алел за секој полиморфизам
 $\downarrow$ присуството на хетерозиготниот или варијантниот генотип, односно варијантниот алел на полиморфизмот е поврзано со намалена статистичка веројатност за појава на со токсичниот ефект
 $\uparrow$ присуството на хетерозиготниот или варијантниот генотип, односно варијантниот алел на полиморфизмот е поврзано со зголемена статистичка веројатност за појава на со токсичниот ефект

н.п.непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со генотипот или алелот

[#] други токсични ефекти застапени кај помалку од 2 деца(<5%) од групата за секој ефект: централна и периферна невротоксичност, кардиотоксичност, хеморагичен синдром, дерматитис, артериска хипертензија и нефротоксичност

Испитување на комбинираниот ефект на сите испитувани полиморфизми врз појавата на токсични ефекти

Со користење на двонасочниот **Cochran-Mantel-Haenszel** тестот, пресметани се статистичките веројатности од можното комбинирано, поврзано, влијание на сите шест испитувани полиморфизми врз појавата на следените токсични ефекти по терапијата со метотрексат кај групата пациенти со АЛЛ.

Во табелата 4.54 прикажани се вредностите при споредбите на фреквенциите на испитаниците со дивниот генотип или збирот на испитаници со хетерозиготните и варијантните генотипови на сите полиморфизми,одеднаш од една страна, со отсуството или присуството на секој поединечен токсичен ефект, независно од неговиот градус, односно, интензитет, од друга страна.

Табела 4.54: Анализа на комбинираниите шест полиморфизми со секој од испитуваните токсични ефекти кај групата пациенти со АЛЛ потретманот со метотрексат со Cochran-Mantel-Haenszel тестот

токсичен ефект	статистичка разлика		однос на шанси [†] OR (95%CI)
	χ^2	$p^{\dagger}$	
хепатотоксичност	0,918	0,573	1,250 (0,77 - 2,04)
депресија на коскена срцевина	0,091	1,087	0,933 (0,58 - 1,50)
неутропенија	0,046	1,089	0,952 (0,59 - 1,53)
анемија	0,006	0,820	1,018 (0,62 - 1,66)
орален мукозитис	0,802	0,403	0,805 (0,49 - 1,33)
тромбоцитопенија	0,555	0,272	0,825 (0,48 - 1,41)
алергија	0,064	0,481	0,904 (0,38 - 2,10)
интестинален мукозитис	0,486	0,834	1,330 (0,53 - 3,34)
други токсични ефекти [#]	0,324	0,333	0,853 (0,48 - 1,51)

[†] пресметките се вршени во однос на референтниот див-тип на генотип или алел за секој полиморфизам, при што се користени податоците за сите шест полиморфизми

[#] други токсични ефекти застапени кај помалку од 2 деца(<5%) од групата за секој ефект: централна и периферна невротоксичност, кардиотоксичност, хеморагичен синдром, дерматитис, артериска хипертензија и нефротоксичност

Од вредностите прикажани во табелата се гледа дека не е најдена статистички значајна поврзаност на генотиповите на комбинираниите шест полиморфизми со кој било од токсичните ефекти, освен за носителите на хетерозиготниот и варијантниот генотип за MS2756 AG + MTHFR C677T кои имаа зголемена инциденца на инфекции, но без статистичка сигнификантност.

Истовременото, комбинирано влијание на сите шест полиморфизми со кој било од токсичните ефекти е испитуван и со **логистичката регресиска анализа**, при што не се најдени значајни асоцијации. Од тие причини, како и поради обемот на тие резултати, истите не се прикажани.

Поврзаност на генотиповите на испитуваните полиморфизми со концентрациите на метотрексат

За да се утврди поврзаноста на определен генотип со просечните концентрации на метотрексат во плазмата по секоја аплицирана доза, користен е Mann-Whitney U-тестот. Добиените статистички параметри за секој испитуван генотип на шесте полиморфизми се прикажани во **табелата 4.55**.

Табела 4.55: Разлики во фреквенциите на испитуваните генотипови кај групата пациенти со АЛЛ во однос на просечните концентрации на метотрексат по третманот од четирите аплицирани дози

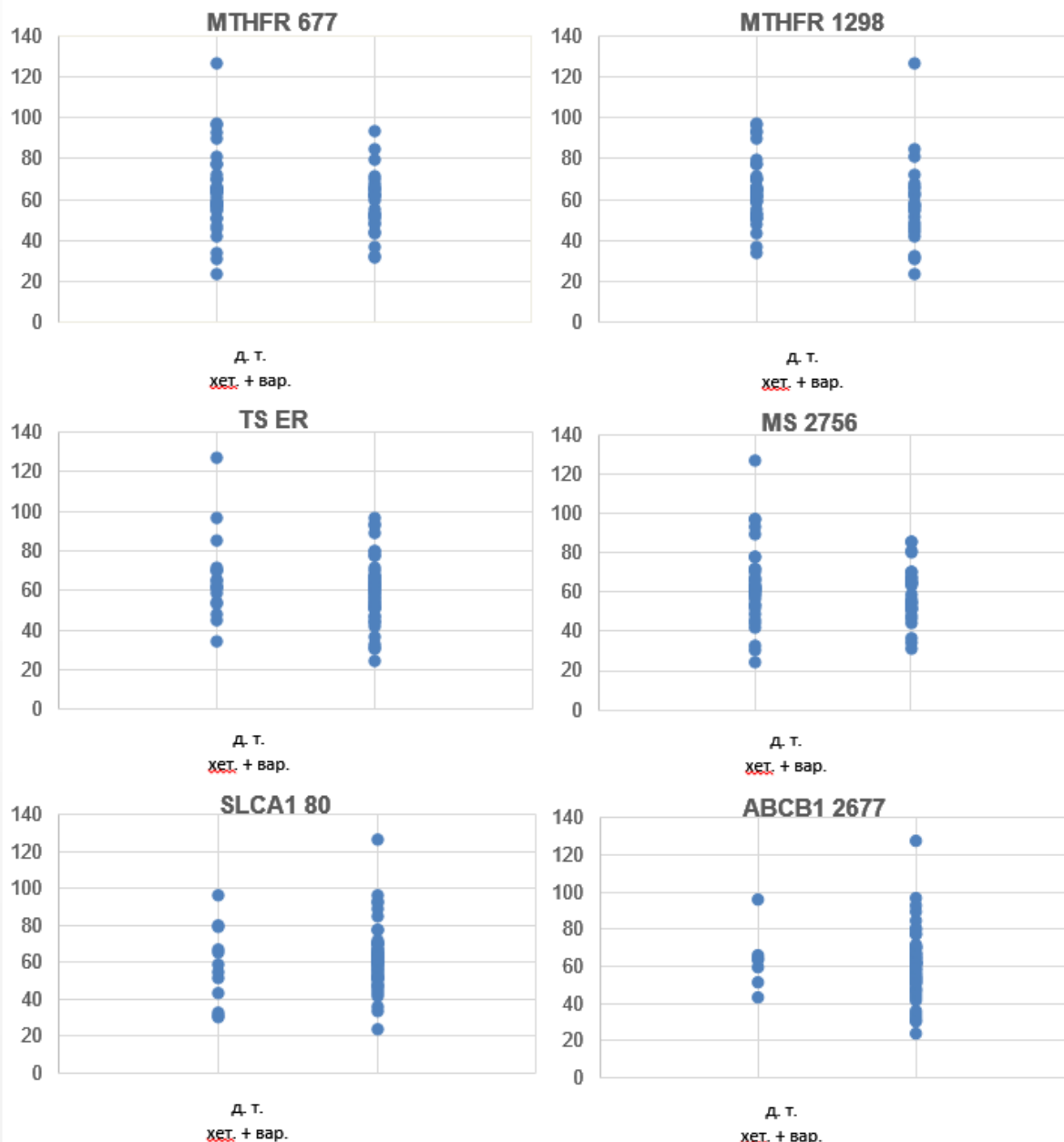
полимор- физам	генотип	концентрација на метотрексат ($\mu\text{mol/L}$) просек $\pm$ SD	Mann-Whitney U-тест (двонасочен)		
			U	z	p
MTHFR 677	CC	60,34 $\pm$ 1,30	337	-2,299	0,021*
	CT + TT	59,54 $\pm$ 1,97			
MTHFR1298	AA	64,57 $\pm$ 14,85	359	-1,982	0,048*
	AC + CC	57,26 $\pm$ 20,25			
TS ER	2R/2R	66,49 $\pm$ 20,65	342	-0,985	0,325
	2R/3R+3R/3R	59,93 $\pm$ 16,02			
MS 2756	AA	61,55 $\pm$ 0,86	475	-0,620	0,535
	AG + GG	55,70 $\pm$ 4,66			
SLC19A1 80	AA	57,77 $\pm$ 20,29	275	-0,727	0,467
	AG + GG	62,37 $\pm$ 16,54			
ABCB1 2677	GG	63,66 $\pm$ 15,31	189	-0,296	0,767
	хет. и вар.†	61,40 $\pm$ 17,83			

* статистички сигнификантна разлика

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**

Според Mann-Whitney U-тестот, децата со АЛЈ кои се носители на дивите генотипови на полиморфизмите *MTHFR* 677 и на *MTHFR* 1298 се поврзани, со статистички значајно ($p < 0,05$), малку повисоки концентрации на метотрексат во текот на треманот, во однос на индивидуите со хетерозиготните и хомозиготно варијантните генотипови на овие два полиморфизми.

Дистрибуцијата на просечните концентрации на метотрексат во плазмата според бинарните вредности на дивот генотип и на хетерозиготниот и варијантниот генотип, заедно, е прикажана во **графиконот 4.60**.



Графикон 4.60: Дисперзија на просечните измерени концентрации на метотрексат според генотипот на секој од шесте испитувани поломорфизми кај групата пациенти соАЛЛ. Вредностите на вертикалната оска се изразени во $\mu\text{mol/L}$.

Кратенки: д.т.= див (неваријантен) генотип;

хет. + вар.= хетерозиготен и варијантен генотип

Генотипови на испитуваните полиморфизми кај пациентите со релапс или летален исход

Во текот на студијата, од вкупно 65 пациенти со АЛЛ третирани со метотрексат, релапс на болеста и/или летален исход настапи кај 5 деца. Нивните генотипови се прикажани во табелата 4.56.

Табела 4.56: Приказ на генотиповите на секој од испитуваните полиморфизми кај петте пациенти со релапс на АЛЛ и/или летален исход

полимор-физам	пациент				
	#1	# 2	# 3	# 4	# 5
<i>MTHFR</i> 677	TT	CC	TT	CC	CC
<i>MTHFR</i> 1298	AA	AC	AA	AC	AA
<i>TS ER</i>	2R/3R	2R/3R	2R/2R	2R/3R	2R/2R
<i>MS</i> 2756	AG	AG	AA	AA	AA
<i>SLC19A1</i> 80	AG	AA	AG	AA	AA
<i>ABCB1</i> 2677	GG	GA	TT	GT	GG

Малиот број на пациенти со релапс или егзитус во однос на вкупниот број пациенти со студијата, што изнесува околу 7,69 %, делумно ја ограничува статистичката употребливост на натамошните анализи на поврзаноста на некоја комбинација на генотиповите со зголемен ризик од неповолен исход.

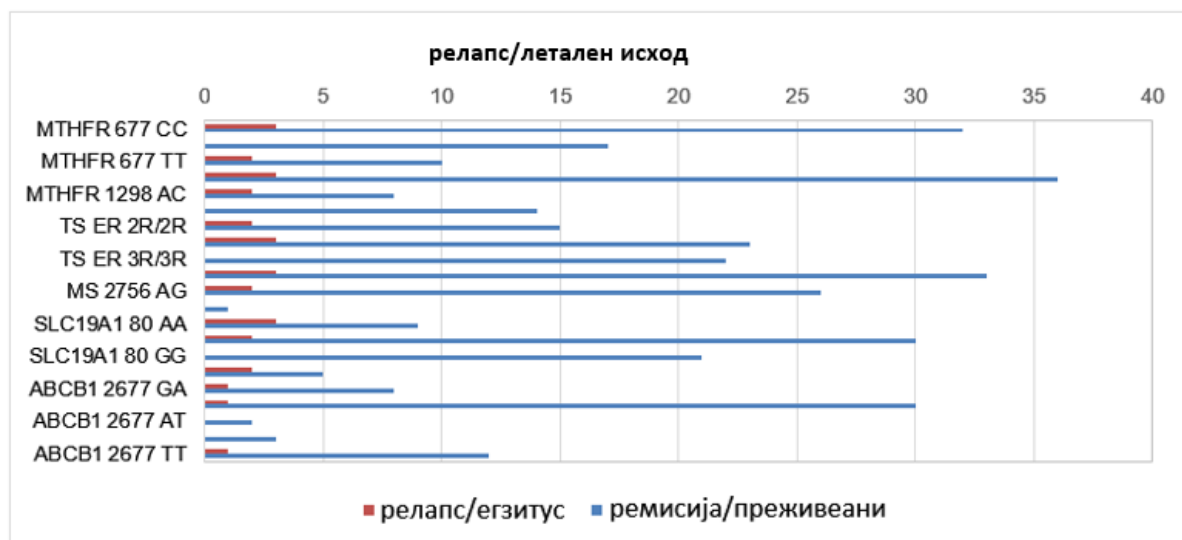
Во табелата 4.57 и на графиконот 4.61 прикажани се споредбите на фреквенциите на испитаниците со дивiot генотип, хетерозиготниот и варијантниот генотип за секој полиморфизам, поединечно, од една страна, со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија, од друга страна.

Во табелата 4.58 и на графиконот 4.62 прикажани се споредбите правени и со бинарни варијабли. Имено, поради малиот број на пациенти, фреквенциите на испитаниците со дивiot генотип или збирот на испитаници со хетерозиготните и варијантните генотипови на секој полиморфизам, од една страна, се споредуваат со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија, од друга страна.

Табела 4.57: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај пациентите со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија

полиморфизам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		релапс/ егзитус	ремисија/ преживеани	χ^2	<i>p</i>		
<i>MTHFR</i> 677	CC	3	32	1	1	1	1
	CT	0	17	1,546	0,214	н.п.	н.п.
	TT	2	10	0,616	0,433	2,133 (0,31 - 14,62)	1,944 (0,37 - 10,28)
<i>MTHFR</i> 1298	AA	3	36	1	1	1	1
	AC	2	8	1,316	0,251	3,000 (0,43 - 21,01)	2,600 (0,50 - 13,52)
	CC	0	14	1,142	0,285	н.п.	н.п.
<i>TS ER</i>	2R/2R	2	15	1	1	1	1
	2R/3R	3	23	0,001	0,982	0,978 (0,15 - 6,57)	0,981 (0,18 - 5,27)
	3R/3R	0	22	2,728	0,099	н.п.	н.п.
<i>MS 2756</i>	AA	3	33	1	1	1	1
	AG	2	26	0,031	0,099	0,846 (0,13 - 5,44)	0,857 (0,15 - 4,79)
	GG	0	1	0,091	0,860	н.п.	н.п.
<i>SLC19A1</i> 80	AA	3	9	1	1	1	1
	AG	2	30	3,046	0,081	0,200 (0,03 - 1,39)	0,250 (0,05 - 1,32)
	GG	0	21	5,775	0,016*	н.п.	н.п.
<i>ABCB1</i> 2677	GG	2	5	1	1	1	1
	GA	1	8	0,788	0,375	0,313 (0,02 - 4,41)	0,389 (0,04 - 3,47)
	GT	1	30	5,045	0,025*	0,083 (0,01 - 1,10)	0,113 (0,01 - 1,08)
	AT	0	2	0,735	0,391	н.п.	н.п.
	AA	0	3	1,071	0,301	н.п.	н.п.
	TT	1	12	1,556	0,212	0,208 (0,02 - 2,85)	0,269 (0,03 - 2,47)

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест
 реф. вредностите пресметани за дивотиот (неваријантен) генотип се референтни во однос на хетерозиготниот и варијантниот генотип на дадениот полиморфизам
 н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



Графикон 4.61: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај пациентите со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија. Броевите означуваат број на испитаници.

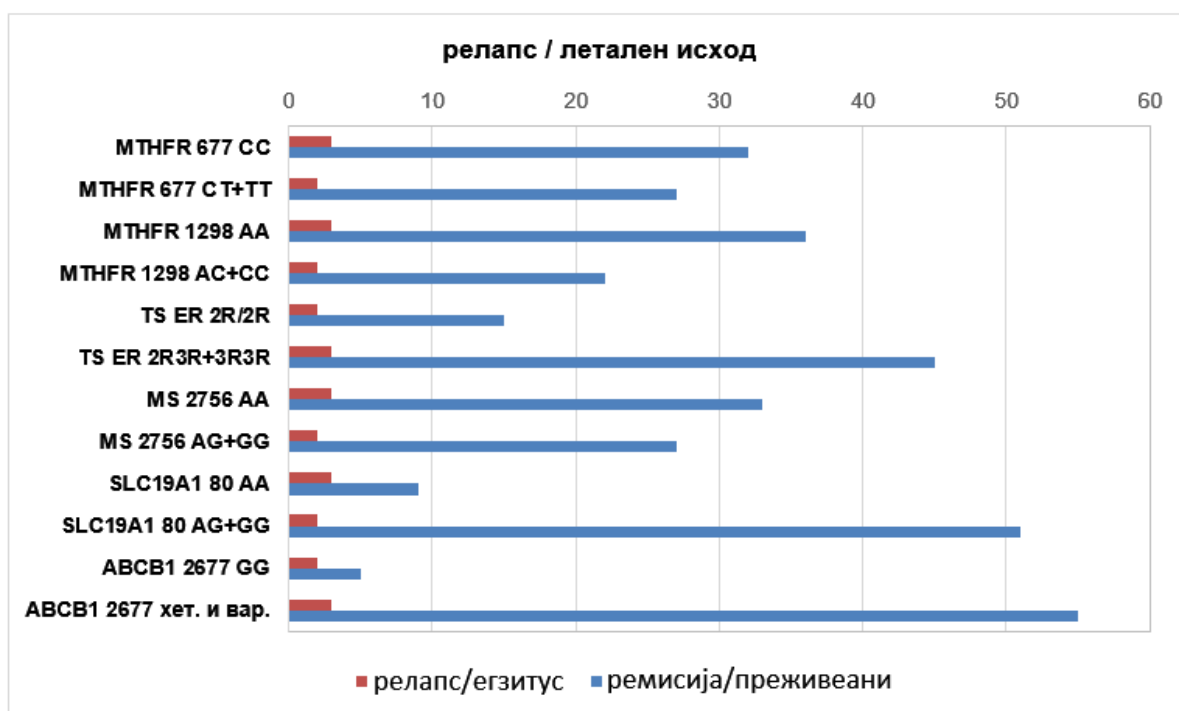
Табела 4.58: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај пациентите со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија

полимор-физам	генотип	број на пациенти		статистичка разлика		однос на шанси OR (95%CI)	релативен ризик RR (95%CI)
		релапс/егзитус	ремисија/преживеани	χ^2	p		
MTHFR 677	CC	3	32	0,062	0,804	0,790 (0,12 - 5,08)	0,805 (0,14 - 4,49)
	CT + TT	2	27				
MTHFR1298	AA	3	36	0,008	0,927	1,091 (0,17 - 7,05)	1,083 (0,19 - 6,02)
	AC + CC	2	22				
TS ER	2R/2R	2	15	0,538	0,463	0,500 (0,08 - 3,28)	0,531 (0,10 - 2,91)
	2R/3R+3R/3R	3	45				
MS 2756	AA	3	33	0,047	0,829	0,815 (0,13 - 5,23)	0,828 (0,15 - 4,63)
	AG + GG	2	27				
SLC19A1 80	AA	3	9	6,209	0,013*	0,118 (0,02 - 0,81)	0,151 (0,03 - 0,81)
	AG + GG	2	51				
ABCB1 2677	GG	2	5	4,816	0,028*	0,136 (0,02 - 1,02)	0,181 (0,04 - 0,90)
	хет. и вар.†	3	55				

* статистички сигнификантна разлика определена со Fisher-овиот егзактен χ^2 -тест

† хетерозиготни генотипови: **GA**, **GT** и **AT** и варијантни генотипови: **AA** и **TT**

н.п. непресметлива вредност поради малиот број индивидуи со дадениот генотип



Графикон 4.62: Разлики во дистрибуцијата на испитуваните генотипови кај пациентите со релапс на АЛЛ и/или летален исход наспроти преживеаните пациенти во ремисија. Броевите означуваат број на испитаници.

