



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Медицински факултет

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**ПОВРЗАНОСТ НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ
ВКЛУЧЕНИ ВО МЕТАБОЛИЗМОТ НА
ЦИКЛОФОСФАМИД И ДОКСОРУБИЦИН СО
ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ПРИ НИВНАТА ПРИМЕНА
КАЈ КАРЦИНОМОТ НА ДОЖКАТА**

д-р Илир Исмаили

ЈЗУ Клиника за радиотерапија и онкологија, Скопје

Скопје, декември 2020 година

СОДРЖИНА

Апстракт.....	iii
Abstract (на англиски јазик).....	iv
1. Вовед.....	1
1.1. Епидемиологија на карциномот на дојката.....	1
1.2. Ризик-фактори.....	1
1.3. Симптоми и дијагноза.....	2
1.4. Патологија.....	2
1.5. Молекуларна генетика на карциномот на дојката.....	3
1.6. Терапија.....	4
1.6.1. Циклофосфамид.....	6
1.6.2. Доксорубицин.....	10
1.7. Токсични ефекти и нузпојави при хемотерапијата на карциномот на дојката.....	13
1.8. Генетски аспекти на токсичноста при хемотерапијата кај карциномот на дојката.....	16
1.8.1. <i>ABCB1</i>	18
1.8.2. <i>GSTP1</i>	20
2. Мотив за изработка на студијата.....	22
3. Цели.....	23
4. Материјал и методи.....	24
4.1. Дизајн на студијата.....	24
4.2. Критериуми за вклучување и исклучување во студијата.....	24
4.3. Клинички и лабораториски податоци за пациентите.....	25
4.4. Молекуларно-генетски анализи.....	28
4.4.1. Генотипизација.....	28
4.5. Статистичка анализа.....	30
5. Резултати.....	31
5.1. Возрасна структура на пациентките.....	31
5.2. Семејна анамнеза за карцином на дојка.....	32
5.3. Историја на пушење.....	32
5.4. Релевантни клиничко-патолошки податоци.....	33
5.5. Регистрирани токсични ефекти и нузпојави во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин.....	35
5.5.1. Анемија поврзана со хемотерапијата.....	40
5.5.2. Фебрилна состојба.....	41
5.5.3. Фебрилна неутропенија.....	42
5.5.4. Орален мукозитис.....	42
5.5.5. Тромбоцитопенија.....	43
5.6. Резултати од генотипизацијата.....	45
5.6.1. Детекција на полиморфизмот rs20325282 во генот <i>ABCB1</i>	45
5.6.2. Детекција на полиморфизмот rs1695 и во генот <i>GSTP1</i>	46
5.6.3. Фреквенции на генотиповите и алелите на испитуваните полиморфизми кај пациентите.....	46

5.6.4. Популациско-генетска анализа.....	49
5.7. Генетски анализи за определување на поврзаноста на испитуваните полиморфизми со појавата на токсични ефекти и нузпојави.....	51
5.7.1. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на анемија предизвикана од хемотерапијата.....	52
5.7.2. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на фебрилна состојба.....	59
5.7.3. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на фебрилна неутропенија.....	66
5.7.4. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на орален мукозитис.....	73
5.7.5. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на тромбоцитопенија.....	90
5.7.6. Резиме на генетската поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на токсични ефекти и нузпојави.....	97
6. Дискусија.....	98
7. Заклучоци.....	108
8. Литература.....	110

ПОВРЗАНОСТ НА ПОЛИМОРФИЗМИТЕ НА ГЕНИТЕ ВКЛУЧЕНИ ВО МЕТАБОЛИЗМОТ НА ЦИКЛОФОСФАМИД И ДОКСОРУБИЦИН СО ТОКСИЧНИТЕ ЕФЕКТИ ПРИ НИВНАТА ПРИМЕНА КАЈ КАРЦИНОМОТ НА ДОЖКАТА

АПСТРАКТ

Карциномот на дојката е меѓу водечките причини за морбидитет и морталитет и е меѓу начестите малигни неоплазми кај женскиот пол во светски рамки. Адјувантната хемотерапија со комбинација на циклофосфамид и доксорубицин исклучително често е проследена со низа на токсични ефекти и нузпојави со различен степен на изразеност и клиничка значајност. Конститутивните полиморфизми во гените чии продукти се вклучени во детоксификацијата и метаболизмот на хемотерапевтиците имаат влијание врз појавата на токсичните ефекти и нузпојави и веројатно имаат клучна улога во високата интериндивидуална разлика кај пациентите.

Основната цел на студијата беше да се определи генетската поврзаност на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* со појавата на појавата на токсични ефекти и нузпојави во текот и непосредно по третманот со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентките со карцином на дојка, како и да се определи предиктивната вредност на испитуваните полиморфизми во однос на ризикот од појавата на токсични ефекти.

Определувањето на двата полиморфизми се изврши кај DNA примероците изолирани од леукоцитите од 178 пациентки со карцином на дојката кои се третирани адјувантно со циклофосфамид и доксорубицин, по претходно добиена согласност. Статистичките анализи се извршени споредувајќи ги клиничките податоци за токсичните ефекти со фреквенциите на генотиповите и алелите од испитуваните генски полиморфизми. Анализите покажаа дека полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* или rs20325282 во генот *ABCB1* имаат предиктивна вредност во проценката на веројатноста, односно, ризикот од појава на анемија поврзана со хемотерапијата, фебрилна состојба, фебрилна неутропенија и орален мукозитис.

Перспективно, овие сознанија можат да се користат за прилагодување и персонализирање на хемотерапијата според индивидуалната генотипска комбинација кај секој поединечен пациент.

Клучни зборови: карцином на дојка, генски полиморфизми, циклофосфамид, доксорубицин, токсични ефекти

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS OF THE GENES INVOLVED IN CYCLOPHOSPHAMIDE AND DOXORUBICIN METABOLISM WITH THEIR TOXICITY IN BREAST CANCER PATIENTS

ABSTRACT

Breast cancer is a major morbidity and mortality factor and is among the most frequent female neoplasms globally. Combined cyclophosphamide and doxorubicin adjuvant chemotherapy is frequently associated with a series of toxic effects of different grades and clinical significance. Constitutive polymorphisms in the genes involved in detoxification and metabolism of chemotherapeutics plays a key role in toxic effects predisposition.

The main goal of this study is to determine the genetic association of polymorphisms rs20325282 in *ABCB1* gene and rs1695 (A313G) in *GSTP1* gene with occurrence of leukopenia and to estimate the possible predictive value of those polymorphisms regarding the risk of toxic effects and adverse reactions.

The polymorphisms were genotyped in DNA samples from 178 cases of breast cancer treated adjuvantly with cyclophosphamide and doxorubicin, after providing the signed consent from each patient. Statistical analyses were performed comparing the clinical data regarding the toxic effects and adverse reactions with the frequencies of the genotypes and alleles of both polymorphisms.

The analyses indicated that polymorphisms rs20325282 in *ABCB1* gene and rs1695 in *GSTP1* may have a predictive value in determining the probability and/or risk of occurrence of chemotherapy-induced anemia, fever, febrile neutropenia and oral mucositis.

Those findings could be used prospectively for adjustment and personalisation of the chemotherapy according to the individual genotypes combination in each patient.

Key words: breast cancer, *GSTP1* gene polymorphism, cyclophosphamide, doxorubicin, toxic effects

1. ВОВЕД

Карциномот на дојката е системско хетерогено заболување кое започнува како солидна малигна неоплазма на дукталниот или лобуларниот епител на дојката. Поради високата инциденција и морталитет во развиените земји, карциномот на дојката е меѓу најдобро проучените малигни заболувања, со енормен број на досега објавени научни публикации и проекти. Сепак, клиничкиот успех на постоечките тераписки модалитети не е задоволителен, а голем број на детали за етиопатогенезата и клиничкиот тек на болеста, особено за клеточните и молекуларно-генетските аспекти, се недоволно јасни или се контрадикторни.

1.1. Епидемиологија на карциномот на дојката

Инциденцијата на карциномот на дојката е највисока во Северна Америка и Северна Европа, а е најниска во земјите на Азија и Африка. Во светски рамки, според GLOBOCAN, проценето е дека од карцином на дојка, годишно заболуваат повеќе од 1 300 000 женски лица, а умираат околу 450 000 (Ferlay et al., 2013). Според пресметките на GLOBOCAN, годишната инциденција на карциномот на дојката во Република Македонија за 2012 година е 76,2 заболени, додека морталитетот е 25,5 починати на 100 000 жители, стандардизирани за возраста, кај женскиот пол (Ferlay et al., 2013b).

1.2. Ризик-фактори

Фактот што карциномот на дојката е околу 100 пати почест кај женските, отколку кај машките лица, укажува на улогата на естрогенот и прогестеронот како еден од важните интринзични ризик-фактори (Chlebowski et al., 2003). Досега се утврдени голем број на други ризик-фактори кои ги вклучуваат: генетските фактори, односно херeditарните мутации во гените *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* и други, како и фамилијарната и личната анамнеза за појава на карцином на дојката.

Меѓу останатите фактори опишани се: вкупниот број менструални циклуси, претходни бремености, структурата и бенигните промени на дојката, употребата на хормински и контрацептивни медикаменти, постменопаузалната хормонска супституциска терапија и претходните рентгенски зрачења на градниот кош и други. Покрај тоа, забележан е зголемен ризик и при историјата за консумација на алкохол, прекумерната телесна тежина, недоволната физичка активност и повеќе други

фактори со варијабилна статистичка сигнификантност во однос на поврзаноста со ризикот од карцином на дојката.

1.3. Симптоми и дијагноза

Клиничките знаци на карциномот на дојката се варијабилни, а вклучуваат палпирање на цврста маса во структурата на ткивото на дојката, како и промени на кожата или папилата, исцедок од брадавицата, аксиларна лимфаденопатија и други. Покрај физикалниот преглед, анамнезата, се применуваат и низа на иницијации, какви што се лабораториските анализи, евалуација со имидинг-техниките: билатерална мамографија, ултрасонографија, компјутерска томографија, магнетна резонанца на дојката и други техники. Дисеминацијата може да се евалуира и со радиоизотопните методи на скенирање. Цитолошката дијагноза на аспират добиен со пункција на суспектната лезија на дојката може да биде корисен, но хистолошкиот преглед на биопсичниот материјал е многу поточен. Конечната хистопатолошка дијагноза и TNM класификацијата (Т-тумор, N-нодус, М-метастази) се поставуваат постоперативно од хируршки отстранетото ткиво (pTNM).

Самопрегледите, мамографскиот скрининг и ултрасонографијата често се применуваат и се најуспешни за раното откривање на карциномот на дојката.

1.4. Патологија

Хистолошки, карциномите на дојката се класифицирани во дуктални (застапени со околу 80% од сите случаи), лобуларни (околу 15%), медуларни и мешани типови (ретко застапени). Хистопатолошкиот градус на малигнитет, односно степенот на диференцијација на малигните клетки, како и клиничко-патолошкиот стадиум на болеста според pTNM-системот, односно според димензиите на примарниот тумор, локалната инвазија на ткивните структури, метастазите во регионалните лимфни јазли и оддалечените метастази, имаат клучна улога во изборот на терапијата, како и за прогнозата на клиничкиот тек на болеста. Имунохистохемиската детекција на Е-кадеринот значително помага во рутинската дистинкција на дукталниот од лобуларниот тип, додека имунохистохемското или семиквантитативно *in situ* (FISH/CISH/SISH) определување на експресијата на рецепторите за хормоните: естроген (ER), прогестерон (PR), експресијата на протеинскиот продукт на генот *HER2*, како и присуството на пролиферативниот антиген Ki-67 и на други протеини, се важни патолошки параметри кои можат да се користат при клиничкиот избор на адјувантната и таргетираната терапија.

Во последниве години се применува и молекуларна класификација според експресијата на селектирани гени, вклучувајќи ги и гените за ER и PR-рецепторите (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Досега се опишани различни системи за молекуларна класификација кои се разликуваат според бројот на молекуларните поткласи, критериумите според тоа кои гени се селектирани, методологијата (квантитативна Real-Time PCR, флуоресцентна *in situ* хибридизација, DNA-microarray или други молекуларни техники).

1.5. Молекуларна генетика на карциномот на дојката

Современеиот сознанија укажуваат дека малигната трансформација и постепената прогресија на промените од нормална до малигна клетка, преку карциномот *in situ*, па сè до инвазивниот и метастатскиот карцином, е проследена со долготрајно акумулирање на низа молекуларно-генетски абнормалности, какви што се: генските мутации, промените на нивоата на генската експресија, единечните нуклеотидни полиморфизми (SNP, од англ.: single nucleotide polymorphism), DNA-метилацијата, геномската нестабилност, хромозомски аберации, како и други промени (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Според канонската публикација на Hanahan и Weinberg, 2011, тие промени можат да се класифицираат во следниве шест функционални групи: 1. мутации во прото-онкогените кои предизвикуваат континуирана клеточна пролиферација; 2. мутации во тумор-супресорските гени поради кои клетките се нечувствителни на антипролиферативните сигнали; 3. избегнување на апоптозата поради прекумерна експресија на антиапоптотичните или потисната експресија на проапоптотичните молекули; 4. активирање на теломеразата кое овозможува неограничен репликативен потенцијал; 5. раст на нови крвни садови (неоангиогенеза); и 6. способноста за инвазија на соседните ткива, како и за метастазирање; 7. репрограмирање на енергетскиот метаболизам и 8. избегнување на имуната реакција (Hanahan и Weinberg, 2011). Се смета дека и геномската нестабилност, како и инфламаторната реакција, можат да допринесуваат во процесот на развој на малигниот тумор.

Сите овие молекуларно-генетски и епигенетски нарушувања имаат клучна улога, не само врз самиот процес на малигна трансформација, туку и врз вродената предиспозиција, приемчивоста кон неоплазмите, текот на болеста и терапевтскиот одговор.

Генетските абнормалности се клучни и за малигната трансформација и развојот на карциномот на дојката. Во најголем број случаи (околу 95%) карциномот на

дојката се должи на спорадични генетски алтерации, додека само кај мал број (околу 5%) се должи на херидитарни мутации, какви што се тие во гените *BRCA1* и *BRCA2*, а поретко и во други гени (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Кај дукталниот карцином, најчестите молекуларни промени се наоѓаат во гените *TR53*, *MYC*, *ERBB2*, *GATA3* и други гени, додека кај лобуларниот карцином, молекуларните абнормалности се најчести кај гените *CDH1* (кој го кодира E-кадериот, па отсуствува неговата експресија), *PIK3CA*, *MDM4*, *FOXA3*, *TBX3* и други гени (Ciriello et al., 2015). Постојат и комбинации на молекуларни промени во селектирани гени кои се основа за молекуларната класификација на карциномите на дојката, што во иднина, може да има големо влијание врз изборот на терапијата.

Се смета дека доминантниот клон на малигни клетки кој преовладува во туморската маса содржи уникатна комбинација на молекуларни нарушувања и ги детерминира, барем во временскиот период во кој е доминантен, биолошките карактеристики на неоплазмата, односно клиничкиот тек, терапевтскиот одговор и прогнозата на болеста кај пациентот.