6 ДИСКУСИЈА

Успехот во третманот на АЛЛ во детската возраст претставува едно од најголемите достигнувања во борбата против малигните болести воопшто. Успешната приказна започнува пред повеќе од половина век, поточно во 50-те години на минатиот век, кога Фарбер и неговите соработници забележале дека антагонистите на фолната киселина интерферираат со растот на клетките. Ова сознание довело до вклучување на МТХ-от во режимите за третман на АЛЛ (40) и за прв пат била постигната краткотрајна ремисија кај пациентите со АЛЛ.

Подоцна со развојот на онкологијата, со воведувањето на мултиагентната терапија, формирањето на интернационални студиски групи кои работат според добро дизајнирани протоколи, со препознавањето на местата во организмот каде слабо пенетрираат цитотоксичните лекови, профилактичката терапија на ЦНС и идентификација на клиничките и биолошките параметри кои влијаат на исходот на лекувањето кај пациентите со АЛЛ, се постигна висока стапка на ремисија (18), така да денес со право се говори дека АЛЛ во детската возраст е излечива болест.

И покрај овој голем успех сè уште не е возможно да се идентификуваат извесен број на пациенти со АЛЛ кои нема да одговорат на терапијата, како и пациенти кај кои ќе се манифестираат токсични ефекти (28).

Регистрирана е голема индивидуална варијабилност во фармаколошкиот одговор на високите дози на МТХ. Бидејќи постоечките стратификациони режими не се доволни за да предвидат кои пациенти нема да одговорат на терапијата или се под зголемен ризик за развој на токсични ефекти, истражувањето на специфични генски варијанти се најде во фокусот на актуелните истражувања. Главниот клинички предизвик е да се најде баланс меѓу ефикасноста на терапијата и токсичноста од истата, посебно кај малигните болести кои имаат висока стапка на излекување во која спаѓа и АЛЛ. Пред скоро една деценија беше прикажано дека прилагодување на дозата на МТХ на индивидуалната способност на пациентот за елиминација на лекот може да го подобри исходот од третманот на АЛЛ (84).

Предвидувањето на концентрацијата на МТХ за време на фазата на елиминација и администрацијата на фолна киселина според потребите на секој пациент заедно придонесоа за намалување на токсичноста (85).

Последниве години актуелни се студии кои имаат за цел да пронајдат фармакогенетски маркери поврзани со токсичноста кај децата со АЛЛ. Бидејќи МТХ е стожерот во третманот на детската АЛЛ постои голем интерес во истражување на полиморфизмите на гените вклучени во неговите метаболни и транспортни патишта.

Главната цел на нашата студија беше истражување на генетски маркери за идентификација на пациентите со нарушен метаболизам на МТХ кој се манифестира со појава на токсични ефекти во тек на третманот и/или лош исход на терапијата. Ова би овозможило третманот на АЛЛ да биде посигурен и поефикасен.

Во студијата беше анализирана асоцијацијата на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам и ризикот за појава на леукемија, како и нивното влијание врз појавата на токсичните ефекти од високите дози на МТХ кај децата со АЛЛ.

6.1 ГЕНОТИПИЗАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ ВО НАШАТА СТУДИЈА

6.1.1 ДИСТРИБУЦИЈА НА ГЕНОТИПОВИТЕ КАЈ СТУДИСКАТА И КОНТРОЛНАТА ГРУПА

Фреквенцијата на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам варира во различни географски региони во зависност од етничката дистрибуција. Се смета дека овие варијации се должат воглавно на генетското наследство, но некои автори сметаат дека можеби има улога и меѓусебната интеракција на гените со надворешната средина (пр. начинот на исхрана, климата, вегетацијата и сл.) . Внесот на фолати е помал кај населението во Северна Европа, додека внесот на фолати е поголем кај населението во Медитеранскиот регион. Во услови на зголемен внес на фолати може да преживеат хомозиготите за полиморфизмите кои доведуваат до намалени нивоа на фолати (пр. зголемена фреквенца на хомозиготи за *MTHFR*C677T полиморфизмот во Медитеранот, додека фреквенцијата на овој полиморфизам е многу помала во Нордиските земји каде е многу помал внесот на фолати). Други пак фреквенцијата на овие полиморфизми ја поврзуваат со влијанието на ултравиолетовата светлина која предизвикува фотолиза на фолната киселина. Населението во Северна Европа е изложено на пониска УВ радијација заради што во текот на еволуцијата помалку пигментираната кожа станала предоминантна во овие

краишта, за поефикасно користење на ефектите на намалената УВ радијација за подобрување на Д-витамин статусот. Дури и при пониска експозиција на УВ светлина како што е случајот во Северна Европа, заради помалку пигментираната кожа кај ова население, може да настане поголема фотолиза на фолатите, состојба која заедно со намалениот внес на фолати би можела да го намали преживувањето на хомозиготите за полиморфизмите кои го намалуваат нивото на фолати во крвта (86).

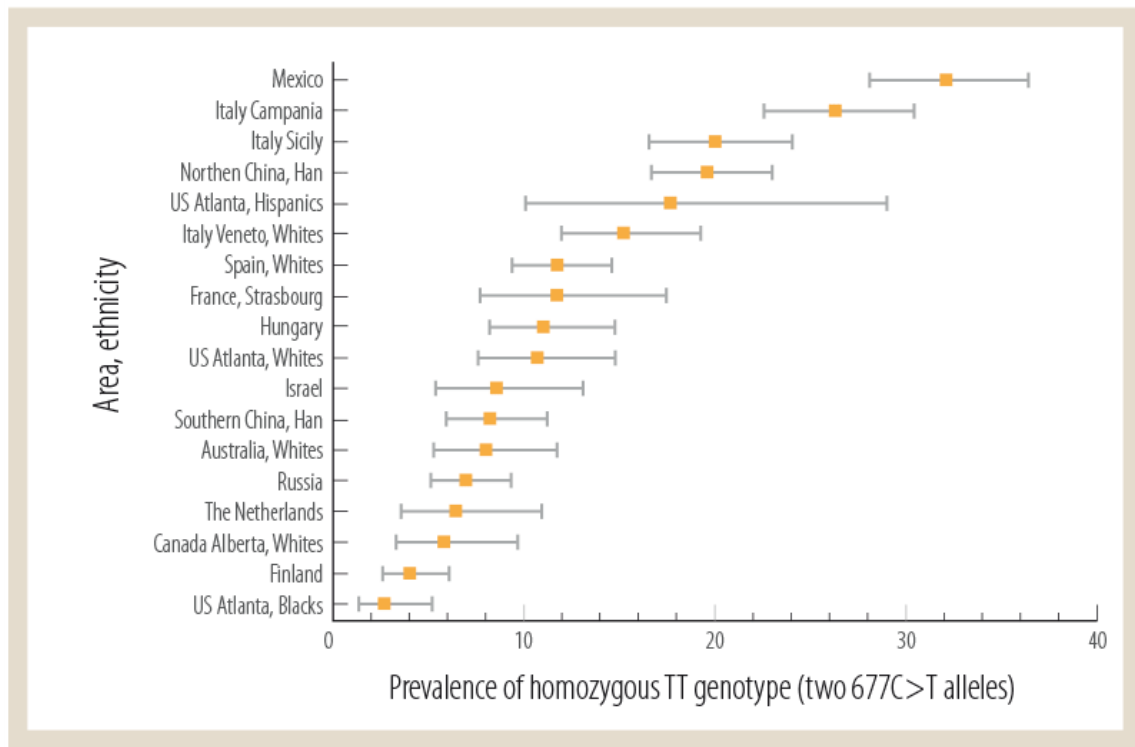
6.1.2 ДИСТРИБУЦИЈА НА *MTHFR* C677T ПОЛИМОРФИЗМОТ

Во нашата студија дивиот тип CC на *MTHFR* C677T полиморфизмот беше застапен кај 35 пациенти (54,69%) од студиската популација, и кај 21 (48,84%) од контролната група, CT полиморфизмот беше застапен кај 17 пациенти (26,56%) од студиската, односно 12(27,91%) кај контролната и TT полиморфизмот беше застапен кај 12 пациенти (18,75%) од студиската и 10 (23,26%) кај контролната група. Не е забележана статистички сигнификантна разлика во фреквенцијата на генотиповите меѓу двете групи. Дистрибуцијата на хомозиготите за варијантниот тип (TT) на *MTHFR* 677 полиморфизмот во нашата популација беше приближно ист со Италијанската, Шпанската популација и Северно Кинеската популација.

Според податоците од литературата фреквенцијата на C677T полиморфизмот на генот за *MTHFR* ензимот е почеста кај Италијанската и Шпанската популација и изнесува 18-20% кај субјектите хомозиготи за TT полиморфизмот. Кај нордиската популација инциденцата на овој полиморфизам е пониска, изнесува помалку од 10% во хомозиготна форма (30), додека кај африканската популација скоро и да не е присатен овој полиморфизам (87).

Рапортирана е фреквенција од 1% на TT полиморфизмот кај црната популација во САД, суб-сахарска Африка и јужна Америка. Во Јапан 12% од населението се хомозиготи за TT полиморфизмот, а во северна Кина 20% од населението се хомозиготи за овој полиморфизам (62,88). На слика бр. 11 е прикажана дистрибуцијата на *MTHFR* C677T полиморфизмот во светот.

Population frequency of homozygosity by geographic area and ethnicity.
Adapted from [9]



Слика. 11: B. Wilcken at all Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet 2003;40:619–625 (88)

Во Мексико е регистрирана највисока фреквенција на хомозиготите за ТТ полиморфизмот 34,8%, хетерозиготите се застапени со 47,6%, а хомозиготи за дивiot тип 17,6% (86, 89, 90) .

6.1.3 ДИСТРИБУЦИЈА НА *MTHFR* A1298C ПОЛИМОРФИЗМОТ

Во нашата студија дивiot тип АА на *MTHFR* A1298C полиморфизмот е застапен кај 39 пациенти (61,90%) од студиската популација, и кај 25 (59,52%) кај контролната група, АС полиморфизмот е застапен 10 пациенти (15,87%) кај студиската, односно 7 (16,67%) кај контролната и СС полиморфизмот е застапен кај 14 пациенти (22,22%) од студиската и 10 (23,81%) кај контролната група. Не е забележана статистички сигнификантна разлика на инциденцата на генотиповите меѓу двете групи. Споредено со податоците од литературата во нашата популација многу почесто е застапен варијантниот СС генотип на *MTHFR* 1298 полиморфизмот.

Во студијата на Запакоста во која е спроведена генотипизација на 104 новородени во Италија за A1298C полиморфизмот утврдена е следната фреквенција на генотиповите AA 47,1%, AC 42% и CC 13%. Дистрибуцијата на генотиповите била многу слична со очекуваната дистрибуција на генотиповите во согласност со Харди Вајнберговиот еквилибриум. Во Франција CC генотипот бил застапен 11,5%, додека C алелот бил застапен 35,7%, во Мексико 2,3% CC, 14,3% C алелот. Кај азиската популација CC генотипот е застапен кај 2-4% од популацијата. Во западна Африка е многу ниска застапеноста на CC генотипот на MTHFR 1298 и таа изнесува 1,9% (44,91,92). Фреквенцијата на MTHFR A1298C полиморфизмот кај различни популации е прикажана на слика бр.12

Табела 4.59: Фреквенција на MTHFR A1298C(<http://www.mdl-labs.com/>)

Фреквенција на MTHFR A1298C полиморфизмот во %			
Афричко население	65	30	3
Азијати	50-65	30-45	2-4
Бело население	45-50	40-45	10-12
Шпанско население	50-65	25-35	2-6

6.1.4 ДИСТРИБУЦИЈА НА TSER ПОЛИМОРФИЗМОТ

Во нашата студија 2R/2R генотипот беше присутен кај 17 пациенти (26,15%) од студиската популација, и кај 5 (11,63%) кај контролната група, 2R/3R полиморфизмот беше присутен кај 26 пациенти (40%) кај студиската, односно 25(58,14%) кај контролната и 3R/3R полиморфизмот беше присутен кај 22 пациенти(33,85%)од студиската и 13 (30,23%) кај контролната група. Забележана е статистички сигнификантна разлика во застапеноста на 2R/3R во однос на 2R/2R генотипот кај студиската група во однос на контролната група (OR =0,306; 95%CI = 0,10-0,95; p=0.036)

Во три студии во Велика Британија и во три студии во САД кои се состоела претежно од бела популација 19-23% од населението имале 2R/2R генотип, фреквенцијата на овој генотип кај субјектите од две Африкански и една афроамериканска студија изнесувала 14-20%, додека овој генотип бил застапен со 17% кај субјекти кои потекнувале од азиските земји, а живеат во Шкотска . Кај Кинеската популација инциденцата на овој полиморфизам изнесувала 2-4%. Во сите студии фреквенцијата на генотиповите била во согласност со Харди Вајнберговиот еквилибриум (62).

Фреквенцијата на алелот за тројната репетиција(3R) во тандем во студијата на Марш е рапортирано дека изнесувала 49% за населението во Кенија, 56% во Гана, 52% за Афроамериканци, 54% за бело население во Америка и 54% за бело население од Британија (93). И во нашата студија фреквенцијата на 3R алелот беше со слична фреквенција, таа изнесуваше 53% кај студиската и 59% кај контролната група.

Во студијата на Улрих во која било опфатено само белото население во Америка застапеноста на 3R/3R во хомозиготна форма изнесувала 10% (94).

Во студијата на Јакопета застапеноста на 3R/3R полиморфизмот кај 91 здрави субјекти од Австралија изнесувала 34% , 2R/3R генотипот бил застапен кај 44% од субјектите, а 2R/2R генотипот кај 22%(79). Џованети рапортира најголема застапеност на 3R/3R кај населението во Индонезија, додека кај децата со АЛЛ од белата раса изнесувала 33,1% (95). Во студијата на Зоу фреквенцијата на 2R алелот кај азијатите изнесувала 17%, сигнификантно пониска од белото население кај кого изнесувала 46.7% (96)

Во студијата на Мелчиор која се состоела од пациенти со успешно третирана АЛЛ и од пациенти со релапс на АЛЛ дистрибуцијата на 3R/3R полиморфизмот на ТС изнесувала 22%, односно 20% соодветно (97).

6.1.5 ДИСТРИБУЦИЈА НА MS2756 A/G ПОЛИМОРФИЗМОТ

Во нашата студија нормалниот генотип AA беше застапен кај 36 пациенти (55,38%) од студиската популација и кај 33 субјекти (76,74%) кај контролната група, AG полиморфизмот беше застапен кај 28 пациенти (43,8%) од студиската, односно кај 10 субјекти (23,26%) од контролната група и GG полиморфизмот беше застапен само кај 1 пациент (1,54%) од студиската, истиот не беше присутен кај ниеден пациент од контролната група. Овие податоци се слични со податоците објавени во литературата. При статистичка обработка на податоците беше утврдена статистички сигнификантна разлика во застапеноста на AG во однос на AA полиморфизмот кај студиската група во однос на контролната група (OR =2,567; 95%CI = 1,08-6,08; p=0.030), што укажува на зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овој полиморфизам.

Кај Јапонската, Кинеската и Кореанската популација фреквенцијата на GG генотипот изнесува 2-3% (98)

Во повеќето европски студии околу 3% од субјектите се носители на GG генотипот. Застапеноста на овој полиморфизам во американските студии бил 1-5%, со исклучок на

две студии каде фреквенцијата на овој генотип била 10-11% кај деца од белата раса чии мајки потекнувале од Канада и на субјекти од Хаваи. Во една студија кај афроамериканската популација фреквенцијата на овој генотип изнесувала 6%(62).

6.1.6 ДИСТРИБУЦИЈА НА *RFC 80 A>G (SLC19A1 80)* ПОЛИМОРФИЗМОТ

Во нашата студија АА генотипот беше застапен кај 12 пациенти (18,46%) од студиската популација и кај 21 (48,44%) од контролната група, АГ генотипот беше застапен кај 32 пациенти (49,23%) од студиската, односно 12(27,91%) кај контролната и GG генотипот беше застапен кај 21 пациент (32,31%) од студиската и 10 (23,26%) кај контролната група. При статистичка обработка на податоците беше утврдена статистички сигнификантна разлика меѓу двете групи во однос на присуството на АГ (OR =4,667; 95%CI = 1,77-12,33; p=0.001) и GG (OR =3,675; 95% CI = 1,31-10,34; p=0.012) генотипот, поточно овие полиморфизми беа почесто застапени во студиската група.

Исто така и во студијата на де Јонге, на популација од Холандија, GG генотипот на *RFC 80 A>G* полиморфизмот бил почесто застапен кај студиската популација (21,6)% во однос на контролната група (13,7%). АГ генотипот бил застапен 49,8% кај студиската, односно 48.7% кај контролната и АА генотипот бил застапен кај 28,6% од студиската популација и кај 37,6% кај контролната група. Овие резултати се слични со резултатите рапортирани во студии спроведени на француска (99) и британска популација (42, 100, 101)

Во студијата на Соок фреквенцијата на GG генотипот кај белата популација изнесувала 0,29, GA: 0,473 и AA:0,237. Фреквенцијата на А алелот изнесувала 0,473 кај белата популација, 0,564 кај афроамериканската популација и 0,472 кај шпанската популација (102).

Во студијата на Грегерс GG генотипот бил застапен кај 30%, GA 50% и АА кај 20% од пациентите со АЛЛ од машки и женски пол, додека во групата на здрави крводарители застапеноста на GG, GA, and АА генотиповите била 38%,54% и 14% кај мажите, а 22%,54% и 20% кај жените соодветно (103).

6.1.7 ДИСТРИБУЦИЈА НА *ABCB1 A2677G/T* ПОЛИМОРФИЗМОТ

При анализа на фреквенцијата на генотиповите кај студиската и контролната група GG генотипот беше присутен кај 10,77% од студиската, односно 27,9% кај контролната, GA генотипот кај 13,85%, односно 11,63%, GT- 47,69 % односно 37,21% , AT – 3.08%

односно 6,98%, AA – 4,62% односно 2,33% и TT – 20,0% односно 13,95%. Забележана е статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на GT генотипот меѓу студиската и контролната група - OR (95%CI) 3,321(1,09-10,08) $p=0,030$, како и во дистрибуцијата на AA генотипот - OR (95%CI) 5,143(0,44-59,46) $p=0,162$ и TT генотипот OR (95%CI) 3,714(0,97-14,23) $p=0,051$, без статистичка сигнификантност.

Полиморфизмите на АБЦБ1 генот се најзастапени кај белата раса и азиската популација, додека најмала фреквенција е забележана кај африканската популација. Малку информации постојат за C2677G/A полиморфизмот и C1236T кои иако се истражувани во врска со одредени заболувања и со фармакокинетика на лекови, лимитиран е бројот на објавени метаанализи околу нивната инциденца и нивниот клинички импакт (104). Во студијата на Јанг, спроведена на деца со АЛЛ со кинеско потекло, GG генотипот бил застапен кај 22,9%, TT генотипот кај 17,1%, а AA генотипот кај 1% од испитуваните субјекти. Застапеноста на хетерозиготните генотипови не е прикажани во студијата (105).

Во студијата на Креиле спроведена на 68 деца со АЛЛ од Латвија и 102 субјекти во контролната група AT генотипот бил застапен кај 7%, AG - 6%, GT - 37%, TT - 16%, GG - 34% и AA кај 7% од студиската популација, додека AT генотипот бил застапен кај 5%, AG -3%, GT - 42%, TT - 2%, GG - 31% и AA кај 4%. Во повеќето студии А алелот има многу ниска застапеност, сепак во студијата на Креиле спроведена на популација од Латвија застапеноста на овој полиморфизам изнесувала 7%. Во нејзината студија и во неколку други студии не е најдена сигнификантна разлика во застапеноста на овој алел, како и на другите алели меѓу студиската и контролната популација (106)

Во студијата на Урујама, застапеноста на G алелот изнесувала 57,3%, T алелот 43,3% и A алелот 4,7% кај деца со шпанско етничко потекло додека кај останатите деца од белата раса, застапеноста на G алелот изнесувала 53,6%, T алелот 43,3% и A алелот 3,1%(107). Во студијата на Чанг спроведена на пациенти од Кореа фреквенцијата на ABCB12677 генотиповите GG, GT, GA, TT, TA, and AA изнесувала 21.3%, 27.8%, 16.7%, 14.8%, 14.0%, и 3.3% (108).

Наумовска во студијата спроведена на Македонска популација утврдила фреквенцијата од 32.7%, 44.9% and 22.4% за 2677GG, 2677GT and 2677GT соодветно. Ниеден од испитуваните субјекти не бил носител на A алелот (109).

6.2 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

Фолатите имаат значајна улога во одржување на стабилноста на геномот. Инволвирани се како коензим во трансферот на C1 фрагментите, процес кој е од витално значење за синтезата на ДНК и РНК, за метаболизмот на аминокиселини и метилационите процеси.

Се смета дека повисоки нивоа на фолати може да придонесат во превенција на геномската нестабилност која претставува главна причина за малигната трансформација на клетките, додека недостатокот на фолати може да го поддржи процесот на карциногенезата. Од друга страна пак високи нивоа на фолати може да ја забрзаат прогресијата на веќе постоечките неоплазми.

Антифолатите се применуваат во третманот на малигни заболувања, а метаболните патишта на фолатите се користат како целно место за пренос на цитотоксичните лекови до малигните клетки кои имаат зголемена експресија на генот за фолатниот рецептор. Всушност, фолатниот метаболизам во третманот на малигни заболувања не се користи само како целно место за хемотерапевтиците, туку и како средство во борба против малигните клетки (110).

Заради ова сознание постои огромен интерес за проучување на фолатниот метаболизам и неговите пореметувања, бидејќи тој претставува важен фактор во етиопатогенезата и третманот на малигните заболувања. Една од причините за пореметување на фолатниот метаболизам претставува присуството на полиморфизми на гените кои ги кодираат клучните ензими и рецептори во фолатниот метаболизам.

Полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам може да влијаат на клеточниот метаболизам на фолати преку намалување на фолатниот статус или преку промена на интрацелуларната дистрибуција на фолати. Ова може да влијае врз зголемување на ризикот за појава на канцер преку неколку механизми (111).

Ниската расположливост на фолати или редистрибуцијата на фолати за реметилација на хомоцистеинот ја намалуваат достапноста на фолати за потребите на тимидилат синтетазата и за синтезата на ДНК што доведува до нарушено вградување на урацил во ДНК, процес кој можеби доведува до оштетување на двојната верига на ДНК и оштетување на хромозомите (112). Од друга страна пак намалената достапност на фолати за нормално одвивање на метионинскиот циклус доведува до намален

трансметилационен капацитет и до хипо или дисметилација на ДНК на протонкогените или тумор супресор гените (113). Хипометилацијата на ДНК и нарушената инкорпорација на урацил се сметаат за важни фактори во процесот на карциногенезата (114, 115).

Посебно значајни се процесите на хипометилацијата во промоторниот регион на протонкогените или хиперметилација на тумор супресорните гени, процеси кои може да доведат до селективена пролиферација и трансформација на клетките (59).

Споредувајќи ги шесте полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам меѓу студиската и контролната група, кои беа предмет на оваа дисертација, беше регистрирана статистички сигнификантна разлика во присуството на *TSE*R 2R/3R [OR (95%CI) 0,306 (0,10-0,95), $p=0.036$], *MS* 2756AG [OR (95%CI) 2,567 (1,08-6,08), $p=0.03$], *SLC19A180* AG [OR (95%CI) 4,667 (1,77-12,33), $p=0.001$], *SLC19A1* 80 GG [OR (95%CI) 3,675 (1,31-10,34), $p=0.012$], како и *ABCB1* GT [OR (95%CI) 3,321 (1,09-10,08), $p=0.03$] полиморфизмот кај студиската популација во однос на контролната група. Пациентите носители на *TSE*R 2R/3R полиморфизмит имаат намален ризик за леукемија, додека носителите на *MS* 2756AG, *SLC19A180* AG и GG и *ABCB1* GT полиморфизмите имаат зголемен ризик за леукемија. Регистриран беше зголемен ризик за појава на леукемија кај пациентите со *ABCB1* GA [OR (95%CI) 3,086 (0,73-12,98), $p=0,119$] *ABCB1* AA [OR (95%CI) 5,143 (0,44-59,46), $p=0,162$], *ABCB1* TT [OR (95%CI) 3,714 (0,97-14,23), $p=0,051$] полиморфизмите, без статистичка сигнификантност.

При споредба на дистрибуцијата на алелите меѓу двете групи испитаници беше детерминирана статистички сигнификантна разлика во присуството на G алелот на *MS* 2756 ($p=0.034$) и на G алелот ($p=0.005$) на *SLC19A1* 80 генот кај студиската популација, што исто така укажува на зголемен ризик за леукемија кај носителите на овие алели.

6.2.1 АСОЦИЈАЦИЈА НА *MTNFR* C677T И A1298C ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

Улогата на МТХФР ензимот во предиспозицијата кон малигни заболувања се должи на неговата инволвираност во две патеки на фолатниот метаболизам. Едната патека води кон бројни метилациони процеси кои се зависни од САМ (с-аденозил метионин), додека другата патека, преку ензимот тимидилат синтетаза, води кон репликација на ДНК и понатаму кон клеточна делба. Намалената активност на МТХФР ензимот може да ја намали метилацијата на хомоцистеин во метионин и нивото на САМ што доведува до хипометилација на ДНК. Од друга страна, намалените нивоа на 5,10 –

метилен ТХФ, кој претставува субстрат за ензимот МТХФР и е неопходен за синтеза на тимидилат, може да доведе до погрешно вградување на урацил во ДНК, нарушена репарација на ДНК и зачестени кршења и оштетувања на хромозомите.

Малигните заболувања кои потекнуваат од пролиферативни ткива кои брзо се делат и имаат зголемена потреба за синтеза на ДНК се многу поосетливи на недостатокот на фолати и на консеквентното оштетувањето на ДНК. Во повеќето студии генските полиморфизми кои доведуваат до намалена активност на МТХФР ензимот се асоцирани со намален ризик за леукемија, лимфоми и колоректални карциноми. Се претпоставува дека можната причина за ова е присутниот шант на фолатниот метаболизам насочен кон синтеза на тимидин и пурин, процес кој би ја успорил инкорпорацијата на урацил во ДНК и на тој начин би делувал заштитно во процесот на карциногенезата (116).

Повеќе студии покажуваат дека нискиот фолатен статус е асоциран со зголемен ризик за малигни заболувања, посебно со карциномот на колон. Утврдено е дека носителите на МТХФР 677ТТ со нормален фолатен статус имаат намален ризик за карцином на колон и други малигни заболувања(117,118,119). Некои автори сметаат дека овој парадокс може да се објасни со тоа што во услови на намалена активност на ензимот МТХФР, поголеми количини на неговиот субстрат (5,10 – метилен-ТХФ) е достапен за синтеза на пурини и пиримидини што доведува до стабилна синтеза на ДНК и намалена можност за генски мутации (120,121). Оваа хипотеза била поддржана подоцна од страна на Багли и Селхуб (122) кои докажале присуство претежно на 5- метил-ТХФ во еритроцитите на индивидуите со дивiot МТНFR 677СС генотип, додека кај индивидуите со варијантниот МТНFR 677ТТ генотип бил присатен и 5,10 – метил ТХФ и 5-метилен ТХФ. Овие сознанија покажуваат дека намалената активност на МТХФР доведува до алтерација на нормалната интрацелуларна дистрибуција на фолатните субстрати во корист на прекурзорите на пуринската и пиримидинската синтеза (123).

Во нашата студија не е регистрирана значајна разлика во однос на дистрибуцијата на генотиповите на генот за МТНFR – С677Т и А1298С меѓу студиската и контролната група, што е во склад со четири студии: Chiusolo et al, 2004; Thirumaran et al, 2005; Zanolto et al, 2006 и Oh et al, 2007, кои исто така не утврдиле значајна разлика во однос на ризикот за АЛЛ кај носителите на овој полиморфизам (124,125,126,127).

Други автори регистрирале намален ризик за АЛЛ кај носителите на овој полиморфизам. Во студијата на де Јонге добиените резултати покажале помала застапеност на *MTHFR* 677 CT полиморфизмот кај пациентите со АЛЛ [OR = 0.7; 95% CI, 0.5-1.0; *P* =0.03], посебно Т алелот бил помалку застапен кај нив, што укажува на намален ризик за АЛЛ кај пациентите носители на Т алелот [OR = 0.7; 95% CI, 0.5-1.0; *P* =0.02]. Не е нотирана протективна улога на *MTHFR* 1298A>C полиморфизмот врз ризикот за појава на АЛЛ (42). И во студијата на Франко е забележан 2,4 пати намален ризик за развој на АЛЛ кај пациентите со *MTHFR* C677T полиморфизмот, додека *MTHFR* A1298C полиморфизмот не бил сигнификантно поврзан со ризикот за АЛЛ (128). Исто така и студијата на Копен која опфатила 14 студии со вкупно 729 деца со АЛЛ и контролна група од 1821 пациент, пациентите носители на полиморфизмите 677C>T и 1298A>C на *MTHFR* генот, имале намален ризик за развој на АЛЛ (129).

Во мета анализата на Јан пациентите носители на Т алелот на *MTHFR* C677T полиморфизмот исто така биле асоцирани со намален ризик за АЛЛ и кај азиската и кај белата популација, додека *MTHFR* A1298C не била асоциран со ризикот за АЛЛ (130).

Студијата на Скибола спроведена на возрасни пациенти со леукемија во Британија утврдила намален ризик за АЛЛ кај носителите на *MTHFR* 677TT, 1298AC и CC генотиповите (131).

Во студијата на Крајинович истражувана е асоцијацијата на *MTHFR* полиморфизмите и ризикот за АЛЛ кај пациенти со француско и канадско етничко потекло пред и по фортификацијата на брашното со фолна киселина која во овие земји е мандаторно воведена од 1996 година. Утврдиле намален ризик за АЛЛ само кај носителите на *MTHFR* C677T и A1298 C пред периодот на мандаторна фортификација, што сугерира дека заштитниот ефект на *MTHFR* зависи од интеракцијата меѓу гените и надворешните фактори, односно и од присуството на полиморфизмите на *MTHFR* и од фолатниот статус на пациентите со АЛЛ (116).

Од друга страна пак во една студија спроведена од страна на Kim et al, 2009 на корејска популација утврден е зголемен ризик за АЛЛ (132).

6.2.2 АСОЦИЈАЦИЈА НА TSER ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

Тимидилат синтетазата игра важна улога во рамномерно снабдување со деоксинуклеотиди, неопходни за синтеза на ДНК. Оштетувањето на овој ензим е асоцирано со зголемена фрагилност и оштетување на хромозомите.

Полиморфизмите на генот одговорен за синтеза на ТС може да ја изменат експресијата на генот. Присуството на тројната репетиција (3R/3R) наспроти двојната репетиција во тандем (2R/2R) на TSER во студии ин витро и ин vivo е покажано дека ја зголемува експресијата на генот. Оваа зголемена експресија може да ја зголеми конверзијата на деоксиуридинмонофосфат (дУМП) во деокситимидинмонофосфат (дТМП) и со тоа да ја намали инкорпорацијата на урацил во ДНК. Теоретски ова би можело да го ограничи оштетувањето на ДНК во ткивата кои брзо се делат и кои имаат зголемена потреба од ДНК, како што се клетките инволвирани во хематопоезата, намалувајќи го ризикот за АЛЛ.

ТС го врзува метилен ТХФ кој служи како метил донор при конверзијата на дУМП во дТМП при процесот на синтеза на ДНК. Намалување на експресијата на ТС генот може да го засегне нормалното снабдување со деоксинуклеотиди неопходни за нормална ДНК синтеза, посебно во ткивата кои брзо се делат како што е на пример хемопоезското ткиво.

Некои автори сметаат дека зголемено количество на метилен ТХФ во процесот на ДНК синтезата може да го атенуира ризикот за малигна болест. Во случај на недостиг на фолати или при инхибиција на ТС големи количини на урацил се акумулираат во ДНК, што доведува до деградација на новосинтетизираната ДНК. Високи нивоа на неправилна инкорпорација на урацил пропратени со екстензивна репарација на ДНК го зголемува кршењето на двојната верига на ДНК што може да е поврзано со хромозомална нестабилност, транслокации и хромозомски аберации – појави поврзани со зголемен ризик за леукемија (133).

Во нашата студија статистички сигнификантно беше намален ризикот за АЛЛ кај носителите на TS 2R/3R варијантата [OR (95%CI) 0,306 (0,10-0,95), $p=0.036$]. Исто така и во студијата на де Јонге намален бил ризикот за АЛЛ кај пациентите носители на TSER 2R/3R варијантата [OR = 0.7; 95% CI, 0.4-1.0; $P = 0.04$] (42). Исти резултати добил и Скибола во студијата која се состоела од возрасни пациенти со АЛЛ, ризикот

за АЛЛ бил намален за 2,8 пати кај носителите на *TSER* 2R/3R полиморфизмот (OR = 0.36; 95% CI: 0.16-0.83), додека пациентите носители на *TSER* 3R/3R генотипот имале уште помал ризик за АЛЛ (OR = 0.25; 95% CI, 0.08-0.78) (133).

Наспроти овие резултати Венг во својата мета – анализа ,анализирајќи вкупно 17 студии со 4511 случаи и 6113 контроли утврдил асоцијација на хематолошки малигноми кај децата со 3R/3R полиморфизмот на *TSER* (3R/3R vs 2R/2R: odds ratio (OR) = 1.46, 95% confidence interval (CI):1.03-2.06 , но кај возрасните пациенти ризикот за АЛЛ бил намален (2R/3R vs. 2R/2R: odds ratio [OR] = 0.64, 95% confidence interval [CI]: 0.43–0.97 (134)

Рахими во студијата спроведена на детска популација утврдил зголемена фреквенца на TS 2R алелот кај пациентите со АЛЛ (41.5%) во однос на контролната група-38% на (OR 1.4, 95%CI 0.76-2.56, P=0.27) (135)

Во студијата на Назкиполморфизмите на *TSER* не биле асоцирани со ризикот за АЛЛ во детската возраст (49).

6.2.3 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕНА ГЕНОТ ЗА *RFC1* 80 G>A(SLC19A1 80) СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

Заради важната улога на носачот на редуцираниот фолат (*RFC1*) во мембранскиот транспорт на фолати неопходен за целуларната пролиферација и регенерацијата на ткивата и заради примената на антифолати во терапијата на малигни заболувања голем е интересот на актуелните истражувања за генот кој го кодира *RFC1* рецепторот и неговите полиморфизми (136,137).

Функционалниот ефект на *RFC 80 A>G* полиморфизмот е малку истражуван. Ветстин ги истражувал транспортните можности на овој генетски полиморфизам „ин витро“ на K562 клетки, при што добиените резултати сугерирале дека *RFC1 80A>G* полиморфизмот има маргинална функција (56).Тој смета дека навлегувањето на повеќето оксидирани фолати, како на пример фолната киселина преодминантно се одвива преку фолатните рецептори, а не преку *RFC1*. Тешко е да се докаже дали ова се случува и „ин vivo“. Во студијата на де Јонге, интересно е тоа што пациентите носители на полиморфниот *RFC1 80A* алел имале повисок процент на екстрацелуларен фолат во однос на интрацелуларниот фолат. Оваа обсервација сугерира дека *RFC1 80A* има намалена ефикасност во целуларниот внес на фолатите. Исто така просечните вредности на фолати во плазмата кај здрави индивидуи носители на *RFC1 80AA*

варијантата биле нешто повисоки во однос на носителите на G алелот. Не се знае дали *RFC1 80A>G* варијантата предизвикува промена во редистрибуцијата на фолати во клетката. Пациентите носители на *RFC1 80A* алелот може да имаат намален внес на фолати или на MTX што може да го зголеми ризикот за АЛЛ или да ја намали ефикасноста на MTX. Интересно е тоа што генот за *RFC1* се наоѓа на 21-от хромозом, а знаеме дека присуство на екстра копии на овој хромозом (при хипердиплоидија) кај пациентите со АЛЛ се поврзани со подобра прогноза на болеста. Екстра копиите на 21-виот хромозом се асоцирани со појачана експресија на *RFC1* mRNA и зголемен внес на MTX, што најверојатно е причина за подобар исход кај овие пациенти, но може да е причина и за поизразени токсични ефекти во тек на терапијата со MTX (42,138).

Во нашата студија *SLC19A1 80 GG* [OR (95%CI) 3,675 (1,31-10,34), $p=0.012$] и AG [OR (95%CI) 4,667 (1,31-10,34), $p=0,001$] полиморфизмите беа статистички сигнификантно почесто застапени кај студиската група, што укажува на можен зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овие генотипови. При анализа на застапеноста на алелите кај пациентите беше утврдено дека G алелот е статистички сигнификантно почест кај студиската група во однос на контролната група [OR(95% CI) 2,23 (1,28-3,90), $p=0,005$].