1.6. Терапија

Во најголем број случаи на карцином на дојката, освен кај иноперабилните пациентки и при постоење на определени контраиндикации, индицирана е хируршко лекување при што целосно или делумно се отстранува дојката со туморот. Според обемот на хируршкото отстранување, оперативниот зафат може да биде радикална мастектомија или конзервирачки, односно, квадрантектомија или лумпектомија.

Примената на хемотерапијата и/или зрачната терапија пред оперативниот зафат кај напреднати карциноми, со цел да се намали стадиумот, се означува како неодјувантна терапија. Постоперативната адјувантна системска хемотерапија и радиотерапија, се применуваат рутински за да се намалат шансите за минимална резидуална болест (MRD, од англ. minimal residual disease), а со тоа и да се редуцира појавата на локални рецидиви и регионални и оддалечени метастази. Кај пациентките кај кои хистопатолошки е најдена експресија на ER-рецепторите, се користат и различни агенси за хормонска модулација со антиестрогени и ароматазни инхибитори, со цел да се потисне поврзувањето на естрогенот со овие рецептори на малигните клетки и со тоа да се редуцира неговиот стимулативен ефект врз клеточниот раст и делба. Покрај тоа, во последниве години се применува и таргетирана терапија со агенси и со моноклонски антитела насочени кон инхибиција на определени генски продукти каков што е HER2, но и кон други протеини, со што

се подобрува преживувањето без рецидиви и метастази (DFS, од англ.: disease-free survival). Постои широк консензус за употребата на антрациклинските антибиотици, каков што е доксорубицинонот, во комбинација со цитотоксичните аликилирачки агенси од типот на циклофосфамид, како адјувантна хемотерапија од избор при стадиумите I и II, односно при инвазивен и локално дисеминиран карцином на дојката (Biganzoli et al., 2002; Martin et al., 2003; Evans et al., 2005; Mamounas et al., 2005).

При адјувантната хемотерапија на карциномот на дојката најчесто се применуваат протоколи при кои се користи определен хемотерапевтски агенс, а многу почесто комбинација од два или повеќе агенси со цитотоксичен, антиметаболен или друг ефект (какви што се: доксорубицин, циклофосфамид, 5-флуороурацил, метотрексат, таксани и други), како и хормонски модулаторни агенси, односно антиестрогени (тамоксифен, ароматазни инхибитори), таргетирани агенси (трастузумаб) и други медикаменти (Loesch et al., 2009; Blohmer et al., 2010). Кај напреднатите стадиуми и метастатската болест се применуваат и други хемотерапевтици (Sparano et al., 2008). Изборот на агенсите, поединечните дози, бројот на циклуси, односно динамиката на терапијата, нејзиното времетраење и повторување се врши врз основа на бројни индикатори кои ги вклучуваат хистопатолошкиот тип на карциномот, стадиумот, дополнителните имунохистохемиски или хибридизациски маркери (рецептори за ER, PR, како и за присуство на HER2 и антигенот Ki-67), како и општата состојба, возраста, желбата на пациентката и други фактори (Martín et al., 2006; von Minckwitz et al., 2009; Eiermann et al., 2011; Margolin et al., 2011; Chang et al., 2017).

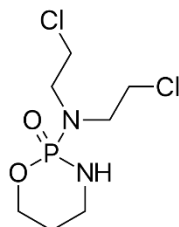
Според тековниот тераписки протокол (AC, од Adriamycin и Cyclophosphamide) кој се применува на Клиниката за радиотерапија и онкологија, адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентки со карцином на дојката се врши со следнава шема:

- третманот започнува во рок од 3 до 4 седмици по оперативниот зафат (мастектомија, квадрантектомија или лумпектомија);
- се спроведуваат вкупно 4 циклуси (дози) на растојание од по 21 ден;
- во секоја доза се аплицираат: доксорубицин (Adriamycin) 60 mg/m^2 i.v. и циклофосфамид (Cyclophosphamide) 600 mg/m^2 i.v.

Супериорноста на комбинираната терапија со доксорубицин и циклофосфамид како адјувантен хемотерапевтски третман кај карциномот на дојката е демонстрирана во повеќе рандомизирани студии и мета-анализи (von Minckwitz et al., 2005; Goldstein et al., 2008; Jones et al., 2009; Mansi et al., 2010).

1.6.1. Циклофосфамид

Циклофосфамидот (2-[бис-(2-хлороетил) амино]-тетрахидро-2H-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксид) е широко користен DNA-алкилирачки агенс од групата на оксазафосфорини и е наменет пред сè за хемотерапија на малигните неоплазми (слика 1).



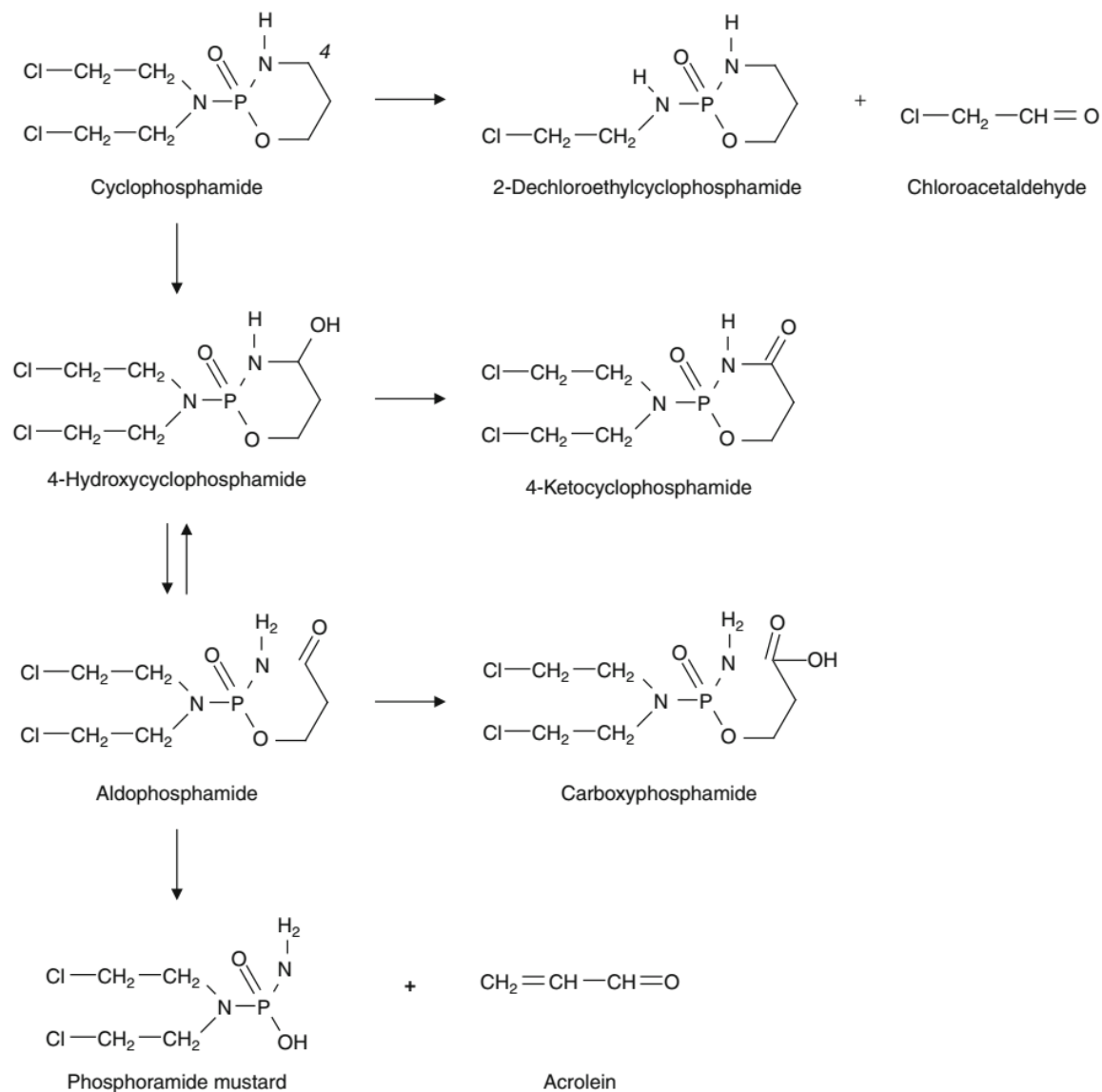
Слика 1. Хемиска структура на циклофосфамидот.

Антитуморската активност на циклофосфамидот е демонстрирана кај анималните модели уште на почетокот на 1940-тите години и набргу потоа е воведен во клиничка хемотерапија на малигните заболувања (Zhang et al., 2006). Во хемотерапијата, циклофосфамидот се користи и како единечен агенс, но почесто, во комбинација со други антиканцерни агенси и тоа кај широк спектар на солидни тумори и хематолошки малигноми. Комбинираната употреба на циклофосфамидот со други хемотераписки лекови е со цел да се постигне синергистички, односно дополнителен антиканцерски ефект што произлегува од комплементарните фармаколошки механизми на дејствување. Циклофосфамидот исто така се користи и за мобилизација на хематопоетските прогениторни клетки од коскената срцевина во периферната крв, како и за имunosупресија во комбинација со други имunosупресивни агенси какви што се преднизонот, микофенолната киселина или азатиопринот при лекувањето на некои автоимуни заболувања, вклучувајќи го и системскиот лупус еритематозус и ревматоидниот артритис.

По орална или интравенска администрација, циклофосфамидот брзо се дистрибуира низ телото при што околу 20% (0-30%) се врзува со плазмините протеини, а неговиот метаболит, 4-хидрокси-циклофосфамид покажува уште поголема способност за врзување со протеините (<67%) (de Jonge et al., 2005).

По апсорбцијата и дистрибуцијата, циклофосфамидот се конвертира со учество на повеќе ензими од цитохром P450-системот лоцирани во црниот дроб, се до активните метаболити. Главниот активен метаболит е 4-хидроксициклофосфамидот, кој опостојува во рамнотежа со неговата таутомерна

форма, алдофосфамидот. Поголемиот дел од алдофосфамидот потоа се оксидира со ензимот алдехид дехидрогеназа (ALDH) создавајќи карбоксициклофосфамид (слика 2). Мал дел од алдофосфамидот слободно дифундира во клетките, каде што е распаѓа во две соединенија: фосфорамид мустард и акролеин. Активните метаболити на циклофосфамидот се високо поврзани со протеините и се дистрибуираат до сите ткива, а се претпоставува и дека ја преминуваат плацентата и се присутни во мајчиното млеко.



Слика 2. Шематски приказ на основните метаболични процеси на активација и инактивација на циклофосфамидот. Според de Jonge со сор. 2005 (de Jonge et. al, 2005).

И покрај досегашните сознанија за природата на хемиските реакции меѓу алкилирачките агенси, каков што е циклофосфамидот, и молекулите на DNA, како и создавањето на т.н. адукти (модифицирани DNA бази) и вкрстени хемиски врски меѓу

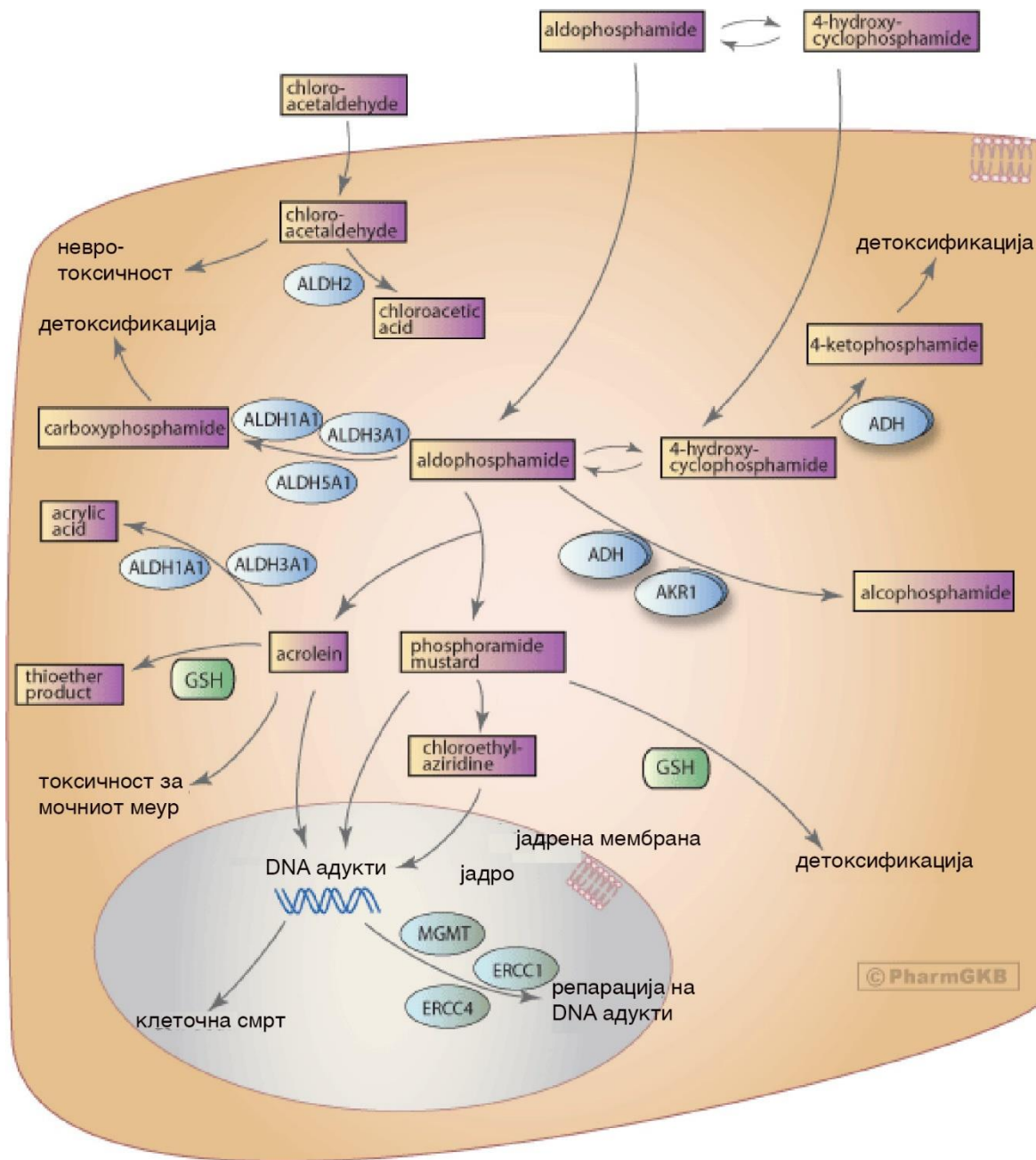
нуклеотидите, прецизните механизми кои предизвикуваат смрт на туморските клетки не се целосно јасни. Циклофосфамидот, како и кај сите други алкилирачки агенси, предизвикува апоптоза (програмирана клеточна смрт) иницирана од оштетување на DNA, модулација на клеточниот циклус, како и преку други антипролиферативни ефекти. Општо прифатено е дека главниот механизам што резултира со смрт на клетките е инхибиција на репликацијата на DNA, бидејќи меѓусебно ковалентно вкрстените поврзани нуклеотиди не дозволуваат одвојување на двете вериги и со тоа ја попречуваат репликацијата. Ковалентното врзување за клеточните протеини исто така е присутно и допринесува кон антипролиферативниот ефект.