Исто така и во студијата на Грегерс пациентите со *SLC19A1 80 GG* полиморфизмот имале дури 4,2 пати поголем ризик за АЛЛ во однос на контролната група(103).

Од друга страна, во студијата на де Јонге, *RFC1 80AA* хомозиготите и носителите на еден A алел имале зголемен ризик за АЛЛ. Пациентите хомозиготи за *RFC1 80AA* варијантата имале 2,1 пати зголемен ризик за АЛЛ (95% CI, 1.3-3.2; $p = 0.002$), аносители на A алелот 1,5 пати поголем ризик за АЛЛ (95% CI, 1.1-2.1; $p = 0.02$) (42).

6.2.4 АСОЦИЈАЦИЈА НА *MSA2756G* ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

Метионин синтетазата е важен ензим неопходен за одржување на адекватни нивоа на метионин која претставува есенциелна аминокиселина и претставува прекурзор за SAM(с- аденозил метионин). SAM е клучен донор на метил групи и е вклучен во преку 100 реакции на метилација меѓу кои и метилацијата на ДНК. Хипометилација во промоторниот регион на прото-онкогените или хиперметилација на овој регион на тумор супресорните гени може да предизвика селективен раст и трансформација на клетките. Тежок дефицит на витамин B12 или на метионин синтетазата предизвикува хипометионинемија, хиперхомоцистинемија и хомоцистинурија. Исто така може да

доведе до акумулација на 5-метилентетрахидрофолат и намалување на интрацелуларниот фолатен пул, вклучувајќи го и 5,10 - метилен тетрахидрофолат, неопходен за синтеза на тимидилат, што води кон нарушен баланс на деоксинуклеотидите и мегалобластна анемија. Како последица на ова настанува акумулација на деоксиуридилат во ДНК и можност за нејзино оштетување што може да се објасни улогата на намалената активност на MS ензимот во процесот на карциногенезата. Полиморфизмит на генот за метионин синтетазата (*MS A2756G*) ја менуваат активноста на ензимот бидејќи се лоцирани во доменот кој е вклучен во метилационите процеси и во реактивацијата на кофакторот - витаминот B12(59, 129, 139). Може да доведат до хипометилација на ДНК и нејзино оштетување.

Во нашата студија, *MS2756 AG* [OR (95%CI) 2,567 (1,31-10,34), $p=0,030$] полиморфизмот беше статистички сигнификантно почесто застапен кај студиската група, што укажува на можен зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овој генотип. Исто така и G алелот беше почест кај пациентите од студиската група [OR (95%CI) 4,496 (1,31-10,34), $p=0,034$], што е во согласност со податоците од литературата.

Во студијата на Лајтфут истражувана е асоцијацијата на полиморфизмите на клучните гени на фолатниот метаболизам кај 939 деца со АЛЛ и 89 деца со АМЛ. Вклучена била и контролна група од 824 испитаници без малигна болест за споредба на резултатите. Добиените резултати покажале зголемен ризик од 1.24 пати за АЛЛ кај хетерозиготите за *MS2756 AG* [OR(95%CI), 1.00-1.53; $p = 0.05$], и 1.88-пати зголемен ризик кај хомозиготите за варијантниот тип *MS2756 GG* ($p = 0.01$). Овие податоци на голема група пациенти со АЛЛ укажуваат дека генските полиморфизми на метионин синтетазата може да влијаат на ризикот за појава на АЛЛ преку влијание врз метилацијата на ДНК (хипометилација на ДНК) или преку влијание на феталниот раст и развој (139).

Исто така во студијата на Рахимифрекфенцијата на G алелот на *MSA2756G* полиморфизмот била повисока кај пациентите со АЛЛ во однос на контролната група во [OR 1.04, (95%CI) 0.58-1.87, $P=0.8$](135). И во студијата на Гемати спроведена на адулти, *MS 2756G* алелот бил асоциран со зголемен ризик за АЛЛ (140).

Од друга страна де Јонге и Скибола во своите студии покажале дека присуството на *MSA2756G* не го модулира ризикот за АЛЛ, дури Скибола испитувајќи ги ген-ген

интеракциите утврдил дека комбинираното присуство на овој полиморфизам и *SHMT1* 1420CT/TT полиморфизмот го намалуваат за 5,6 пати ризикот за АЛЛ (42, 133).

6.2.5 АСОЦИЈАЦИЈА НА АБСВ1 ПОЛИМОРФИЗМИТЕ СО РИЗИКОТ ЗА ПОЈАВА НА ЛЕУКЕМИЈА

ABCB1 генот ја кодира синтезата на п-гликопротеинот(п-гп), АТФ зависен протеин, кој има улога во исфрлање на голем број ксенобиотички компоненти од клетката. П-гп е одговорен за намалена акумулација на лекови во клетките кои се резистентни на голем број медикаменти и често пати е виновен за развојот на резистенција кон антиканцер агенсите (141, 142)

ABCB1 генот има голема експресија во неколку субкласи на лимфоцити во коскената срцевина и периферната крв и некои експериментални студии покажале намалена активност на natural killer и CD8+ Т клетките по супресија на ABCB1 генот. Постојат податоци кои се во прилог на вклученоста на п-гп во ослободувањето на интерлеукин-2, интерлеукин-4 и интерферон гама од лимфоцитите. Во согласност со овие податоци п-гп има улога во етиологијата на леукемиите преку неговото учество во транспортот на ксенобиотици или преку модулација на имунолошкиот одговор (143).

И покрај многубројните истражувања сè уште малку се знае етиологијата на АЛЛ. Се смета дека леукемогенезата може да започне за време на феталниот живот или во раниот доеначки период, како последица на интеракцијата меѓу експозицијата на ендогени и егзогени фактори и генетската предиспозиција . Ксенобиотскиот метаболизам се смета како потенцијално важен процес кој има улога во етиопатогенезата на детската АЛЛ. Кога една индивидуа е изложена на различни хемикалии од надвор, ензимите вклучени во ксенобиотскиот метаболизам се одговорни за нивна елиминација низ фазите на оксидација и конјугација. Една од физиолошките улоги на п-гликопротеинот е заштита на организмот од токсичните ксенобиотици. Количината на ксенобиотици кои се транспортирани преку п-гп е пропорционална со нивната мутагената активност. Се претпоставува дека генетски условените разлики во п-гп може да доведат до различна експозиција на карциногени од надворешната средина, а негова намалена активност можеби е поврзана со зголемен ризик за малигни заболувања (70).

Во досегашните студии е објавено дека п-гп е трансмембранозен ефлуксен транспортер за различни канцерогени агенси и токсини и дека зголемената експресија на п-гп во

туморските клетки корелира со лош одговор на хемотерапијата и со лоша прогноза кај пациентите со малигни болести. Голем број на истражувачи го испитувале ефектот на полиморфизмите во АБЦБ1 генот врз развојот на резистенција кон лекови. До сега во литературата се рапортирани најмалку 50 СНП во АБЦБ1 генот (144). *G2677A/T* полиморфизмот е најчестата варијанта во кодирачкиот регион на АБЦБ1 генот (145). Докажано е дека овој полиморфизам е сигнификантно асоциран со зголемена или намалена концентрација на п-гп субстрати во плазмата. Некои истражувачи рапортираат дека носителите на 2677 TT генотипот имаат помала експресија на п-гп м-РНК отколку пациентите со 2677 GG генотипот, додека други истражувачи укажуваат на спротивен ефект на 2677T мутантниот алел, дека има поголема транспортна активност отколку 2677G алелот. Врз основа на овие податоци биолошката улога на *ABCB1 G2677A/T* полиморфизмот во процесот на карциногенеза е сè уште непознат. Достапните податоци покажуваат поврзаност на полиморфизмите на гените вклучени во транспортот и метаболизмот на ксенобиотици и зголемен ризик за АЛЛ. *ABCB1* генот има голем број на полиморфизми и некои од нив може да влијаат на ризикот за АЛЛ (146).

Во нашата студија *ABCB1 2677 GT* [OR (95%CI) 3,321 (1,31-10,34), $p=0,030$] полиморфизмот беше статистички сигнификантно почесто застапен кај студиската група, што укажува на можен зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овој генотип.

Во мета анализата на Јанг (105) не е најдена асоцијација на *ABCB1G2677A/T* полиморфизмот и ризикот за леукемија ,додека при дополнителна анализа на асоцијација на овој полиморфизам со типот на леукемија само кај две студии кои се состоеле од азиско и афричко население утврдена е асоцијација на TT полиморфизмот и ризикот за појава на миелоидна леукемија, но заради малиот број на субјекти вклучени во таа студија резултатите не се репрезентативно сигнификантни.

Во мета анализата на Занг утврден е сигнификантно зголемен ризик за АЛЛ кај пациентите носители на овој полиморфизам. По направената стратификација врз етничкото потекло сигнификантна корелација со зголемен ризик за АЛЛ е потврдена кај пациентите со азиско потекло, но истиот не е потврден кај белата популација (147).

Во мета-анализата на Јилан Јан не е најдена асоцијација меѓу *ABCB1 G2677T/A* полиморфизмот и ризикот за леукемија (148), но оваа анализа вклучувала и возрасни пациенти и нема податоци за третиот алел на овој полиморфизам.

Урајама во својата студија не утврдил сигнификантна асоцијација на четири полиморфизми на *ABCB1* SNPs (T-129C, C1236T, G2677T/A, C3435T) со ризикот за АЛЛ (143). Алелот А на овој полиморфизам е многу ретко истражуван во објавените студии, неговата фреквенција во студијата на Мадара изнесувала 7%. Мадара во својата студија ја испитувала асоцијацијата на овој полиморфизам со возраста на пациентите во моментот на дијагностицирањето на АЛЛ, при што е утврдено дека А алелот е почест кај деца со АЛЛ на возраст над 10 години, што укажува на можноста овој алел да е ризик фактор за појава на АЛЛ во покасната детска возраст. Иако нема силна статистичка сигнификантност за ова сознание ($p=0,05$), Мадара смета дека овој полиморфизам би можел да биде тригер фактор за АЛЛ (106).

6.3 ИНЦИДЕНЦА НА ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ КАЈ СТУДИСКАТА ГРУПА

Метотрексатот предизвикува апоптоза на малигните клетки, но истовремено делува цитотоксично и на клетките во организмот кои брзо се делат—клетките на мукозите, коскената срцевина и.сл. Како последица на тоа се јавуваат токсични ефекти од терапијата со високи дози на МТХ кај децата со АЛЛ—мукозити, транзитoren пораст на ензимите на црниот дроб, миелосупресија, инфекции, кожна токсичност и др (34,149,150). Најчесто овие токсични ефекти се транзиторни и реверзибилни, но понекогаш е неопходна модификација на дозите или дури и одложување на следниот циклус на хемотерапија, што може да го зголеми ризикот за релапс на болеста. Во литературата опишано е дека токсичните ефекти од високите дози на МТХ се почести и поинтензивни кај поголемите деца (151).

Неуротоксичноста е ретка пропратна манифестација на високите дози на метотрексат. МТХ -от може да предизвика акутна, субакутна и хронична неуротоксичност. Најчеста манифестација на неуротоксичните ефекти на МТХ е леукоенцефалопатија. Опишани се случаи со ненадејна појава на конвулзии, хемипареа, афазија и кома (152).

Промени на кожата во смисол на генерализирано црвенило пропратено со тешка десквамација на кожата е ретко манифестиран токсичен ефект од МТХ (153).

Опишани се и летални исходи како последица на токсичните ефекти од хемотерапијата, најчесто како резултат на сериозна инфекција или тежок хеморагичен синдром (154).

Кај голем процент на пациенти со АЛЛ, МТХ-от предизвикува покачување на АЛТ за време на терапијата на одржување кое е најчесто транзиторно и асимптоматско. Покачувањето на АЛТ не е предиктор за болест на црниот дроб и не е потребна модификација на третманот(155). Но и покрај бенигната природа на хепатотоксичноста предизвикана од МТХ-от, рапортирани се хепатоцелуларни карциноми во асоцијација со хепатална фиброза кај деца со АЛЛ по завршување на третманот на болеста (156).

Во нашата студија најчесто застапени токсични ефекти при терапија со високи дози на МТХ во студиската група беа хепатотоксичност (60%), потоа неутропенија (47,69%), анемија (38,46%), орален мукозит (23%) и тромбоцитопенија (18%). Останатите токсични ефекти кои се јавуваат во тек на терапијата со високи дози на МТХ беа многу ретко застапени, кај мал број на пациенти. Добиените резултати се во согласност со повеќето податоци објавени во литературата (157, 158, 159).

6.4 СТЕПЕН НА ИЗРАЗЕНОСТ НА ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ

Токсичните ефекти беа следени семиквантитативно во однос на тежината на манифестацијата на токсичниот ефект според образец од протоколот АЛЛБФМ2000. При тоа од најтежок степен (gr.IV) беше регистрирана тромбопенија кај 5 пациенти (7,69%), додека токсичен ефект од изразен степен (gr.III) - хепатотоксичност беше регистриран кај 12 пациенти(18,46%), а орален мукозит од истиот степен беше регистриран кај 9 пациенти(13,85%). Умерено изразена токсичност Анемија беше присутна кај 8 пациенти (12,31%), хепатотоксичност кај 16 пациенти (24,62%) и орален мукозит кај 11(16,92%) од умерено изразен степен (gr.II).

6.5 АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО АЛЛ

Токсичноста на МТХ-от е најверојатно комплексен биолошки проблем бидејќи опфаќа различни форми на токсичност кои ги засегаат скоро сите органи во човековото тело. Многу истражувачи се обидуваат токсичноста на МТХ да ја објаснат со промени во метаболните патишта и генските влијанија. Токсичните ефекти од високите дози на МТХ делумно може да се припишат на фолатниот антагонизам на МТХ , а дел можеби зависат од неговото влијание на други метаболни патишта. Одредени студии се обиделе високиот ризик за манифестирање на токсичност во тек на терапијата со МТХ да го поврзат со генски полиморфизми. Бидејќи МТХ е фолатен антагонист и ги

користи истите метаболни патишта како и фолатот, најчесто истражувани се полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам и нивното влијание врз појавата на токсични ефекти од МТХ. Дел од нив беа предмет на оваа докторска дисертација.

Во нашата студија систематски ги иследувавме ефектите на полиморфизмите: *MTHFR* 677C>T и 1298 A>C, *TSER 2R/3R*, *SLC19A1* 80A>G, *ABCB1* 2677 G>T/A и *MS* 2756 A>G врз инциденцата на токсичните ефекти од високите дози на МТХ.

6.5.1 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА МТХФР И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ

Генот за МТХФР и неговите полиморфизми имаат есенцијална позиција во научните истражувања кои се однесуваат на фолатниот метаболизам. Истражувана е неговата поврзаност со различни болести и пореметувања, како на пример со тромбофилија, компликации во бременоста, дефекти на неуралната туба, шизофренија, малигни заболувања и сл. Во педијатриската онкологија актуелни се истражувањата на поврзаноста на полиморфизмите на генот за МТХФР и ризикот за појава на леукемија токсичните ефекти од терапијата, ЕФС, како и ризикот за релапс на болеста и појава на секундарна малигна болест. Двата најчести полиморфизми *MTHFR* C677T и A1298C, доведуваат до намалена активност на ензимот и покачени вредности на хомоцистеин. Бидејќи МТХ доведува до инхибиција на активноста на овие ензими нашата анализа беше насочена кон влијанието на присуството на двата полиморфизми врз појавата на токсични ефекти во тек на терапијата со МТХ.

Во нашата студија хетерозиготите (СТ) и хомозиготите за варијантниот тип (ТТ) на C677T полиморфизмот на генот за *MTHFR* имаа зголемена инциденца на инфекции [OR (95%CI) 2,647 (0,90 - 7,79) RR (95%CI) 1,397 (0,97 - 2,02), p=0,073], истата не беше статистички сигнификантна. Познато е дека C677T генотипот ја намалува активноста на *MTHFR* ензимот и може да предизвика умерена хиперхомоцистинемија која претставува ризик фактор за оштетување на крвните садови. Во услови на сериозен метаболен дистрес кој се должи на примената на токсични лекови во тек на третманот на АЛЛ, дури и умерена хиперхомоцистинемија може да предизвика оштетување на васкуларниот ендотел и да ја зголеми предиспозицијата на ТТ хомозиготите кон сериозни инфекции (154).

При анализа на другите токсични ефекти не најдовме нивна поврзаност со овој полиморфизам.

Во мета-анализата на Lopez-Lopez E. која опфаќа 24 студии утврдена е асоцијација на MTHFR C677T со токсичните ефекти од високите дози на MTX само во девет студии (1, 29, 160-166) Во три од нив (161, 162, 165) утврдена е асоцијација на овој полиморфизам со хепатотоксичност. Во 13 студии не е утврдена асоцијацијата C677T генотипот и хепатотоксичност (1, 72, 74, 165, 167, 168, 169-174), така да би можеле да заклучиме дека C677T генотипот не е добар предиктор за појава на хепатотоксичност во тек на терапијата со високи дози на MTX кај деца со АЛЛ. Само во две студии составени од 64 и 40 деца е рапортирана асоцијација на овој полиморфизам со орален мукозит (29, 162), додека во осум студии, повеќето со поголем број на пациенти од претходните од различни етнички популации не е утврдена асоцијација на мукозит со C677T генотипот. (72, 165, 167-170, 174) Во две студии утврдена е асоцијација меѓу C677CT и C677TT генотиповите и тромбопенија, која статистички била сигнификантна кај CT генотипот (161,167). Понатаму една студија покажала намален ризик за тромбопенија кај TT генотипот, додека 6 студии не нашле никаква асоцијација меѓу C677T полиморфизмот и тромбопенија (29, 74, 165, 169, 170, 173). Би можеле да заклучиме дека достапните податоци не укажуваат на поврзаноста на овој генотип со појава на тромбопенија и мукозит. И во нашата студија немаше асоцијација меѓу C677T полиморфизмот и манифестација на мукозит и тромбопенија.

Од 7 студии кои ја истражувале асоцијацијата на C677T полиморфизмот и појавата на анемија (161, 165, 168, 169, 170, 172, 175) само во една студија е прикажана асоцијација на анемија со овој полиморфизам. Во 9 студии е истражувана асоцијацијата на C677T полиморфизмот и леукопенија. Во една студија е прикажан зголемена инциденца на леукопенија, (161) во една е намален (74), додека во 7 студии не е најдена никаква асоцијација на овој полиморфизам со леукопенија (29, 72, 169, 170, 172, 173, 175). Од резултатите на објавените студии може да се заклучи дека C677T полиморфизмот нема влијание врз појавата на анемија и леукопенија во тек на терапијата со MTX што беше случај и во нашата студија.

Бубрежна токсичност е анализирана во 3 студии. Во една е утврдена асоцијација на T алелот со зголемена бубрежна токсичност (161), додека друга поголема студија не регистрирала никаква асоцијација на T алелот со бубрежна токсичност(169). Од до

сега публикуваните податоци не може да заклучиме за јасна асоцијација на овој полиморфизам со бубрежна токсичност.