По метаболичката активација, од циклофосфамидот се генерираат бифункционални алкилирани азотни мустардни соединенија, кои се способни да реагираат со азот-7 атом на пуринските бази во составот на DNA. При алкална или неутрална pH вредност, азотниот мустард се претвора прво во имониум јон, а потоа во хемиски реактивен карбониум јон кој реагира со N7 од гуанинскиот остаток во DNA и формира ковалентна врска. Преостанатиот реактивен дел од фосфорамид мустардот може да реагира со гуанинот од спротивната DNA верига или во истата верига со што се формираат вкрстени врски.

Покрај ефектите кои ги предизвикува преку своите алкилирачки метаболити, циклофосфамидот предизвикува и цитотоксичност преку други механизми. Докажано е дека метаболитите на циклофосфамидот индуцираат осиромашување на интрацелуларните резерви на сулфхидрилни соединенија, вклучувајќи го глутатионот (GSH), што резултира со цитотоксичност. Затоа, стимулацијата на клеточната синтеза на GSH може да делува протективно кон од цитотоксичноста предизвикана од циклофосфамидот и неговите метаболити. Акролеинот е особено способен да индуцира едноверижни прекини во DNA хеликсот и што е веројатно поврзано со цитотоксичноста на циклофосфамидот.

Познати се и модулаторните ефекти на циклофосфамидот врз хуморалниот и клеточниот имунитет кои можат да бидат корисни ефекти кога истиот се користи како имуносупресивен лек.

Дел од поважните интрацелуларните, метаболичките и детоксификациските патеки, како и поважните крајни ефекти на циклофосфамидот и неговите метаболити се претставени шематски на **сликата 3**.

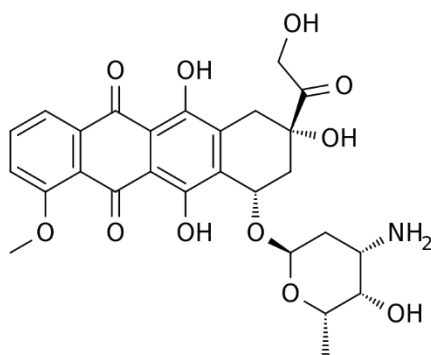


Слика 3. Шематски приказ на основните интрацелуларни метаболични и детоксификациски процеси, како и ефектите на циклофосфамидот и неговите метаболити. Според Whirl-Carrillo со сор. 2012 (Whirl-Carrillo et. al, 2012).

За ја, циклофосфамидот, како и голем дел од неговите метаболити, предизвикуваат и разни токсични ефекти, пред сè поврзани со депресија на коскената срцевина, но и вклучуваат ретки животозагрозувачки комопликации и состојби какви што се аритмиите и срцевата слабост, енцефалопатија, нефротоксичност, хеморагичен циститис и други. Покрај тоа, забележан е тератоген и карциноген ефект.

1.6.2. Доксорубицин

Доксорубициноот (Адриамицин) е антрациклински антибиотик од класата I, изолиран од *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Хемиски, доксорубициноот е (8 S,10 S)-10-[(3-амино-2,3,6-тридеокси-(алфа)-L-ликсо-хексопиранозил)-окси]-8-гликолоил-7, 8, 9, 10-тетрахидро-6, 8, 11-трихидрокси-1-метокси-5, 12-нафтацендион (слика 4).



Слика 4. Хемиска структура на доксорубициноот.

Овој хемотерапевтски агенс има повеќе од 4 децении долга историја на примена во третманот на малигните заболувања.

Кусо време по интравенската апликација, доксорубициноот достигнува околу 50 пати повисоки концентрации во нуклеоплазмата отколку во цитоплазма. Поконкретно, доксорубицин може да достигне максимално ниво на сатурација од 340 μM во јадрото, од што може да се пресмета дека една молекула на доксорубицин се интеркалира во секој петти базен пар на DNA хеликсот (Rivankar, 2014). Преостанатиот слободен интрацелуларен доксорубицин (2% од вкупно присутниот лек во поединечната клетка) подеднакво се дистрибуира неселективно меѓу другите органели (Голџи апарат, лизозоми и митохондрии). Доксорубициноот претежно се акумулира во црниот дроб, најверојатно поради улогата на овој орган во метаболизмот. Постепено, доксорубициноот достигнува концентрации во коскената срцевина и леукоцитите кои се за 200-500 пати повисоки отколку тие во плазмата. Како што доксорубициноот се дистрибуира во ткивата, доаѓа до брз пад на неговите нивоа во плазмата. Доксорубициноот има силна способност ефикасно да пенетрира во ткивата, додека неговата способност да остане во клетките кои имаат јадра (сите освен еритроцитите) се должи на неговите липофилни карактеристики и DNA-интеркалирачки својства. Интересно е што, и покрај високата продорна моќ на доксорубициноот, истиот не може да помине низ хемато-енцефалната бариера.

Хемиската модификација на доксорубицин во телото (биотрансформација) се врши во црниот дроб. Доксорубицинолот е примарниот циркулирачки метаболит на доксорубицинолот.

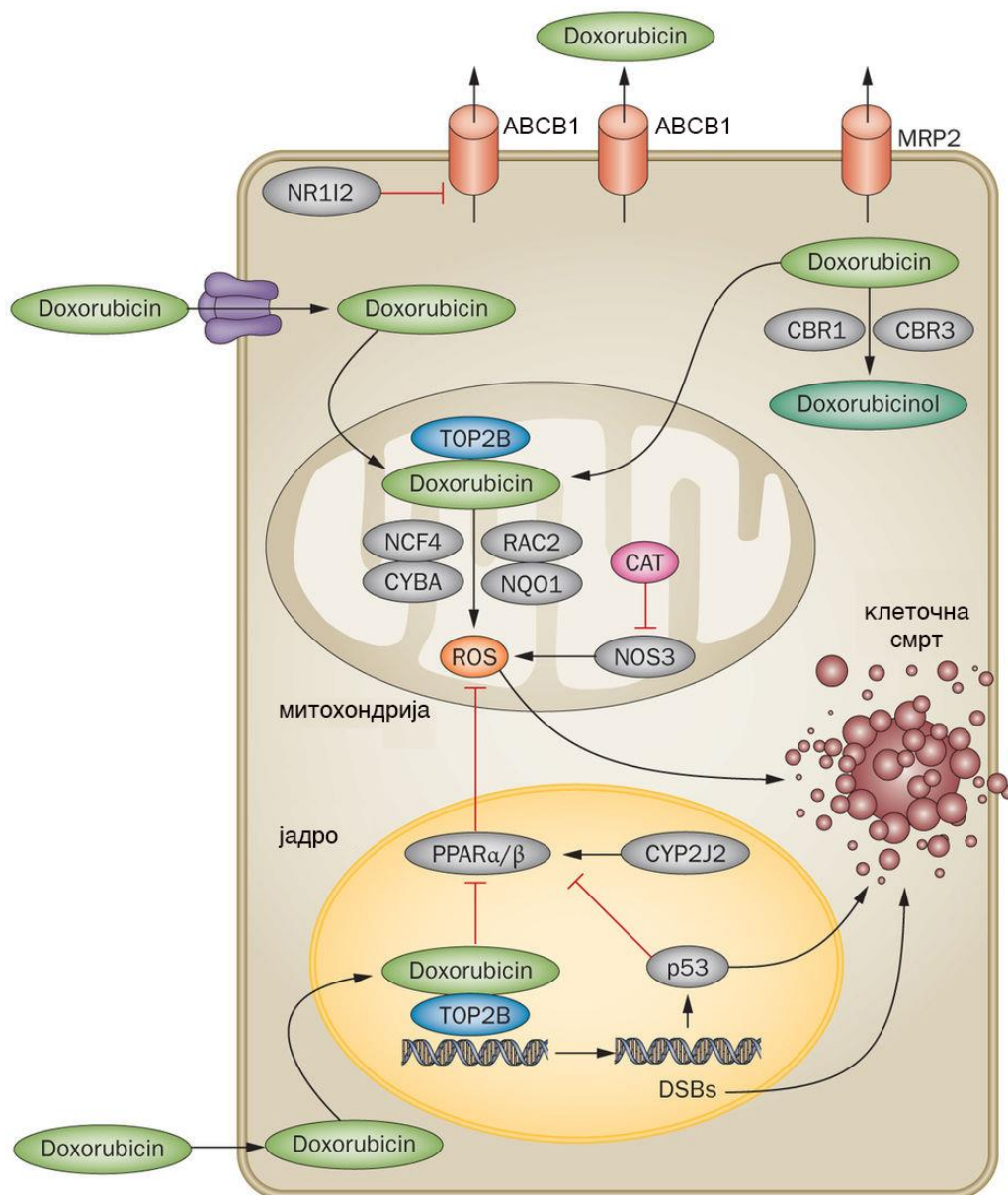
Антимитотските и цитотоксичните ефекти на доксорубицинолот се должат на неговата способност за интеркалирање меѓу базните парови на DNA-хеликсот, инхибицијата на DNA-топоизомеразата II, како и на други механизми (Tasar et al., 2013). Основните биолошки ефекти на доксорубицинолот: апоптозата, автофагијата и некрозата, се резултат на неговата интеракција со ензими поврзани со DNA, а пред сè преку интеркалацијата меѓу базните парови на двојната спирала на DNA.