Во студијата на Ерчул која се состоела од 167 деца со АЛЛ не е најдена асоцијација на *MTHFR* полиморфизмите со *MTX* токсичност (169). Студиите на Shimasaki (160) и Seidemann (175) не потврдиле асоцијација меѓу *MTHFR*C677T полиморфизмот и токсичните ефекти од високите дози на *MTX*. Исто така и Кантар во својата студија не регистрирал токсични ефекти кај пациентите носители на *MTHFR*C677T полиморфизмот и покрај тоа што имале повисоки нивоа на *MTX* по истекувањето на лекот (172).

За разлика од овие студии во мета-анализата на Lin Yang која опфатила 14 студии во кои е истражувана асоцијацијата на *MTHFR* полиморфизмите со токсичноста од *MTX*, пет опфаќале азиска популација, 6 бела популација, една афричка популација и една студија опфаќала мешана популација (165). Во оваа мета анализа, *MTHFR*C677T полиморфизмот бил асоциран со сигнификантно зголемен ризик за манифестација на токсичност во тек на терапија со високи дози на *MTX*, посебно хепатотоксичност, орален мукозит, гастроинтестинална токсичност и кожна токсичност, додека *MTHFR* A1298C бил асоциран со намален ризик за појава на кожна токсичност. При стратификацијата на пациентите според етничката припадност утврдиле дека кај Афричката и Белата популација е почеста асоцијација на овој полиморфизам и хепатотоксичноста, додека истата не е присатна кај Азиската популација. Од друга страна пак оралниот мукозит бил почест кај пациенти носители на овој полиморфизам кај африканската и азиската популација. Исто така во студиите на Јазбец и Котник пациентите хомозиготи за 677TT полиморфизмот имале зголемена инциденца на мукозит во тек на терапија со високи дози на *MTX* (28,29).

Во студијата на Иманиши (1) статистички несигнификантна хепатотоксичност е регистрирана кај пациентите со Т алелот на *MTHFR*C677T полиморфизмот, а Киусоло исто така регистрирал асоцијација на овој полиморфизам со хепатотоксичност и миелотоксичност (176).

Во студијата на Тантави (162) терапијата со *MTX* била сигнификантно асоцирана со зголемен степен на токсичност, од трета и четврта степен кај пациентите со TT генотипот и тоа интестинален мукозит кај 81,3%, орален мукозит - 81,3%, покачени

трансаминази - 87,5%, неутропенија - 78,7% во однос на ЦЦ генотипот (7,7%, 7,7%, 15,3% и 7,7%).

При евалуација на асоцијацијата на *MTHFR* A1298 полиморфизмот со токсичните ефекти од МТХ-от во нашата студија беше утврдена статистички сигнификантно намалена инциденцата на хепатотоксичност кај пациентите со АС полиморфизмот [OR (95%CI) 0,190 (0,04 - 0,87) RR (95%CI) 0,433 (0,16 - 1,14), $p=0,023$]. Би можеле да заклучиме дека присуството на АС полиморфизмот влијае протективно, односно ги намалува шансите за појава на хепатотоксичност кај пациентите со АЛЛ во тек на терапија со високи дози на МТХ. При анализа на асоцијацијата на овој полиморфизам со инфекции, утврден беше зголемен ризик за инфекции кај пациентите носители на *MTHFR*1298 АС полиморфизмот [OR (95%CI) 5,040 (0,58 - 44,02) RR (95%CI) 1,404 (1,03 - 1,92), $p=0,113$] без статистичка сигнификантност. Другите токсични ефекти, кои беа застапени кај помалку од 5% од пациентите беа статистички сигнификантно почесто застапени кај пациентите со *MTHFR* A1298CC полиморфизмот [OR (95%CI) 6,095 (1,60 – 23,22) RR (95%CI) 3,184 (1,42 – 7,16), $p=0,005$].

Оваа обсервација е во согласност со студијата на Киусоло во која пациентите носители на *MTHFR*1298АС варијантата имале исто така намалена инциденца на хепатотоксичност ($p = 0.03$) (176).

Тантави (162) не утврдил сигнификантна асоцијација меѓу *MTHFR* A1298C полиморфизмите и токсичните ефекти од високите дози на МТХ.

Во мета анализата на Лопез(30) во 16 студии е анализирана асоцијацијата на *MTHFR* A1298C полиморфизмот и токсичните ефекти од високите дози на МТХ, во 8 студии не е најдена асоцијација со било каков токсичен ефект (74, 162, 164, 167, 169, 176-178). Во 5 студии авторите рапортирале протективен ефект на *MTHFR* 1298C алелот во однос на МТХ токсичноста (29, 72, 165, 173, 174). Во само три студии *MTHFR* 1298C алелот бил асоциран со повисока МТХ токсичност (168,170,172).

Во студијата на Котник, пациентите СС хомозиготите за *MTHFR* A1298С имале намален ризик за манифестација на леукопенија (29). Во студијата на Хуанг пациентите носители на *MTHFR* 1298 АС варијантата имале намалена сензитивност на

MTX „ин витро“ што може да ја објасни причината за протективниот ефект на овој полиморфизам при терапија со високи дози на MTX(72).

За разлика од овие студии во кои е опишана протективната улога на *MTHFR* A1298C полиморфизмот во тек на терапијата со високи дози на MTX, во студијата на Кантар (172) била утврдена зголемена токсичност кај децата со АЛЈ кои биле хетеро и хомозиготи за *MTHFR* A1298C полиморфизмот при апликација на високи дози на MTX. Кај овие пациенти била регистрирана почесто анемија од 3/4 степен($p=0,009$), тромбопенија ($p=0,0001$), покачени вредности на хепаталните ензими ($p=0,04$) и почести фебрилни епизоди ($p = 0,004$).

Влијанието на полиморфизмите на генот за *MTHFR* C677T и A1298C врз појавата на токсичните ефекти од високите дози на MTX во до сега објавените студии е контроверзно.

Причината за протективниот ефект на МТХФР полиморфизмите некои автори ја објаснуваат со намалената активност на овој ензим кај хетеро и хомозиготите. Намалената активност на ензимот доведува до намалена конверзија на 5,10 метилентетрахидрофолат во 5-метилтетрахидрофолат што овозможува поголемо количество на субстрат за ТС и поголема синтеза на ДНК. Овој процес може да резултира со помала токсичност при терапија со МТХ, но и со намалена антилеукемична активност на МТХ. Од друга страна, намалената конверзија на 5,10 метилентетрахидрофолат во 5-метилтетрахидрофолат може да доведе до инхибиција на метилационите процеси (хипометилација) процес кој е асоциран со зголемена МТХ токсичност.

Базирајќи се на податоците од литературата, C677TиA1298C полиморфизмите на *MTHFR* генот имаат влијание врз токсичните ефекти од високите дози на МТХ. Разликата и контроверзноста на резултатите од спроведените студии би можело да се должат на тоа што токсичноста од високите дози на МТХ претставува комплексно пореметување. Заради тоа се претпоставува дека влијанието на варијантните алели на генот за *MTHFR* може да биде модифицирано од големината на дозите на МТХ, истовременото присуство на други генски полиморфизми, растојанието меѓу две апликации, фолатниот статус на пациентот, придружната терапија или други фактори од надворешната средина (167).

6.5.2 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА ТИМИДИЛАТ СИНТЕТАЗА(TS) И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ

Тимицилат синтетазата е важен ензим во метаболизмот на фолати и игра важна улога во процесите на метилација и репарација на ДНК. Најчести полиморфизми на овој ген се двојната (2R) и тројната репетиција (3R) во тандем на 28 базни парови во засилувачкиот регион на TS генот (т.н. англ. Enhancer region – *TSER*). Овие генски варијанти се истражувани во многу студии при што добиените резултати укажуваат на нивната можна поврзаност со развојот на малигни заболувања, вклучувајќи ја и АЛЛ, како и со сензитивноста на хемотерапевтиците, меѓу кои и на МТХ(49).

Во нашата студија го испитувавме влијанието на 2R/2R, 2R/3R и 3R/3R полиморфизмите на *TSER* врз појавата на токсичноста од високите дози на МТХ.

Добиените резултати покажаа дека тромбопенијата беше статистички сигнификантно почеста кај пациентите носители на полиморфизмите за генот за *TSER*- 2R/3R [OR 8,471 (0,96 - 74,63),, RR (95%CI) 5,885 (0,82 - 42,34),p=0.029] и *TSER* - 3R/3R [OR 9,143 (1,01 - 82,45), RR (95%CI) 6,182 (0,85 - 44,78) p=0.025]. Леукопенијата беше почеста кај пациентите со *TSER*3R/3R полиморфизмот [OR 2,200 (0,60-8,08), RR (95%CI) 1,545 (0,73 – 3,27) p=0.232], како и кожноста токсичност кај пациентите со 2R/3R полиморфизмот [OR 2,087 (0,20-21,91), RR (95%CI) 1,962 (0,22 – 17,34) p=0.532] без статистичка сигнификантност. Другите токсични ефекти беа регистрирани почесто кај пациентите со *TSER* 2R/3R [OR 3,333 (0,61-18,14), RR (95%CI) 2,615 (0,63 – 10,86) p=0.149] и *TSER* 3R/3R [OR 2,206 (0,37-13,09), RR (95%CI) 1,932 (0,43 – 8,77) p=0.376], исто така без статистичка сигнификантност.

За разлика од нашите резултати во неколку студии е утврдено дека полиморфизмите на генот за TS влијаат протективно или воопшто не влијаат врз манифестацијата на токсичните ефекти од високите дози на МТХ. Во студијата на Ерчул (169) која се состоела од 167 деца со АЛЛ, присуството на полиморфизмот 3R/3R на генот за *TSER* сигнификантно го намалува ризикот за леукопенија (p=0,05) и тромбопенија(p=0,002).

Во студијата на Јазбец (28) и Радке (179) пациентите со *TSER* 2R/3R полиморфизам имале пониска инциденца на мукозити подобро ги толерирале високите дози на МТХ со помалку несакани ефекти. Исто така и во студијата на Барбара Фаганел (29) *TSER* 2R/3R полиморфизмот бил асоциран со пониска инциденца на тромбопенија и мукозит.

Во студијата на Лопез (30) и Зу (158) не била утврдена асоцијација на *TSER* полиморфизмот со МТХ токсичност

Некои автори сметаат дека зголемениот број на репетиции во тандем на *TSER* ја зголемува *TSmRNK* и протеинската експресија и дека зголемената експресија на *TSER* доведува до појава на резистенција кон МТХ и затоа пациентите со најмалку една репетиција во тандем го толерираат МТХ-от со помалку токсични ефекти (29, 179). Крајинович во својата студија рапортира дека пациентите хомозиготи за тројната репетиција во тандем (*TSER 3R/3R*) имаат и полоша прогноза болеста (204).

6.5.3 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА НОСАЧОТ НА РЕДУЦИРАНИОТ ФОЛАТ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ

Носачот на редуцираниот фолат *RFC1* е главен транспортер на МТХ чија нарушена функција е честа причина за појава на резистенција кон антифолатните агенси (180,181).

Различни генски промени кои го засегаат *RFC1* транспортот се најдени во клеточните линии резистентни кон антифолатите вклучувајќи ги и лимфобластите на пациентите со АЛЛ. Неодамна е идентифициран G80A полиморфизмот и е покажано дека Гваријантата корелира со пониски вредности на фолати во плазмата и повисоки вредности на хомоцистеин кај здрави луѓе (182) како и со дефекти на неуралната туба кај децата (183, 184). Бидејќи хомеостазата на фолатите и хомоцистеинот се засегнати од дејството на МТХ, можно е полиморфизмите на генот за *RFC1* да го модулираат третманот и исходот на пациентите третирани со овој медикамент (185, 186).

Во нашата студија AG + GG полиморфизмот на *RFC1* генот беше асоциран со појава на анемија [*OR* (95%CI) 3,400 (0,77 - 14,93), *RR* (95%CI) 2,125 (0,76 - 5,97)*p*=0,095], без статистичка сигнификантност.

Во студијата на Грегерс која опфатила 182 деца со АЛЛ обсервиран е повисок степен на хепатотоксичноста кај пациенти со *RFC1* GG варијантата (*P* =0.05), како и повисок степен на миелосупресија и поголема ефикасност од третманот со МТХ споредено со пациентите носители на GA/AA варијантата (*P* = 0.004). Во нивната студија е докажано дека пациентите со *RFC* GG полиморфизмот имале пониска концентрација на МТХ во плазмата што укажува на зголемен внес на МТХ во клетката (103).

Лавердиер во својата студија рапортирал повисока концентрација на MTX во плазмата кај пациентите со AA генотипот на G80A полиморфизмот на RFC1, што укажува на помал внес на MTX во клетката и полоша прогноза (187)

Причината за зголемената хепатотоксичност кај носителите на G алелот е нејасна. Се претпоставува дека во нормални услови високи нивоа на полиглутамати на фолната киселина се складираани во клетките на хепарот кај носителите на A алелот, што би можело да ги заштити клетките од токсичните ефекти на MTX. Дополнително повисоките вредности на фолат полиглутаматите во клетките на хепарот кај пациентите со AA алелите може да го намалат инфлуксот на MTX во хепатоцитот преку кој значајна фракција на MTX се елиминира во тек на третманот со високи дози на MTX. На овој начин може да се објасни зошто пациентите со A алелот имаат поспора елиминација на MTX и зошто тие имаат повисока концентрација на MTX во плазмата (103).

Од друга страна пак неколку студии сугерираат дека пациентите носители на A алелот имаат зголемена хепатотоксичност во тек на терапијата со високи дози на MTX. Тие сметаат дека RFC1 е клучен ензим во детерминирање на резидуалните нивоа на MTX во црниот дроб и носителите на овој алел имаат зголемената акумулација на MTX во хепатоцитот што доведува до зголемена хепатотоксичност и други видови на токсичност. Во две јапонски студии утврдена е асоцијација на покачени вредности на хепаталните ензими кај пациенти хомозиготи за AA полиморфизмот на SLC19A1 80 (1, 160). И во студијата на Киши, RFC генотипот бил асоциран со инфекции и гастроинтестинална токсичност, посебно пациентите носители на A алелот имале зголемена инциденца на гастроинтестинална токсичност (188)

Во студијата на Лопез и Јазбецне е најдена асоцијација на RFC 80G>A полиморфизмот со MTX токсичност (28, 30)

6.5.4 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ABCB1 ГЕНОТ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА MTX

ABCB1(МДР1) генот ја кодира синтезата на мембранскиот транспортер п-гликопротеин (п-гп) кој има функција како ефлуксен транспортер во различни ткива и може да влијае на фармакокинетиката на повеќе хемотерапевтици. Исто така п-гп претставува фармакокинетска бариера која служи како одбрамбен механизам против ксенобиотиците. Генските полиморфизми во ABCB1(МДР1) генот може да ја променат

експресијата или функцијата на п-гликопротеинот. Изразена експресија на п-гликопротеинот во туморските клетки може да доведе до резистенција кон лекови, а бројни антилеукемични агенси (пр. МТХ, гликокортикостероиди, антрациклини, винкристин) кои претставуваат субстрат на п-гп. Присуството на Т алелот е сигнификантно асоцирано со зголемен ризик за карцином на бели дробови и Кронова болест. (СНПедија)

Мал е бројот на студии кои го истражуваат клиничкото влијание на полиморфизмите на АБЦБ1(МДР1) генот врз АЛЛ во детската возраст(71).

Во нашата студија АА полиморфизмот на генот за АБЦБ1(МДР1) беше асоциран со неутропенија [OR (95%CI) 2,667 (0,16 - 45,14), RR (95%CI) 1,556 (0,48 - 5,02) p=0,490], ТТ генотипот со орален мукозит [OR (95%CI) 2,133 (0,33 - 13,81) RR (95%CI) 1,436 (0,55 - 3,74) p=0,423] и инфекции [OR (95%CI) 2,500 (0,35 - 18,04), RR (95%CI) 1,346 (0,66 - 2,73) p=0,357], без статистичка сигнификантност. При статистичка обработка на пациентите носители на А алелот е утврдена статистички сигнификантна корелација со орален мукозит [OR (95%CI) 3,214 (1,04 - 9,95), p= 0,038], како и намален ризик за анемија кај GA генотипот p=0.009 OR(н.п.)

Во студијата на Грегерс (71) полиморфизмите на АБЦБ1(МДР1) генот сигнификантно го зголемуваат ризикот за МТХ токсичност, посебно 3435C>T полиморфизмот.

Во студијата на Лопез (30) не е најдена асоцијација на АБЦБ1(МДР1) полиморфизмот со МТХ токсичност

Заи, анализирајќи ги СНП на генот за АБЦБ1(МДР1) покажал дека G/G, G/A или A/A генотиповите имаат сигнификантно поголем ризик за некаков настан отколку G/T, T/T или T/A генотиповите (p = 0.025) (189).

До сега објавените резултати од студиите посветени на истражувањето на полиморфизмите на АБЦБ1(МДР1) генот (поголем дел од нив се фокусирани на С3435Т полиморфизмот), покажуваат контрадикторни резултати како во поглед на истражувањата работени ин витро, така и во однос на експресијата на п-гп и диспозицијата на испитуваните лекови ин vivo. Се смета дека заради големината на АБЦБ1(МДР1) генот, генотипизацијата базирана на анализа на еден СНП не е доволна да се предвидат функционалните последици. Силен "linkage disequilibrium" е

детектиран меѓу неколку АБЦБ1(МДР1) полиморфизми и дискрепанцата меѓу податоците во литературата може да се должи на нивното фокусирање на еден полиморфизам, наместо на поврзаните нуклеотидни варијанти. Мултипните СНП кои се наоѓаат на ист хромозом припаѓаат на специфичен хаплотип и некои автори се обиделе да ја детерминираат улогата на АБЦБ1(МДР1) хаплотиповите во варијабилната експресија на п-гп. Можеби со посебни молекуларни техники би требало да се одредат хаплотипови кај индивидуи со високо полиморфни и големи гени како што е АБЦБ1(МДР1) генот. Идентификацијата на хаплотиповите би можело да биде од големо значење за идентификација на влијанието на АБЦБ1(МДР1) полиморфизмите врз ризикот за одредена болест или дистрибуцијата на лекови. Во досегашните истражувања регистрирана е значајна разлика во фреквенцијата на АБЦБ1(МДР1) хаплотиповите меѓу белото население, Афроамериканците и Азијатите, а идентифицирани се и хаплотипови кои се специфични за одредена етничка популација (190).

6.5.5 АСОЦИЈАЦИЈА НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНОТ ЗА МЕТИОНИН СИНТЕТАЗАТА И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД ВИСОКИТЕ ДОЗИ НА МТХ

Метионин синтезата (МС) е ензим кој ја катализира реметилацијата на хомоцистеин во метионин и претставува аминокиселина прекурзор на САМ (с - аденозил метионин). САМ претставува универзален донор на метил група прекурзорите на креатинин, фосфатидилхолин, епинефрин, мелатонин и е неопходен за метилација на ДНК (191).

Активност на МС зависи од достапните количини на витамин Б12 и во нормални услови овозможува ослободување на тетрахидрофолат неопходен за реметилација во 5,10 метилен тетрахидрофолат и синтеза на нуклеотиди. Према некои автори 2756 полиморфизмот на генот за МС може да ја промени активноста на ензимот и полиморфната G варијанта може да го појача внесот на метил групи неопходни за метилација на ДНК. На тој начин присуството на овој полиморфизам би можел да влијае на ризикот за појава на АЛЛ, бидејќи процесите на хиперметилација се важни за настанокот на акутни леукемии. Во проспективна студија која ги иследувала компликациите во текот на бременоста, присуството на MS2756 G-алел бил асоциран со утероплацентална инсуфициенција, што сугерира дека овој полиморфизам игра улога во нормалниот развој на фетусот. Овој податок заедно со сознанието за

настанокот на леукемии ин утеро, дополнително ја подржува улогата на *MSA2756G* полиморфизмот во етиологијата на леукемиите (139,192)

Мал број студии се посветени на истражување на асоцијацијата на *MSA2756G* полиморфизмот и токсичните ефекти од високите дози на MTX.

Во нашата студија орален мукозит беше асоциран со **AG+GG** полиморфизмот на *MS 2756*, [OR(95%CI)2,113 (0,75 - 5,94),RR (95%CI) 1,614 (0,83 - 3,13) $p=0,153$]. Полиморфизмот **MS2756 AG** беше асоциран со кожна токсичност[OR (95%CI)2,833 (0,48 - 16,73),RR (95%CI) 2,571 (0,51 - 13,05) $p=0,709$], интестинален мукозит [OR (95%CI)2,040 (0,32 - 13,13), RR (95%CI) 1,929 (0,35 - 10,77) $p=0,709$] без статистичка сигнификантност . Статистички сигнификантно **MS2756 AG** полиморфизмот беше асоциран со тромбоцитопенија [OR (95%CI) 1,658 (0,54 - 5,06), RR (95%CI) 1,446 (0,64 - 3,27), $p=0,025$]

Во студиите на Хуанг (72) и Котник (29) не е обсервирана сигнификантна корелација меѓу *MS 2756A>G* полиморфизмот и MTX токсичноста.

Метионинот е неопходен за миелинизацијата на ЦНС. Во студијата на Линебанк спроведена на 42 пациенти со примарен ЦНС лимфом третирани со MTX, присуството на полиморфизми на генот за MC бил асоциран со зголемен ризик неуротоксичност (193). Во подоцнежна студија на истиот автор, неуротоксичноста при третман со високи дози на MTX била асоцирана со присуството на барем еден од генотиповите – *MTNFR677TT*, *MS2756 AG/GG* или транскобаламин 2 (транспортен протеин на B12, кофакторот на MC) (194).

6.6 АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО РИЗИКОТ ЗА РЕЛАПС ИЛИ ЛЕТАЛЕН ИСХОД КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО АЛЛ

Со постоечките хемотераписки режими се постигна висока стапка на ЕФС(75-80%, во некои случаи и до 90%) кај пациентите со АЛЛ. Сепак, сè уште е чест релапсот на АЛЛ кој достигнува инциденца приближна со релапсот кај неуробластомите (2).

Голем број студии се посветени на детерминација на можни прогностички фактори кои би го предвиделе потенцијалниот ризик за резистенција на предвидената терапијата и релапс на болеста и на тој начин би се модифицирале тераписките режими кај овие пациенти. Релативно малку се знае за природата на рецидивот, но во повеќето случаи

повторната појава на леукемични клетки се должи на нивната резистенција кон хемотерапевтиците кои пациентот ги примал или сè уште ги прима. Поновите студии покажуваат дека најчесто се работи за мултипна резистенција кон повеќе лекови, вклучувајќи и лекови кои пациентот не ги примал. Понатаму редицидивот може да се должи на т.н. заробени малигни клетки во фармаколошки достапни места (пр. екстрамедуларен рецидив во ЦНС, тестиси и сл.) (195, 196).

Актуелни се истражувањата за поврзаноста на генски полиморфизми, посебно полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам, со промените во фармакокинетиката и фармакодинамиката на антилеукемичните агенсии кои се применуваат во третманот на АЛЛ, можната резистенција на предвидената терапијата и ризикот за релапс на болеста.

Според Фукушима полиморфизмот 1298AA на генот за МТХФР е асоциран со зголемен ризик за релапс и лош исход кај пациентите со АЛЛ. Во неговата студија ниеден пациент со АС/СС генотип немал релапс или летален исход, за разлика од АА генотипот ($p=0,004$). Сите деца кои имале релапс или егзистирале биле носители на овој генотип. Тој смета дека како последица на намалена активност на ензимот, докажана ин витро, намалена е конверзијата на 5,10-метилтен тетрахидрофолат во 5 – метил ТХФ, со што е присутно поголемо количество на субстрат за ТС што води кон поголема синтеза на ДНК и помала сензитивност кон МТХ која е веќе докажана во студии ин vivo (197). Исто така и во студијата на Деус пациентите носители на А алелот имале полоша прогноза на болеста. Имено, носителите на 1298СС имале подолготрајно пет годишно преживување без настан кое изнесувало 93%, додека за АС генотипот изнесувало 80%, а за АА генотипот-80%. Преживувањето на пациентите носители на А алелот изнесувало 68%, додека за носителите на С алелот изнесувало 74% (198).

За разлика од овие студии, во студија спроведена од страна на Радке (179) на 499 деца со АЛЛ третирани според протоколот БФМ 2000 утврдена е асоцијација на МТНFR A1298C полиморфизмот со минимална резидуална болест (МРД) и ЕФС. Пациентите носители на 1298СС генотипот имале поголем ризик за релапс во однос на носителите на АА генотипот (OR 3,1 95%CI 1,2-7,7 $p=0,015$). Сепак тие сметаат дека улогата на оваа варијанта е мала и може да зависи од типот на протокол кој се применува. Заради тоа асоцијацијата меѓу A1298C и ЕФС е можеби специфична само за АЛЛ БФМ 2000

протоколот. Во студијата не е најдена асоцијација меѓу останатите полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам и ЕФС, но сметаат дека нивните резултати би помогнале во оптимизирање на МТХ режимот и во индивидуализирање на терапијата кај пациентите со АЛЛ врз база на генетски маркери.

Пациентите со *MTHFR* 1298AC варијантата во студијата на де Јонге покажале намалена сензитивност на МТХ ин витро, што може да биде причини за лош одговор на терапијата кај носителите на овој полиморфизам и помала инциденца на токсични ефекти (199).

Од друга страна Тантави (162) во својата студија не утврдил сигнификантна поврзаност меѓу А1298С полиморфизмот и ризикот за релапс кај пациентите со АЛЛ

Во студијата на Јацек која опфатила 389 деца со АЛЛ, при анализата на генотипот на 31 пациент со АЛЛ кои завршиле летално, регистрирана е силна асоцијација со 677ТТ полиморфизмот на *MTHFR* генот. Скоро 26% (8 од вкупно 31 егзигиран пациент) биле ТТ хомозиготи, додека овој генотип бил присутен само кај 8%(28 од 358) од преживеаните пациенти со АЛЛ. Обсервираната разлика била статистички високо сигнификантна (OR: 4.09, 95% CI: 1.67–10; P = 0.004)

Иако добиените резултати укажуваат на значењето на С677С>Т полиморфизмот на МТХФР генот, основниот патофизиолошки механизам е сè уште непознат. Се претпоставува дека намалената активност на ензимот кај варијантниот генотип 677ТТ предизвикува умерена хомоцистинемија која се потенцира со дополнителната инхибиција од дејството на МТХ. Во такви услови може да настане оштетување на крвните садови, зголемен ризик за сериозни инфекции, кои ако не се контролираат, може да доведат до мултиорганско оштетување и до летален исход. Од друга страна бидејќи МТХФР ензимот е значаен за регулација на процесите на метилација, неговата намалена активност може да ја поремети метилацијата на ДНК и како последица на тоа да ја зголеми експресијата на некои гени кои имаат значајна улога во метаболичките процеси. Изменетата експресија на овие гени може да ја наруши хомеостазата во организмот и како краен резултат да доведе до зголемување на смртноста кај овие пациенти (154).

Во нашата студија за анализа беше достапна ДНА од само 5 деца со релапс на болеста. Едно од нив заврши со летален исход заради резистентност на леукемијата на сите

применети протоколи, а другите две егзистираа во тек на третман на релапсот, како последица на тешки инфекции (двете деца беа хомозиготи за варијантниот ТТ генотип на *MTHFR* C677T полиморфизам). Од двете преживеани деца едното е во комплетна континуирана ремисија по третман на релапсот веќе 5 години, додека кај второто дете е направена трансплантација на коскена срцевина и сè уште е под имуносупресивна терапија. Со оглед на малиот број на пациенти со релапс не би можеле да изведеме заклучоци за асоцираноста на полиморфизмите на гените вклучени во метаболизмот на фолати и ризикот за релапс или летален исход.

Во систематскиот преглед на Рохит (200), во 6 студии кои се состоеле од 909 педијатриски пациенти со АЛЛ релативниот ризик за летален исход варираше во зависност од генотипот и од студиската популација и се движел од $RR=0,84$ (95% confidence limits [CL]: 0.24,) за ТТ vs. СТ/СС, до $RR = 7.0$ (95% CL: 0.98, 49) за ТТ vs. СС. Овие податоци укажуваат дека пациентите кои имаат барем еден Т алел може да имаат зголемен ризик за летален исход, кој е статистички посигнификантен кај пациентите хомозиготи за овој алел (ТТ). Неопходни се дополнителни истражувања кои би ја потврдиле важноста на *MTHFR* 677 генотипизацијата при дијагностицирање на АЛЛ во индивидуализирање на терапијата и понатамошна редукција на морталитетот кај педијатриската АЛЛ. Во нашата студија две од децата со релапс и летален исход во тек на третманот на релапсот како последица на сериозна инфекција, беа хомозиготи за ТТ генотипот на *MTHFR* C677T полиморфизмот.

Во студијата на Алпленк (92) пациентите со *MTHFR* 677ТТ генотипот имале зголемен ризик за релапс ($\chi^2=4.38$, $p=0.036$). Каплан Маеровата анализа базирана на стратификација според присуството на одреден алел покажала сигнификантно зголемен ризик за релапс кај пациентите носители на варијантниот Т алел (78.99% versus 69.94, $P = 0.0486$). Пресметано според генотипот преживување без релапс - РФС (англ. Relaps free survival или преживување без релапс) кај хомозиготите за див тип (СС) изнесувало 78,9% РФС, хетерозиготните пациенти (СТ) имале 71,1% РФС, а хомозиготите за варијантниот алел (ТТ) имале РФС од 66,6% десет години по поставување на дијагнозата. Споредбата на РФС меѓу хомозиготниот див тип СС и варијантниот тип ТТ била статистички сигнификантна со лог ранк тестот ($p=0.0477$).

Мултиваријантната анализа во студијата на Алпленк, покажала дека присуството на *MTHFR*C677T варијантниот алел е поголем предиктор за релапс отколку МЗ коскена

срцевина на седмиот ден од терапијата, иницијалниот број на леукоцити и режимот на терапија. Од клиничка гледна точка, разликата од 12% во десет годишниот РФС меѓу пациентите хомозиготи за дивниот алел и пациентите хомозиготи за варијантниот алел претставува клинички значајна разлика (92).

Во студијата на Тантави 677ТТ генотипот бил сигнификантно асоциран со релапс во првите пет години по дијагнозата, тој изнесувал 56,3% за ТТ, 18,2%СТ и 0%СС алелите. Пет годишното преживување било многу пониско кај пациентите хомозиготи за варијантниот алел 50% во споредба со хомозиготите за СС алелот 92,3%($p=0,001$) (162).

Тројната репетиција во тандем на TSER се карактеризира со зголемена експресија и активност на тимидилат синтетазата која е една од главните цели на делувањето на MTX-от (201). За инхибиција на зголемената активност на тимидилат синтетазата и за постигнување на цитотоксичен ефект, неопходни се повисоки концентрации на MTX и на неговите метаболити (202, 203).

Во студијата на Крајиновиќ е испитувана можната асоцијација на двојната и тројната репетиција во тандем на TSER и исходот од третманот кај 205 деца со АЛЛ третирани со MTX. Пациентите кои биле хомозиготи за тројната репликација во тандем (TS ER 3R/3R) имале поголем ризик за релапс од останатите генотипови (odds ratio 4,1, 95% CI: 1,9–9,0, $p=0,001$), додека немало разлика во однос за ризикот за релапс меѓу пациентите хетерозиготи (2R/3R) и хомозиготи (2R/2R) за двојната односно тројната репетиција во тандем. Заклучокот на авторот е дека генотипизација на пациентите за полиморфизмите на тимидилат синтетазата би можеле да користат за индивидуализација на третманот кај пациентите со АЛЛ (204). Спротивно од ова во нашата студија ниедно од децата со релапс на АЛЛ не беа хомозиготи за TSER 3R/3R.

За разлика од Крајиновиќ, Мелчиор во студија која опфатила 40 пациенти со АЛЛ со релапс и 40 пациенти со добар исход третирани по АЛЛ БФМ 86 и 90 протокол утврдиле дека ризикот за релапс не е поврзан со TSER 3R/3R полиморфизмот, ниту пак со 2R/3R или 2R/2R. Авторите сметаат дека оваа разлика во резултатите се должи на тоа што во студијата на Крајиновиќ е применета помала доза на MTX $4g/m^2$, додека во германската студија биле аплицирани $5g/m^2$ MTX, доза која можеби го надминала влијанието на овие полиморфизми врз ефикасноста на MTX (205).

Во студијата на Грегерс (103) при анализа на ефектот на RFC1 80 A>G полиморфизмот (SLC19A1 80) врз исходот на пациентите со АЛЛ, кај носителите на RFC1 AA генотипот ($p=0,046$), регистриран е за 50% помал ризик за релапс, летален исход или секундарна малигна болест споредено со пациентите носители на другите генотипови GG or GA . Наспроти ова во нашата студија три деца беа хомозиготи за RFC1 AA генотипот.

Генот за РФЦ1 е лоциран на 21-от хромозом и пациентите со хипердиплоидија која најчесто го опфаќа овој хромозом имаат подобра прогноза (206). Забележано е дека пациентите со хипердиплоидија , посебно кога е опфатен 21-виот хромозом како кај децата со Даунов синдром, имаат зголемен ризик за манифестирање на токсични ефекти при терапијата со МТХ. Исто така пациентите со хипердиплоидна Б АЛЛ (90% од нив имаат 3 или 4 копии на хромозом 21) имаат ниска стапка на релапс и имаат повисоки нивоа на МТХ полиглутамативно споредба со пациентите кои немаат хипердиплоидија. (207). Овие сознанија укажуваат на појачан интрацелуларен транспорт на МТХ заради зголемена експресија на РФЦ генот кај пациенти со хипердиплоидија (208,209).

Заради тоа во студијата на Грегерс истражувана е асоцијацијата на RFC1 80 A>G варијантите и бројот на копии на 21-от хромозом при што е утврдено дека пациентите со RFC1 80AA генотипот кои имаат 2 копии на 21-от хромозом имаат за 64% намален ризик за релапс во споредба со пациентите со другите варијанти на RFC1 80 A>G кои исто така имаат две копии на 21-от хромозом, но исто така забележал подобар исход и кај хипердиплоидните носители на GA или GG. Веројатно зголемената експресија на RFC1 го подобрува инфлуксот на МТХ во клетката и на тој начин овозможува поголем ефект на МТХ –от врз малигните клетки (103). Исто така и во студијата на Аштон носителите на RFC 80A алелот имале 50% намален ризик за релапс или летален исход во споредба со носителите на G алелот (210).

Од друга страна во студијата на Лавердиер (187) пациентите хомо или хетерозиготи за RFC 80 A алелот имале сигнификантно понизок ЕФС споредено со носителите на RFC Галелот. Исто така и во студијата на Деус (198) пациентите со RFC 80AA генотипот имале полош исход на болеста.

Во студијата на Роша не е утврден зголемен ризик за релапс кај пациентите со RFC G80A генотипот (48).

Контроверзните резултати веројатно се должат на тоа што при генотипизацијата не е земена во предвид и улогата на хипердиплоидијата во зголемената експресијата на РФЦ рецепторот која доведува до подобрен транспорт на МТХ во клетката.

Полиморфизмот G2677A>T на АБЦБ1 генот не е асоциран со зголемен ризик за релапс и појава на токсични ефекти (71), додека според студијата на Јанг (211) присуството на полиморфизми на АБЦБ1 генот кај пациентите со АЛЛ е асоциран со лоша прогноза на болеста.

Во студијата на Заи спроведена на популација со АЛЛ од Тајван присуството на 2677GG, GA или AA генотипот бил асоциран со сигнификантно зголемен ризик за релапс на болеста и дури и почесто со летален исход во споредба со носителите на 2677 GT, TT или TA генотипот ($p=0,025$) (198). Во нашата студија G алелот на АБЦБ1 G2677A>T беше присутен кај четири пациенти со релапс на болеста.

6.7 АСОЦИЈАЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СО КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА МТХ

Благодарение на примената на високите дози на МТХ во терапијата на АЛЛ намален е бројот на релапси, посебно релапси во ЦНС и зголемен е процентот на преживување од оваа болест. И покрај бенефитот од неговата примена, сепак кај одреден дел од децата со АЛЛ може да предизвика сериозни, па дури и животни загрозувачки токсични ефекти кои се должат на неговото неселективно и неспецифично дејство.

Во тек на терапија на малигните заболувања, рутинско мониторирање на концентрацијата на лекови е мандаторно само при примена на високи дози на МТХ.

Ескалацијата на дозите на МТХ, со постигнување на висока концентрација во плазмата, е овозможена со достапноста на антидот на МТХ –от, леуковорин (калциум фолинат), кој ги надоместува интрацелуларните потреби за фолати, овозможува нормално функционирање на клетките и придонесува за редукција на токсичните ефекти од МТХ. Со години мониторирање на концентрацијата на МТХ се покажа како добра стратегија за индивидуализирање на терапијата со високи дози на МТХ (29, 219).

МТХ-от воглавно се екскретира непроменет со гломеруларна филтрација преку урината (90%) и со активна секреција преку реналните тубули. Само 1-11% од дозата на МТХ се екскретира како 7- хидрокси метаболит. Заради тоа во тек на примената на високи дози на МТХ важно е да се обезбеди добра диуреза и алкализација на урината

како би се превенирала преципитација на МТХ во бубрезите и појава на акутна бубрежна инсуфициенција. Особено треба да се внимава кај пациенти со намалена бубрежна функција и пациенти под терапија со антиинфламаторни лекови или нефротоксични агенси кои се под зголемен ризик за појава на токсични ефекти. Заради тоа мониторирање на концентрацијата на МТХ во плазмата е неопходна 24, 48 и евентуално 72 часа по завршување на неговата апликација за следење на елиминацијата на МТХ од организмот. Врз основа на измерените концентрации на МТХ во плазмата се дозира леуковоринот, како би се стопирало неговото понатамошно цитотоксично дејство. Во услови на присуство на несоодветно високи концентрации на МТХ во плазмата, вообичаените дози на леуковорин се недоволни, така да дозата на леуковорин мора да се зголеми пропорционално со концентрацијата на МТХ во плазмата. Рутинското мониторирање на МТХ во плазмата овозможува рана детекција на абнормален клиренс на МТХ како и превземање на соодветни мерки вклучувајќи и зголемена доза и пролонгирана апликација на леуковорин (213).