Покрај тој механизам, доксорубицинолот дејствува и врз други молекуларни цели, какви што се ензимите топоизомеразата I и II, што предизвикува појавување на низа цитотоксични и антипролиферативни ефекти, како и оштетување на самата DNA (Buchholz et al., 2002). Апоптогичните механизми се активираат кога обидот да се репарираат оштетувањата во DNA молекулата не успеваат и кога клеточниот раст е инхибиран во фазите G1 и G2. Покрај тоа, познато е дека интеркалацијата на доксорубицинолот во DNA резултира си со инхибиција на DNA и на RNA полимеразите, што доведува до попречување на репликацијата и транскрипцијата.

Доксорубицинолот може да предизвика и активирање на разни молекуларни сигнали од АМПК патеката (апоптоза индуцирана со АМП-активираната протеин киназа) и со тоа да влијае врз апоптогичната Bcl-2/Bax патека. Со менување на соодносот Bcl-2/Bax може да се појави низводна активација на различни каспази што резултира со апоптоза. Доксорубицинолот предизвикува хиперактивација на PARP-1, клетката доживува клеточна смрт која ги покажува карактеристиките и на автофагијата и на некрозата. Овој настан покажува доказ дека клучниот настан кој ја активира клетката да влезе во автофагијата е колапсот на клеточната енергија како резултат на хиперактивацијата на ензимот PARP-1 (поли-ADP-рибоза полимеразата-1) што доведува до автофагија или апоптоза.

Дополнително, генотоксичниот стрес и создавањето на слободни радикали допринесуваат за активирање на антипролиферативните, а подоцна и проапоптогичните клеточни механизми.

Дел од механизмите за интрацелуларен транспорт на доксорубицинолот, неговиот метаболизам, како и влијанието врз клучните молекуларни патеки вклучени на апоптозата и клеточната смрт предизвикани од доксорубицинолот се прикажани шематски на **сликата 5**.



Слика 5. Шематски приказ на основните интрацелуларни молекуларни патишта и ефекти на доксорубициноот. Модифицирано според (Brown et al., 2015).

Доксорубициноот, исто така, предизвикува апоптоза и некроза во здравите ткива што може да резултира со токсични ефекти во различни органи, вклучувајќи ги мозокот, црниот дроб, бубрезите и срцето. Почестите несакани ефекти кои се јавуваат при хемотерапијата со доксорубицин вклучуваат супресија на коскената срцевина, уртикарија, орален мукозитис, губење на косата, повраќање, кардиотоксичност, хепатотоксичност, невротоксичност, нефротоксичност и други.

1.7. Токсични ефекти и нузпојави при хемотерапијата на карциномот на дојката

И покрај големиот напредок, хемотерапијата на карциномот на дојката, како и впрочем на сите малигни неоплазми, е речиси секогаш придружена со помалку или повеќе клинички изразени токсични ефекти и нузпојави. Некои од нив се непријатни за пациентот, но не предизвикуваат големо или долготрајно влијание врз физичката здравствена состојба на пациентот, додека други значително го намалуваат квалитетот на животот, предизвикуваат сериозни клинички компликации поради кои е потребен прекин на терапијата или нејзина модификација, а понекогаш предизвикуваат и животозагрозувачки состојби кои можат да завршат и летално (Bonadonna et al., 1995; Meinardi et al., 1999; Nowak et al., 2004; Dranitsaris et al., 2005; Cleeland et al., 2012; Peto et al., 2012; Turner et al., 2015).

Најчестите токсични ефекти се хематопоетска депресија (анемија, леукопенија, особено неутропенија, тромбоцитопенија), кардиомиотоксичност, дигестивна токсичност (орален, интестинален мукозитис, гастроинтестинални крварења, иктерус), општи нузпојави (наузеа, vomitus, промени на артерискиот крвен притисок), фебрилни состојби, системски, локални и кожни инфекции, невротоксичност, нефротоксичност и други. Сериозните токсични ефекти, каква што е тешката неутропенија, а особено фебрилната неутропенија, не само што имаат има негативно влијание врз квалитетот на животот на пациентката, туку предизвикуваат натамошни компликации, а ги зголемуваат и смртноста и трошоците на лекувањето (Ikeda et al., 2015).

Врз основа на проценетата токсичност или интензитетот на несаканите реакции, онколозите можат да го одржат непроменето или да го намалат или одложат аплицирањето на следниот циклус на хемотерапија (Moth et al., 2019). Потценувањето на несаканите реакции може да доведе до недостаток на прилагодување на дозата каде што било навистина потрено, а последователно, неприлагодената доза може да предизвика повторна појава или да ги влоши несаканите ефекти кои се појавиле во претходниот циклус, што доведува до зголемен морбидитет, хоспитализации кои што можеле да се избегнат или пак до предвремено прекинување на хемотерапијата. Покрај тоа, некои пациенти свесно ги толерираат несаканите реакции сметајќи ги како неминовен дел од третманот, па дури и како знак дека третманот „навистина

делува“, како што покажа Salsman и сор. во својата компаративна студија (Salsman et al., 2012).

Тековните медикаментозни или други пристапи за намалување или потиснување на негативните ефекти предизвикани од хемотерапијата се честопати нецелосно ефикасни или дури можат да предизвикаат дополнителни несакани ефекти што само додаваат нови непријатности кај пациентот. Потребни се нови приоди за превенирање, подобрување на толеранцијата и намалување на последиците од хемотерапија на карциномот на дојката.

Светската здравствена организација (WHO) ги дефинира несаканите реакции на лекови како штетна или несакана реакција, односно појава која се јавува при користење на вообичаени дози и алекот за профилакса, дијагноза или терапија на болест или за модификација на физиолошката функција (Prieto-Callejero et al., 2020). Токсичните ефекти и несаканите реакции треба да се проценат според нивната сериозност, фреквенција и времетраење, земајќи ги предвид објективните и субјективните параметри при клиничката и лабораториската проценка. Објективните ги вклучуваат параметрите кои што можат да се оценат со физички преглед или со лабораториски тестови, додека субјективните би ги вклучиле оние што предизвикуваат симптоми кои не се поврзани со проценливи физички знаци или аналитички промени, и тие мора да се проценат исклучиво врз основа на податоците добиени од пациентот или лицата кои се грижат за него.