Голем број автори сметаат дека полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам може да влијаат врз фармакокинетиката на МТХ—от, односно врз концентрацијата на МТХ во плазмата која рутински се мери 24 часа по истекување на лекот.

Во нашата студија, децата со АЛЛ носители на дивите генотипови на полиморфизмите *MTHFR* C677T ($p=0,021$) и на *MTHFRA*1298C ($p=0,048$) беа поврзани со статистички сигнификантноповисоки концентрации на МТХ во плазмата, во однос на хетерозиготните индивидуи и хомозиготите за варијантниот тип на овие два полиморфизма.

Спротивно од нашата студија, во студијата на Ерчуљ(214) концентрацијата на МТХ непосредно по истекувањето на лекот била сигнификантно повисока кај пациенти носители набарем еден Т алел на *MTHFR* C677T полиморфизмот. Исто така во студијата на Иманишисигнификантно повисоки концентрации на МТХ биле регистрирани кај пациентите хомозиготи за *MTHFR*677TT генотипот ($p=0,028$) (1).

Во студијата на Котник бил регистриран за 26% намален клиренс на МТХ кај пациентите со *MTHFR*677TT, додека останатите испитувани полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам не покажале интериндивидуална варијабилност во клиренсот на МТХ (29).

Во студијата на Лавердиер пациентите носители на AA генотипот на RFC1 имале сигнификантно значајно повисоки концентрации на MTX во споредба со другите генотипови ($p=0,02$) (187), додека Иманиши не утврдил асоцијација меѓу концентрацијата на MTX и полиморфизмите на RFC1 генот (1).

Сутандирам во својата студија нотираше дека пациентите со MTHFR C677T и ABCB1 C3435T полиморфизми имаат сигнификантно повисоки концентрации на MTX во плазмата (215).

6.8 ВЗАЕМНОТО ВЛИЈАНИЕ НА ПОВЕЌЕ ГЕНИ ВКЛУЧЕНИ ВО ФОЛАТНИОТ МЕТАБОЛИЗАМ И ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ОД MTX

Во нашата студија беше утврдена зголемена инциденца на инфекции кај пациентите носители на хетерозиготниот и варијантниот генотип за MS2756 AG и MTHFR C677T, но без статистичка сигнификантност [OR (95% CI) 2,727 (0,92 - 8,07) RR (95% CI) 1,463 (0,93 - 2,31) $p=0,06$]

Не е најдена значајна поврзаност кај останатите шест полиморфни генотипови во меѓусебна комбинација со кој било од токсичните ефекти. Меѓусебното влијание на сите шест полиморфизми со било кој токсичен ефект е испитуван и со логистичка регресиска анализа, при што исто така не се најдени значајни асоцијации.

Во студијата на Ерчул не е утврдена асоцијација на MTXФР полиморфизмите и токсичните ефекти од високите дози на MTX, но опсервиран е значаен ефект на взаемната интеракција на MTHFR 677C > T, TSER 2R /3R и MTHFD1 1958G > A- MTHFR 677C > T врз токсичноста од MTX (169).

Пациентите со АЛЛ носители на MTHFR677T + 1298A хаплотипот или MTHFD1 1958A варијанта во интеракција со TS 3R, имале намалено преживување без настан (ЕФС) (199)

Во студијата на Рахими (135) пациентите со MS GG+TS 2R2R генотиповите имале 1,3 пати зголемен ризик за АЛЛ [OR 1.3, 95%CI 0.6-2.7, $P=0.5$] во споредба со MS AA and TSER 3R/3R генотиповите.

Во студијата на Петра не е регистрирана асоцијација на поединечните полиморфизми со ризикот за АЛЛ. Но, кога се анализирани комбинираниите MTHFR 677CT/TT и MS 2756AG/GG генотипови добиена е несигнификантна редукција од 2,2 пати за ризикот за АЛЛ (CI: 0.191 – 1.037, $P: 0.061$). Ризикот за АЛЛ бил сигнификантно намален кај

носителите на *MTHFR* 677CT/TT, *MS* 2756AG/GG and *MTRR* 66AG/GG генотиповите (OR: 0.312; CI: 0.107 – 0.907; *P*: 0.032). Добиените резултати сугерираат дека взаемната интеракција меѓу гените може да го намали капацитетот за метилација и на тој начин да влијае протективно врз ризикот за АЛЈ во детската возраст (216).

7 ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати беа донесени следните заклучоци:

1. Најчесто манифестирани токсични ефекти во тек и по завршување на терапијата со високи дози на МТХ беа хепатотоксичноста и депресијата на коскена срцевина манифестирана со редукција на хемоглобинот и неутрофилните леукоцити кај повеќе од 50% од пациентите, следи тромбоцитопенијата кај нешто повеќе од 25% од пациентите. Останатите токсични ефекти се манифестираа кај помалку од 10% од пациентите, но некои од нив беа со сериозни клинички импликации.
2. При анализа на степенот на изразеност на токсичниот ефект (1-4 степен), од вкупно регистрирани 189 епизоди на токсичност во тек на терапијата со МТХ, најзастапени беа токсичните епизоди од трет степен (43,3%) кои може да имаат значајно влијание врз третманот и исходот на болеста.
3. Тромбоцитопенијата (во пет циклуси на терапија со МТХ) беше најзастапен токсичен ефект од четврт степен, додека најчесто манифестиран токсичен ефект од трет степен беа неутропенијата (во 23 циклуси), следеа анемијата (во 17 циклуси) и хепатотоксичноста (во 12 циклуси).
4. Беа детерминирани генотиповите за шест специфични полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам – *MTHFR* (C677T и A1298C), *TSE* (2R/3R), *RFC1* (SLC19A1 A80G), *MS* (2756 A>G) и *ABCB1* (G2677T/A) и беа етаблирани методите за нивна генотипизација.
5. Во нашата популација, споредено со податоците од литературата, почесто е застапен варијантниот CC генотип на *MTHFR* A1298C полиморфизмот.
6. Застапеноста на останатите полиморфизмите во нашата популација беше во согласност со објавените податоци во литературата за застапеноста на овие полиморфизми во Европската популација.
7. *MTHFR* 1298AC генотипот има значаен импакт врз појавата на токсичноста во тек и по завршување на терапијата со високи дози на МТХ. Пациентите хетерозиготи за овој полиморфизам и пациентите носители барем на еденваријантен алел (C) имаа статистички сигнификантно пониска инциденца на хепатотоксичност и тромбоцитопенија, но имаа повисока инциденца на други токсични ефекти.

8. Присуството на *ABCB1* 2677 GA генотипот беше поврзано со намалена инциденца на анемија, додека носителите на варијантниот алел почесто манифестираа орален мукозит.
9. Пациентите носители на *TSER* 2R/3R, *TSER* 3R/3R генотипот и носителите на варијантниот 3R алел статистички сигнификантно почесто манифестираа тромбоцитопенија
10. Инциденцата на инфекции во тек и по завршување на терапијата со MTX бешеповисока кај пациентите носители на *MTHFR* 677 CT,*MTHFR* 677 TT, *MTHFR* 1298 ACи *ABCB1* 2677 TT генотипот, без статистичка сигнификантност.
11. Споредувајќи ги шесте полиморфизми на гените вклучени во фолатниот метаболизам меѓу студиската и контролната група, беше регистрирана статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на MS2756 AG, SLC19A1 80 AG , SLC19A1 80 GG, како и на *ABCB1* GT полиморфизмот кај студиската популација во однос на контролната група. Оваа разлика укажува на зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овие генотипови. Разликата во дистрибуцијата на TS 2R/3R укажува на протективен ефект на овој полиморфизам.
12. При споредба на дистрибуцијата на испитуваните алели меѓу студиската и контролната група беше утврдена статистички сигнификантна разлика во присуството на G алелот на MS2756 и G алелот на SLC19A1 80 полиморфизмот кај студиската во однос на контролната популација, што исто така укажува на зголемен ризик за АЛЛ кај носителите на овие алели.
13. Малиот број на пациенти со релапс или егзитус (7,69%), ја ограничија статистичката употребливост на анализите на поврзаноста на генотиповите со ризикот за релапс или летален исход.
14. Носителите на дивите генотипови на полиморфизмите *MTHFR* 677 и на *MTHFR* 1298 се поврзани со статистички сигнификантно повисоки концентрации на MTX по завршувањето на терапијата, во однос на хетерозиготите и хомозиготите за варијантниот генотип на овие два полиморфизми.
15. Взаемното влијание на повеќе гени вклучени во фолатниот метаболизам и токсичните ефекти од хемотерапијата беше утврдена само кај носителите на хетерозигототниот и варијантниот генотип за MS2756 AG+ *MTHFR* 677T кои имаа зголемена инциденца на инфекции, но без статистичка сигнификантност.

16. Не е регистрирана значајна поврзаност кај останатите шест полиморфни генотипови во меѓусебна комбинација со кој било од токсичните ефекти.
17. Генотипизацијата на полиморфизмите на гените вклучени во фолатниот метаболизам сметаме дека се корисни маркери за предвидување на токсичните ефекти од хемотерапијата со високи дози на МТХ и понатамошно индивидуализирање на терапијата на детската АЛЛ. Овие молекуларни анализи би требало да се воведат во редовните дијагностички процедури на децата со АЛЛ пред започнување на хемотерапијата.
18. Потребни се понатамошни иследувања, на поголема група пациенти, посебно пациенти со поволна прогноза на АЛЛ. Сметаме дека детектирањето на специфични генски полиморфизми кај овие пациенти би овозможило селектирање на пациенти со зголемен ризик занесакани настани или летален исход во тек на ремисија на болеста како последица на токсичноста од хемотерапијата со високи дози на МТХ.
19. Неопходни се понатамошни студии кои би ја истражувале интеракцијата меѓу фармакогенетските полиморфизми и ризикот за неуспех на хемотерапијата како би се детерминирало дали прилагодување на дозата согласно со генотипот би овозможила зголемена ефикасност на антилеукемискиот третман, намалена токсичност на хемотерапијата и минимален ризик за релапс на болеста .

8 РЕФЕРЕНЦИ:

1. Hiroyuki I, Noboru O, Yagi M. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *Journal of Human Genetics*. 2007; 52:(2):166-171
2. Ching – Hon Pui, *Childhood Leukemias* chapter 1,2,12,14,15,16,17,29,30,31,32,33, first edition, 2006, Cambridge University Press, New York
3. Schrappe M, Pieters R. Acute lymphoblastic leukemia. Vo: Pinkerton R, Plowman P, Pieters R, Ed. *Pediatric oncology*, Arnold, 2004, 230-254.
4. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M et al. Risk - adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008; 111 (9): 4477-89.
5. INCIDENCE OF CHILDHOOD LEUKAEMIA FACT SHEET 4.1 z December 2009 z CODE: RPG4_Rad_E1 www.euro.who.int/ENHIS
6. Dipl. Biol. Maria Yiallourous. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) - Brief Information, Author: , erstellt am: 2010/02/04, Editor: Maria Yiallourous, Reviewer: Prof. Dr. med. Günter Henze, Gesche Tallen, MD, PhD, English Translation: Hannah McRae, Last modification: 2015/07/22 doi:10.1591/poh.patinfo.all.kurz , Kurz-URL: www.kinderkrebsinfo.de/ALL-kurzinformation
7. Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:539. doi:10.3332/ecancer.2015.539.
8. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012;196(3):59–67. doi: 10.1016/j.cbi.2012.01.007.

9. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*.1999;35(14):1941–53. doi: 10.1016/S0959-8049(99)00296-8
10. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev*. 2005;81(1):123–9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2004.10.004.
- 11.Chokkalingam AP, Buffler PA. Genetic susceptibility to childhood leukaemia. *Radiation protection dosimetry*. 2008;132(2):119–29. doi: 10.1093/rpd/ncn255.
12. Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:539. doi:10.3332/ecancer.2015.539.
13. Kinlen LJ. Epidemiologic evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 1995;71:1–5.
14. Greaves MF, Alexander FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia*. 1993;7(3):349–360
- 15.Westerbeek RM, Blair V, Eden OB et al. Seasonal variations in the onset of childhood leukaemia and lymphoma. *Br J Cancer*. 1998; 78(1):119-24.
16. Martin Schrappe, Martin Stanulla. Current Treatment Approaches in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *SIOP EDUCATION BOOK 2010 International Society of Paediatric Oncology*, First published 2010; p 25-39
- 17.Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 ;33(4):451-8.
18. Jelena Roganović.Akutna limfoblastična leukemija u djece. *Medicina fluminensis*. 2011; 47(4):343-352
19. Weir EG, Ali Ansari-Lari M, Batista DA et al. Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome. *Leukemia*. 2007;21(11):2264-70.
20. Pieters R, Carroll W. Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):1-18

21. Pui C, Evans W. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354:166-178
22. BFM study group. Treatment protocol ALL-BFM 95 for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia, a cooperative multicenter trial of the German society for paediatric haematology and oncology, updated English version of the original protocol, November, 10, 1997
23. Poplack D. Acute lymphoblastic leukemia. Vo: Pizzo P, Poplack D, Ed. Principles and practice of Pediatric oncology, Lippincot, 1993: 431-483.
24. Humphrey P, Rang, Maureen M, Dale, James M, Ritter, Phillip K, Moore. Šta je farmakologija?, Ćelijski mehanizmi: Ćelijska proliferacija i apoptoza. Vo: Farmakologija, prvo srpsko izdanje, Data status, 2005: 2-7 i 69-80.
25. Howard C, Ribeiro R., Acute complications Vo: Pui CH, Ed. Childhood Leukemias, chapter 29, first edition, Cambridge University Press, New York, 2006: 709-750
26. Pui CH, Campana D, Pei D. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Prophylactic Cranial Irradiation. *N Engl J Med*. 2009 Jun 25; 360(26): 2730–2741.
27. Levitt L and Lin R. Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *West J Med*. 1996 Feb; 164(2): 143–155.
28. Jazbec J. Association of genetic polymorphisms on toxicity, survival and development of second neoplasms in childhood leukemia 23-26 Ekim 2013; Antalya, XXXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi
29. Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P et al. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011; 67:993–1006.
30. 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; 13(6): 498-506.

31. Prof. Dr. med. Martin Schrappe, Dr. med. Anja Möricke, erstellt 2003/07/22, Last modification: 2013/06/03. **ALL-BFM-Studie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie**, <http://www.uni-kiel.de/all-studie/>
32. Farber S, Diamond L, Mercer R, Sylvester R, Wolff J. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med* 1948; 238:787-793.
33. John H. Kersey. Fifty Years of Studies of the Biology and Therapy of Childhood Leukemia. *BLOOD* 1997;90(11):4243 -51.
34. Schrappe M, Reiter A, Zimmerman M et al.: Long term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by ALL-BFM study group from 1981-1995, *Leukemia* 2000;14 (12):2205-22.
35. Mikkelsen T , Thorn C, Yang J. et al. PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(10): 679–686.
36. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(2):117-29.
37. Cheok M, Pottier N, Kager L and Evans W. Pharmacogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*. 2009 ; 46(1): 39–51.
38. Shimasaki N, Mori T, Samejima H et al. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(2):64-8
39. Evans, W. E., Crews, K. R. and Pui, C.-H. (2013), A Health-Care System Perspective on Implementing Genomic Medicine: Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia as a Paradigm. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94: 224–229.
doi: 10.1038/clpt.2013.9
40. Sita Naik. Towards personalized medicine - the role of methotrexate. *Indian Journal of medical research* 2011;133(3): 253-55

41. Bailey L. and Gregory J. Folate Metabolism and Requirements. *J. Nutr.* 1999;129: (4)779-782
42. De Jonge R, Tissing W, Hooijberg JH et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *BLOOD* 2009;113 (10): 2284-2289
43. Csordas K, Lautner-Csorba O, Semsei A, et al. 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 *Br J Haematology* 2014;166 (3): 410–420.
44. Zappacosta B, Romano L, Persichilli S. et al. Genotype Prevalence and Allele Frequencies of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and A1298C Polymorphisms in Italian Newborns. *LABMEDICINE* 2009;40 (12):732-36
45. Kang SS, Wong PW. Genetic and nongenetic factors for moderate hyperhomocystinemia. *Atherosclerosis.* 1996 ;119(2):135-8.
46. Ulrich C, Bigler J, Velicer C, Greene E, Farin F, and Potter J. Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery and Confirmation of a Common Polymorphism in the Thymidylate Synthase Gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1381–85.
47. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.* 1995;20(3):191-7.
48. Rocha JC, Cheng C, Liu W et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 105(12): 4752–4758.
49. Nazki F.H., Masood A., Banday M.A., Bhat A. and Ganai B.A. Thymidylate synthase enhancer region polymorphism not related to susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in the Kashmir population *Genet. Mol. Res.* 2012; 11 (2): 906-917
50. Goldman, I. D., and Matherly, L. H. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther.* 1985; 28: 77–102,.
51. Sirotnak, F. M. and Tolner, B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu. Rev. Nutr.* 1999; 19: 91–122.

52. Jansen G. Receptor-and Carrier-Mediated Transport Systems for Folates and Antifolates: Exploitation for Folate Chemotherapy and Immunotherapy. In: Jackman AL, editor. Anticancer Development Guide: Antifolate Drugs in Cancer Therapy. Humana Press Inc.; Totowa, NJ: 1999. pp. 293–321.
53. Mason J. B., Levesque T. Folate: effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology* 1996;10: 1727-36.
54. Butterworth C. E., Bendich A. Folic acid and the prevention of birth defects. *Annu. Rev. Nutr.* 1996; 16: 73-97.
55. Refsum H., Ueland P. M., Nygard O., Vollset S. E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann. Rev. Med.* 1998; 49: 31-62 .
56. Whetstine JR, Gifford AJ, Witt T et al. Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. *Clin Cancer Res.* 2001;7(11):3416-22.
57. Niedzielska E, Węclawek-Tompoll J, Matkowska-Kocjan A, Chybicka A. The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(4): 579–584
58. Wah Yee S, Gong L, Badagnani I et al. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary . *Pharmacogenet Genomics.* 2010; 20(11): 708–715
59. Ma J, Stampfer M, Christensen B et al. A Polymorphism of the Methionine Synthase Gene: Association with Plasma Folate, Vitamin B12, Homocyst(e)ine, and Colorectal Cancer Risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 825–829
60. Habib EE, Aziz M, Kotb M. Genetic polymorphism of folate and methionine metabolizing enzymes and their susceptibility to malignant lymphoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2005;17(3):184-92.
61. Ruma V. Banerjee and Rowena G. Matthews, Cobalamin dependant methionin syntase , *The Faseb journal* 1990;4:1450-59.

62. Sharp L. and Little J. Am. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *J. Epidemiol.* 2004; 159 (5):423-443.
63. Jamroziak K, Młynarski W, Balcerczak E. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol.* 2004;72(5):314-21.
64. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1295–1310.
65. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ et al. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci* 2006; 95: 2293–2308.
66. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137–1143
67. Clin Kim RB, Leake BF, Choo EF et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Pharmacol Ther.* 2001;70(2):189-99.
68. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(10):693-704.
69. Aniel Jessica Leticia Brambila-Tapia. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. *Revista de Investigación Clínica i es* 2013;65(5): 445-454
70. Ágnes Félné Semsei. The role of genetic polymorphism of transporter proteins in acute lymphoblastic leukemia and other diseases; pharmacogenetic studies Ph.D thesis, Semmelweis University, Molecular Medicine PhD School, 2008
71. 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;15(4):372-9. doi: 10.1038/tpj.2014.81. Epub 2015 Jan 13

72. L Huang, W J E Tissing, R de Jonge, B D van Zelst and R Pieters. Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1798–1800.
73. Erdilyi D J , Kámory E, Csókay B et al Synergistic interaction of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms predicts the prevalence of toxic encephalopathy during anticancer chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2008; 8: 321–327; doi:10.1038/sj.tpj.6500480
74. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajinovic M. Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91(8):1113-6.
75. Rocha JC, Cheng C, Liu W et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005; 105(12): 4752–4758.
76. Sorich MJ, Pottier N, Pei D et al. In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS Med.* 2008;5(4):e83. doi: 10.1371/journal.pmed.0050083.
77. Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Asghari Estiar M et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Mutations in Women with Recurrent Spontaneous Abortions in the Northwest of Iran. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012; 2012:945486. doi: 10.5402/2012/945486.
78. Bagheri M, Rad IA, Omrani MD, Nanbakhsh F. C677T and A1298C Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Recurrent Abortion from the Iranian Azeri Turkish. *Int J Fert & Steril.* 2010; 4(3): 134-9.
79. Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer.* 2001; 85(6):827-30.
80. Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood.* 2001; 97(10):3205-9.

81. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet.* 2002; 108(1):1-6.
82. Kurzawski M, Pawlik A, Górnik W, Drożdżik M. Frequency of common MDR1 gene variants in a Polish population. *Pharmacol Rep.* 2006; 58(1):35-40.
83. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 2012; 28(19):2537-9.
84. Evans V, Relling M, Rodman J, Crom W, Boyett J and Pui CH. Conventional Compared with Individualized Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 1998; 338:499-505.
85. Relling MV, Fairclough D, Ayers D, Crom WR, Rodman JH, Pui CH, Evans WE. Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity. *J Clin Oncol.* 1994 Aug;12(8):1667-72.
86. Yafei W, Lijun P, Jinfeng W, Xiaoying Z. Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? *J Hum Genet.* 2012;57(12):780-6.
87. Binia A, Contreras A, Canizales-Quinteros S, Acuña Alonzo C, Elizabeth Tejero M, Silva-Zolezzi I. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr.* 2014; 9:421
88. Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;40:619–625
89. Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab.* 1999;68(4):461-7.
90. Nurit Rosenberg. The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans. *Am. J. Hum. Genet.* 70:758–762, 2002

91. Rosa-Maria Guéant-Rodriguez. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83 (3):701-707
92. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, Rebbeck T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2005;65(6):2482-7.
93. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat.* 2000;16(6):528.
94. Cornelia M. Ulrich. Bigler J, Bostick R, Fosdick L. Thymidylate Synthase Promoter Polymorphism, Interaction with Folate Intake, and Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Res.* 2002; 62: 3361-64.
95. Giovannetti E, Ugrasena D, Supriyadi E, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and Thymidylate Synthase Promoter (TSER) Polymorphisms in Indonesian Children with and without Leukemia. *Leuk Res.* 2008; 32:19-24
96. Zhou JY, Shi R, Yu HL, Zeng Y, Zheng WL and Ma WL. The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. *Int. J. Cancer* 2012;131: 2103–2116.
97. Lauten, M., Asgedom, G., Welte, K., Schrappe, M. & Stanulla, M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003; 88(3):353-4.
98. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825–9
99. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP et al. A polymorphism (80G-A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab.* 2000;70:310-315

100. Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, et al. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. *J Med Genet.* 2004;41:256-260
101. De Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005;106(2):717-20.
102. Yee SW, Gong L, Badagnani I, Giacomini KM, Klein TE, Altman RB. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenetics and genomics.* 2010;20(11):708-715.
103. Gregers J, Christensen IB, Dalhoff K, . The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* 2010; 115(23):4671-77
104. Jessica A, Brambila-Tapia L. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications . *Rev Invest Clin* 2013; 65 (5) 445-54.
105. Yang YL, Lin DT, Chang SK. Pharmacogenomic Variations in Treatment Protocols for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:206–211.
106. Kreile M, Rots D, Piekuse L et al. Lack of association between Polymorphisms in Genes MTHFR and MDR1 with Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (22): 9707-11.
107. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. MDR1 Gene Variants, Indoor Insecticide Exposure, and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1172-7.
108. Chang H., Rha S. Y., Jeung H.-C. et al. Association of the *ABCB1* gene polymorphisms 2677G>T/A and 3435C>T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2009; 20 (2): 272-277.
109. Naumovska Z, Nestorovska A, Sterjev Z, Filipce A, Dimovski A, Suturkova Lj. Genotype variability and haplotype profile of *ABCB1* (*MDR1*) gene polymorphisms in Macedonian population. *Prilozi* 2015; 35(3):121-134.
110. Salbaum JM, Kappen C . Genetic and epigenomic footprints of folate.

Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;108:129-58.

111. Kim YI . Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. J Nutr Biochem 1999;10:66-88.
112. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:3290-3295.
113. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. J Clin Oncol 2004;22:4632-4642
114. Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. J Nutr 2002;132 suppl:2444-2449.
115. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? BMJ 2004;328:211-214.
116. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda S et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. BLOOD 2004;103(1): 252-257.
117. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. Br Med Bull 1999;55:578–92.
118. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. J Nutr 2000;130:129–32
119. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. JAMA 1999;281: 1632–7.
120. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. Cancer Res 1997;57:1098–1102.
121. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. Cancer Res 1996;56:4862–4.

122. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13217–20. 8
123. Robien K and Ulrich C. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. *Am J Epidemiol* 2003;157:571–582
124. Chiusolo P, Reddicono G, Cimino G. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in the Italian population. *Haematologica* 2004; 89: 139–144.
125. Thirumaran, R.K., Gast, A., Flohr, T., Burwinkel, B., Bartram, C., Hemminki, K. & Kumar, R. MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106: 2590–2591
126. Zanrosso, C.W., Hatagima, A., Emerenciano, M et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res* 2006; 30: 477–481.
127. Oh D, Kim N.K., Jang M.J. et al. Association of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) polymorphisms in Korean patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 2007; 27: 3419–24.
128. Franco R. F., Simões B. P., Tone L. G., Gabellini S. M., Zago M. A. and Falcão R. P. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 115: 616–618.
129. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;148(1):3-14.
130. Yan J, Yin M, Dreyer ZE et al. A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58: 513–518.

131. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12810-12815.
132. Kim H.N., Kim Y.K., Lee I.K. et al. Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and hematological malignancies. *Leuk Res* 2009; 33: 82–87.
133. Skibola C, Smith M, Hubbard A et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99: (10)3786-91
134. Weng Y, Zhang J, Tang X, Xie X, Chen G. Thymidylate synthase polymorphisms and hematological cancer risk: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2012. Jul ;53(7):1345-51.
135. Rahimi Z, Ahmadian Z, Akramipour R et al. Thymidilate Synthase and Methionine Synthase Polymorphisms in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Western Iran. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2010; 9-12
136. Goldman, I. D., and Matherly, L. H. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther* 1985; 28: 77–102.
137. Sirotiak F. M., Tolner B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu. Rev. Nutr.* 1999;19: 91–122.
138. Koppen I. J. N., Hermans F. J. R. and Kaspers G. J. L., Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematology* 2010; 148: 3–14.
139. Lightfoot T, Johnston T, Painter D. Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. *Blood* 2010; 115(19):3923-29
140. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:787-794.

141. Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. Detection of P-glycoprotein in multidrug resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 1985; 316: 820-823,
142. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V. Amplification of P glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 1985;316:817-19.
143. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:1172–1177.
144. Breier A, Barancik M, Sulova Z, Uhrík B. P-glycoprotein—implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5:457–68.
145. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525–8.
146. Jamrozik K, Młynarski W, Balcerczak E et al. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol.* 2004; 72(5):314-21.
147. Zhang H, Zhang Z , Li G. ABCB1 polymorphism and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(5):7585-7591
148. Yan Y, Liang H, Xie L et al. Association of MDR1 G2677T polymorphism and leukemia risk: evidence from a meta-analysis. *Tumor Biol.* 2014; 35:2191–2197
149. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematology* 2009; 146: 489–503.
150. Gauri K, Rupal S, Sarfraz A.: Experience with high dose methotrexate therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia in a tertiary care centre of a developing country, *Pediatr blood and cancer* 2012; 59: 448-453
151. Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT. Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia, *Anticancer drugs* 2013;24(2): 189-197

152. Vagace J. M., Caceres-Marzal C., Jimenez M., Casado M. S., de Murillo S. G. and Gervasini G. Methotrexate-induced subacute neurotoxicity in a child with acute lymphoblastic leukemia carrying genetic polymorphisms related to folate homeostasis. *Am. J. Hematol.* 2011; 86: 98–101.
153. van Hasselt J, Eijkelenburg N, Huitema A, Schellens J, Schouten-van Meeteren A. Severe skin toxicity in pediatric patient treated with voriconazole and concomitant methotrexate. *Antimicrob agents chemother* 2013; 57(6): 2878-81.
154. Pietrzyk J, Bik-Multanowski M., Balwierz W et al. Additional genetic risk factor for death in children with acute lymphoblastic leukemia: A common polymorphism of the MTHFR gene. *Pediatr. Blood Cancer* 2009; 52: 364–368.
155. Farrow G. R., Buchanan R. J, Zwiener R, et al. Serum aminotransferase elevation during and following treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15(4):1560-1566
156. M. Fried, J. Kalra, C. F. Ilardi, et al. Hepatocellular carcinoma in a long-term survivor of acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987;60 (10): 2548-52
157. Spyridopoulou KP, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(2):117-33
158. Zhu XJ, He XL, Wu YP et al. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 2015; 17(1):11-14.
159. Chiusolo P, Giammarco S, Bellesi S et al. The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;69(3):691-6.
160. Shimasaki N, Mori T, Torii C, et al. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(5):347-352.

161. El-Khodary NM, El-Haggar SM, Eid MA, Ebeid EN. Study of the pharmacokinetic and pharmacogenetic contribution to the toxicity of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol.* 2012; 29(3):2053-62.
162. Tantawy AA, El-Bostany EA, Adly AA, Abou El Asrar M, El-Ghouroury EA, Abdulghaffar EE. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010;21(1):28-34.
163. Salazar J, Altés A, Del Río E, et al. Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenomics J.* 2012; 12: 379–385.
164. D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, et al. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(5):1339-1346.
165. Liu SG, Li ZG, Cui L, Gao C, Li WJ, Zhao XX. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on toxicities during consolidation therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(6):1030-40.
166. Sepe DM, McWilliams T, Chen J, et al. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(5):695-700.
167. Aplenc R, Thompson J, Han P, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2005;65(6):2482-87.
168. Zgheib N, Akra-Ismail M, Aridi C. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Genomics* 2014;24(8):387-96
169. Erčulj N, Kotnik BF, Debeljak M, Jazbec J, Dolžan V. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(6):1096-104

170. Karathanasis NV, Stiakaki E, Goulielmos GN, Kalmanti M. The role of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms in Cretan children with acute lymphoblastic leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(1-2):5-10.
171. Horinouchi M, Yagi M, Imanishi H, et al. Association of genetic polymorphisms with hepatotoxicity in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010;27(5):344-354.
172. Kantar M, Kosova B, Cetingul N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(6):912-917.
173. van Kooten Niekerk PB, Schmiegelow K, Schroeder H. Influence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and coadministration of antimetabolites on toxicity after high dose methotrexate. *Eur J Haematol*. 2008;81(5):391-398.
174. Pakakasama S, Kanchanakamhaeng K, Kajanachumpol S, et al. Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 2007;86(8):609-611.
175. Chatzidakis K, Goulas A, Athanassiadou-Piperopoulou F, Fidani L, Koliousskas D, Mirtsou V. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in greek patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47(2):147-151.
176. Seidemann K, Book M, Zimmermann M, Meyer U, Welte K, Stanulla M, Reiter A. MTHFR 677 (C-->T) polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95. *Ann Hematol*. 2006;85: 291-300.
177. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(1):66-72.

178. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, et al. Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(4):612-619.
179. 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;121(26):5145-53
180. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med*. 1996;335:1041-1048.
181. Sierra EE, Goldman ID. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin Oncol*.1999;26:11-23.
182. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism (80G/A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab*. 2000;70:310-315
183. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg*. 2001;11(1):14-17.
184. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier(A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet*. 2002;108:1-6.
185. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res*. 1991;51:828-835.
186. Seidel H, Andersen A, Kvaloy JT, et al. Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk Res*. 2000;24: 193-199.
187. Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*2002;100(10):3832-4.

188. Kishi S, Cheng C, French D, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*. 2007 ; 109(10): 4151–57.
189. Zhai X, Wang H, Zhu X, et al. Gene polymorphisms of ABC transporters are associated with clinical outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Sci*. 2012 Sep 8; 8(4): 659–671.
190. Woodahl EL, Ho RJ. The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function. *Curr Drug Metab*. 2004 Feb;5(1):11-9.
191. Alisa Peet MD (Author), Michael A. Lieberman PhD (Editor), Allan Marks MD (Editor) Marks' Basic Medical Biochemistry , Fourth, North American Edition Lipincot Williams&Wilkins, Baltimor, Philadelphia, 2013.
192. Furness DL, Fenech MF, Khong YT, Romero R, Dekker GA. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199(3):276-278
193. Linnebank M, Pels H, Kleczar N, et al. MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. *Neurology*. 2005;64(5):912-3.
194. Linnebank M, Moskau S, Jürgens A, et al. Association of genetic variants of methionine metabolism with methotrexate-induced CNS white matter changes in patients with primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol*. 2009 ; 11(1): 2–8.
195. Ката Мартинова, Рецидиви кај акутни лимфобластни леукемии во детската возраст, Докторска Дисертација, Универзитет "Св.Кирил и Методиј" – Скопје, Медицински Факултет. 1999; 21-23
196. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004;104: 2690-96.

197. Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, et al. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leuk Res Treatment* 2013; 2013, Article ID 238528, 9 pages.
198. Dayse Maria Vasconcelos de Deus, Elker Lene Santos de Lima, Rafaela Maria Seabra Silva, Edinalva Pereira Leite, and Maria Tereza Cartaxo Muniz, “Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia,” *Leuk Res Treatment*, 2012;2012 Article ID 292043, 6 pages.
199. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst B, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106 (2): 717-720.
200. Ojha R., Gurney J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and overall survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. *Leuk Lymphoma* 2014; 55 (1): 67-73.
201. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003;348: 538-549.
202. Wang W, Marsh S, Cassidy J, McLeod HL. Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res*. 2001;61: 5505-10.
203. Johnston PG, Mick R, Recant W, et al. Thymidylate synthase expression and response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89: 308-313.
204. Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2002;359: 1033–1034.
205. Lauten M, Asgedom G, Welte K, Schrappe M, Stanulla M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003; 88(03): 352-354.

206. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990 Oct 15;76(8):1449-63.
207. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1996–2001
208. Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood*. 1999;93(5):1643–50.
209. Zhang L, Taub JW, Williamson M, et al. Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res*. 1998;4(9):2169–77.
210. Ashton LJ, Gifford AJ, Kwan E, et al. Reduced folate carrier and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: associations with clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1348–1351.
211. Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2009;301:393–403
212. Sterba J, Valík D, Bajciová V, Kadlecová V, Gregorová V, Mendelová D. High-dose methotrexate and/or leucovorin rescue for the treatment of children with lymphoblastic malignancies: do we really know why, when and how? *Neoplasma*. 2005;52(6):456-63.
213. Treon S and Chabner B. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy . *Clinical Chemistry* 1996;42(8): 1322-1329.
214. Erculj N, Faganel Kotnik B, Debeljak M, Jazbec J, Dolzan V. The influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate related toxicity and survival in children with non-Hodgkin malignant lymphoma, *Radiol Oncol* 2014; 48(3): 289-292.
215. Suthandiram S, Gan GG, Zain SM, Bee PC, Lian LH, Chang KM, Ong TC, Mohamed Z. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity

and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics*. 2014 Aug;15(11):1479-94.

216. Petra BG, Jazbec Janez J and Vita D. Gene – gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leuk Lymphoma* 2007;48 (4):786-792.

9 ПРИЛОГ 1 - Образец за следење на токсичните ефекти при терапијата со метотрексат

Акутна токсичност за време на спроведување на ALL-БФМ 2000

- Почеток на терапијата блок/фаза _____
- крај на терапијата блок/фаза _____

Означете го со одветното поле за секој параметер (Класификација според NCI Common Toxicity Criteria, modified by SIOP, from GPOH: Data Management Work Group)

Токсичност: хематолошка

Хемоглобин Г/л	Нормален за возраста	>100	80-100	65-79	<65
Ле (г/л)	>4,0	3,0-3,9	2,0-2,9	1,0-1,9	<1,0
Гранулоцити (г/л)	>2,0	1,5-1,9	1,0-1,4	0,5-0,9	<0,5
Тромбоцити (г/л)	>100	75-100	50-74,9	25-49,9	<25

Инфекција

инфекција	Нема	Блага	СреDNA, неидентифициран патоген, и.в.а.б.	Тешка. идентифициран патоген, и.в.а.б.	животоно загрозувачка,
-----------	------	-------	---	--	------------------------

Мукозит

стоматит	Нема	Безболен улцер, еритем	Болен еритем или улцер, може да јаде	Болен еритем или улцер, не може да јаде	Неопходна ТПИ заради стоматитот
Дијареа (број на столица в ден)	Нема	2-3	4-6 или лесни болки	7-9 или инконтиненција болки	>10, крвави столица или неопходна ТПИ

Нефротоксичност

Креатинин	Нормален	<1,5 x норм	1,5-3,0хнорм	3,1-6,0 x норм	>6,0хнорм
Протеинурија (г/л)	Нема	<3	3-10	>10	Нефротски синдром
Хематурија	Нема	микроскопска	Микроскопска, Без коагулуми	Макроскопска со коагулуми	Неопходна трансфузија

Хепатотоксичност

Билирубин	Нормален за возраста		<1,5 x норм	1,5-3хнорм	>3 x норм
АЛТ/АСТ	Нормален за возраста	<2,5 x н	2,6-5,0 x н	5,1-20,0 x н	>20 x н

Кардиотоксичност

аритмија	Нема	Асимтоматска, без терапија	Рекурентна перзист., без терапија	Неопходна терапија	Хипотензија, Вентрикуларна аритмија
Срцева функција	Нормална	Асимптоматска, ЕФ нам.за<20% од основната	Асимптоматска, ЕФ нам.за>20% од основната	Средна срцева инсуф., компензирана со ТХ	Тешка срцева инсуф.

Невротоксичност

Централна	Нема	Лесна сомноленција или агитација	Сомноленција <50% од времето, средна дезориент.	Сомноленција > 50% од времето, тешка дезориент., халуцинации	Кома, конвулзии
периферна	Нема	Парестезии, лесна субјективна слабост	Тешки парестезии и/или лесна слабост	Дефицит во моторните функции	парализа