Основната причина за потребата од што попрецизна проценка на токсичноста поврзана со хемотерапијата е тоа што многу несакани реакции можат да се избегнат или минимизираат со претходна темелна евалуација извршена по секој циклус на хемотерапија. Можноста за избегнување или минимизирање на токсичноста поврзана со хемотерапија е релевантен аспект при грижата за пациентите со карцином, главно поради влијанието што го има врз квалитетот на животот на пациентот, но и за ризикот по здравјето и животот што може да го предизвика во некои случаи.

Препорачан систем за дефинирање, класифицирање и градација на токсичните ефекти и нузпојавите при хемотерапијата е периодичната публикација Критериуми за општа терминологија на несаканите појави (Common Terminology Criteria for Adverse Events - CTCAE) која ја издава Националниот институт за канцер на САД. Најновата верзија (5.0) е издадена во ноември 2017 година и ги опфаќа дефинициите, градусите и скратените описи на повеќето несакани појави кои можат да се појават при разни современи хемотераписки режими на повеќе малигни заболувања (**табела 1**).

Табела 1. Основни принципи на дефинирање и градирање на токсичните ефекти и нузпојави според СТСАЕ (верзија 5.0 од 27.11.2017 г.)*

Градус 0 нема несакани фекти	Градус 1 лесни несакани фекти	Градус 2 умерени несакани феќти	Градус 3 силно изразени несакани феќти	Градус 4 живото- загрозувачки несакани феќти	Градус 5 летален исход
без особени знаци или во опсег на нормалните вредности	асимпто- матски или благи симптоми; исклучиво клинички и дијагностички опсервации; не е неопходна медицинска интервенција	индицирани се умерени, минимални, локални или неинвазивни медицински интервенции	изразени или медицински значајни, но кои не се непосредно животозагрозува- чки; потребна е хоспитализација или продолжу- вање на постоечката хоспитализација; ограничувања во самоодржувањ- ето на личната нега и на секојдневните активности	живото- загрозувачка состојба; неопходност од итна медицинска интервенција	летален исход

*Извор: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf

Важно е да се земе во предвид дека студиите во кои се проучуваат токсичните ефекти и несаканите нузпојави од хемотерпијата, вклучително и поврзаноста на истите со генетските полиморфизми, не се конзистентни во однос на категоризирањето и градацијата, па дури ниту во јасното дефинирање на ваквите несакани ефекти. На пример, леукопенијата, според најновата СТСАЕ-класификација, верзија 5.0 (2017) е во категоријата на инвестигациски несакани ефекти кои се очекувани во тек на хемотерапијата и кој вообичаено се јавува во периодот меѓу 2 циклуси на хемотерапија и најчесто нема поизразена клиничка симптоматологија, односно не се реферира како поединечен несакан ефект во клиничките студии. Но, во некои опсежно цитирани е анализирана токму леукопенијата, на пример (Jereczek-Fossa et al., 1998; Liu et al., 2013). Оттаму, треба да се има предвид дека и во поновите екстензивни и влијателни студии во кои фокусот не е толку клинички, туку побазично ориентиран, сè уште се применува терминологија и класификација на токсичните ефекти и нузпојави надвор од препораките на СТСАЕ-системот (Gatti et al., 2018; Arakawa et al., 2018; Lavanderos et al., 2019). Дел од поновите, клинички ориентирани студии, генерално се придржуваат кон системот на класификација и градација на токсичните ефекти и несаканите нузпојави од хемотерпијата според тековната СТСАЕ-класификација.

1.8. Генетски аспекти на токсичноста при хемотерапијата кај карциномот на дојката

Иако дозите на хемотерапевтиците се пресметуваат според телесната површина и состојбата на пациентот, различен тип на токсични ефекти и нузпојави се јавуваат со варијабилен интензитет кај различни пациенти, а кај некои воопшто не се појавуваат. Се смета дека главна причина за таквата варијабилност се должи на присуството на конститутивни, наследени, полиморфизми во гените чии продукти се вклучени во интрацелуларниот транспорт на хемотераписките агенси или во нивниот метаболизам, што резултира со промена на фармакодинамиката, фармакокинетиката и клиничките ефекти и токсичност на медикаментот (Bray et al., 2010). Единечните нуклеотидни полиморфизми (SNP) можат да ја модифицираат биолошката активност на кодираниот протеин и со тоа да имаат големо влијание врз појавата на токсичните ефекти и нузпојави при хемотерапијата. Конститутивните полиморфизми во гените чии продукти се вклучени во детоксификацијата и метаболизмот на хемотерапевтиците имаат влијание врз појавата на токсичните ефекти и нузпојави и веројатно имаат клучна улога во високата интериндивидуална разлика кај пациентите.

Фармакогенетиката е всушност основната алатка на индивидуализираната или прецизната медицина, а се базира на испитувањето на генетската разновидност на човечките гени. Извонредно брзиот развој на техниките за DNA-секвенционирање доведе до сознание дека бројот на генетски варијанти кои го модулираат дејството на лековите е многу поголем отколку што се сметаше претходно и дека за вистинско персонализирано предвидување на реакцијата на лекот, вклучително и врз појавата на токсични ефекти и нузпојави, е потребно детектирање на ретки мутации (фреквенција на варијантниот алел <math><1\%</math>) или полиморфизми (фреквенција на варијантниот алел > 1%) во гените кои се поврзани со основните транспортни иметаболни патишта на соодветниот медикамент. Ваквиот пристап се очекува да има големи импликации врз концептуалниот развој и клиничката имплементација на фармакогенетиката во онкологијата.

Традиционално, користени се само неколку предиктори за проценка на ризикот од токсични ефекти и несакани појави при третманот на пациентките со карцином на дојката со определени хемотерапевтски агенси. Познато е дека постарата возраст, претходните хемотерапевтски третмани и коморбидитетите може да бидат фактори за предикција, односно за поголема шанса од појава на неутропенија поврзана со хемотерапија, на пример. Во таа насока, познато е дека афро-

американските жени имаат поголем ризик од неутропенија поврзана со хемотерапија што резултира во намалување на дозите или целосно прекинување на што наметнува намалување на дозата на лековите или одложување на третманот, отколку припадничките на белата раса. Генетски предвидливите несакани ефекти може да бидат во корелација со експресијата на индивидуалните молекуларни патишта поврзани со метаболизмот или транспортот на лекот во организмот. Потенцијалното познавање на ризикот на индивидуата за развој на токсични ефекти и несакани појави може да доведе до промена во планот за хемотераписки третман или до негова модификација со цел да го намали ризикот.

Оттаму, познавањето на веројатноста и предвидливоста на несаканите ефекти може да помогне во индивидуализирање на третманот за жени со дијагностициран карцином на дојка. Сепак, многу поголема придобивка од фармакогенетските истражувања е да се искористат акумулираните генетски и геномски податоци за да се овозможи избегнувањето на токсичноста на ниво на цели раси, етнички и регионални популации на пациенти, наместо само на подгрупата што може клинички да ги толерира тековно користени терапевтски режими на хемотерапија.

Генетските варијации можат да резултираат со индивидуални разлики во фармакокинетиката на специфичните хемотераписки агенси и да бидат поврзани со токсични ефекти. Познавањето на фармакогенетските варијанти кои можат да влијаат врз ризикот од несакани појави е важно и во метастатскиот и во адјувантниот третман на ракот на дојката. Ако можеме да го избереме третманот што најверојатно ќе обезбеди бенефит и минимална токсичност како терапија од прва линија, може да ги подобриме и долгорочните перспективи на пациентката.

Појавата на разни форми на токсични ефекти и нузпојави при третманот со доксорубицин и циклофосфамид, како и улогата на генетските фактори во приемчивоста кон тие ефекти, е екстензивно опишана во литературата (Bonadonna et al. 2004; Miller et al. 2005; Hess et al. 2006; Muss et al. 2009; Tabchy et al. 2010; Abe et al. 2013).

Неутропенијата и фебрилната неутропенија се релативно чести токсични ефект при хемотерапијата на карциномот на дојката и можат да предизвикаат сериозни компликации поврзани со системски инфекции проследени со фебрилни состојби, па и сепса, а многу ретко можат да имаат и летален исход. Фебрилната неутропенија е мошне често опишан токсичен ефект при третманот на карциномот на дојката со циклофосфамид и доксорубицин во научната и стручната литература (Kuderer et al., 2006; Vriens et al., 2013; Lyman et al., 2013; Kim et al., 2016). Третманот на

неутропенијата е поврзан и со користење на скапи медикаменти, а нејзините компликации се поврзани со со уште покомплексен терапевски пристап (Kuderer et al., 2007; Bennett et al., 2013).

Во ексензивната студија на Schärfe со соработниците, анализирани се над 60 000 егзоми, со што се утврдило постоењето на 61134 генски варијанти за кои алгоритмите предвидуваат функционалност, и тоа на 806 гени поврзани со ефектите на медикаментите кои се користат во онколошкиот третман (Schärfe et al., 2017).

Меѓу големиот број на познати полиморфизми во гени кои, преку своите протеински производи, се вклучени во фармакодинамиката, фармакокинетиката и механизмите на дејството на агенсите кои се користат при адјувантната хемотерапија на карциномот на дојката, во оваа студија се истражувани два гена: *ABCB1* и *GSTP1*.

1.8.1. *ABCB1*

Генот *ABCB1* (од англ.: ATP-Binding Cassette, Subfamily B, member 1), во литературата означен и како *MDR1*, *PGY1*, *CD243*, *ABCB20*, *GP170*, *P-GD* и *CLCS*) се наоѓа на хромозомската локација 7q21.12, содржи 28 егзони и има должина од 209,6 килобази (kb). Генот *ABCB1* кодира долг трансмембрански гликопротеин кој функционира како АТФ-зависен мембрански транспортер, односно како молекуларна пумпа за активен транспорт на молекулите од екстрацелуларниот во интрацелуларниот компартман и обратно (Ferreira et al., 2015). Во литературата, овој протеин честопати се означува како Р-гликопротеин 1 (гликопротеин за пропустливост, скратено Р-gp или Pgp), исто така познат како протеин за резистенција кон разни лекови, 1 (*MDR1*, од англ.: multidrug resistance 1). Р-gp е широко дистрибуиран и експримиран во цревниот епител каде што ги остранива ксенобиотиците (како токсините или лековите) назад во цревниот лумен, потоа во клетките на црниот дроб, каде што ги исфрла ксенобиотиците во жолчните канали, во клетките на проксималните тубули на бубрегот каде што ги испумпува во уринарниот филтрат (и тоа во проксималните тубули), како и во капиларните ендотелни клетки што ја сочинуваат крвно-мозочната бариера и бариерата на крв-тестис, каде што ги остранива ксенобиотиците назад во капиларите. Иако се експримира во различни типови клетки, најдена е абнормално висока експресија кај малигните клетки, што е и една од причините за резистентноста кон некои цитостатици.

ABCB1 е високо полиморфен ген, а особено се проучени полиморфизмите 1236C>T, 2677G>T/A, и 3435C>T кои резултираат со промени во концентрациите на транскриптитот, асемблирањето на протеинот по транслацијата и промени на

фармакокинетиката на повеќе медикаменти. Иако постојат голем број студии каде е покажано дека полиморфизмите на генот *ABCB1* ген биле поврзани со промени во диспозицијата на определени лекови, одговорот на пациентот кон лекот, како и неговата и токсичност, сепак дел од студиите имале и делумно конфликтни резултати, а клиничките импликации на овие полиморфизми сè уште не се целосно јасни. Важно е и дека постојат големи меѓуетнички разлики во распределбата на фреквенцијата на полиморфизмите во генот *ABCB1* (Wolking et al., 2015).

Во студијата на Lal со соработниците (Lal et al., 2007), меѓу другото, испитуван е и полиморфизмот *ABCB1* G2677T/A кај пациентки со карцином на дојката од различни кинески и малајски етнички групи. Било најдено дека варијантата A на овој полиморфизма била поврзана со пократко време до прогресија (TTP) и со целокупно преживување (OS), но немала влијание врз фармакокинетичките параметри на доксорубицинолот и доксорубицинолот.

Генетската поврзаност на полиморфизмите во генот *ABCB1* со токсичните ефекти и нуспојави при терапијата разни хемотераписки лекови е истражувана во голем број студии (Henderson et al., 2003; Erdélyi et al., 2006; Tran et al., 2006; Chang et al., 2009; Franke et al., 2010; Kudzi et al., 2010).

Резултатите од повеќе генетски асоцијативни студии и мета-анализи укажале на влијанието на полиморфизмите на генот *ABCB1* врз хемотоксичноста, одговорот кон хемотерапијата и клиничкиот исход кај пациентките со карцином на дојка (Tsai et al., 2009; Tulsyan et al., 2016). Од интерес за оваа студија е полиморфизмот rs20325282 односно трансверзијата G>T/A на нуклеотидната позиција 2677, означен и како *ABCB1* G2677T/A, резултирајќи со несинонимната супституција Ala839Ser/Thr на ниво на протеинскиот продукт.

Според некои студии, полиморфизмот *ABCB1* G2677T/A влијае врз фармакокинетиката на доксорубицинолот, неговите интрацелуларни концентрации и клиренсот од организмот, па може да претставува важен предикторен фактор за појава на токсични ефекти, особено хематолошка и гастроинтестинална токсичност при терапијата на карциномот на дојката (Yao et al., 2014). Овој полиморфизам е особено значајно поврзан со појавата на неутропенија кај пациентките со карцином на дојката, третирани со комбинација на доксорубицин и циклофосфамид (Ikeda et al., 2015).

Во 2013 година, групата предводена од Vulsteke со соработниците објавиле студија во која се анализирани 16 гени, како и дополнителни SNP-маркери, поврзани со метаболизмот на хемотераписките медикаменти, вклучувајќи го и циклофосфамидот (Vulsteke et al., 2013). Податоците биле колектирани од 1012

пациентки со карцином на дојка. Од интерес за нашата студија е дека Vulsteke со соработниците го посочуваат постоењето на статистички значајна генетска асоцијација полиморфизмот во генот *ABCB1* со појавата на неутропенија.

1.8.2. *GSTP1*

Генот *GSTP1* (глутатион-S-трансфераза Pi-1) е лоциран на хромозомскиот локус 11q13.2, содржи 7 егзони и има должина од околу 2,8 kb. Протеинскиот продукт на овој ген е ензимот GSTP1 кој припаѓа на суперфамилијата на метаболички глутатион-S-трансферази, експримирани во сите ткива. Мамалиските цитосолни глутатион-S-трансферази се поделени во 4 класи: α (алфа), μ (ми), π (пи) и θ (тета). GSTP1 е класифициран во класата π , од каде што и потекнува името на ензимот.

Глутатион-S-трансферазите се вклучени во детоксификацијата на повеќи типа на хидрофобни и електрофилни ендогени и егзогени соединенија по пат на конјугација со редуциран глутатион. Со тие реакции, овие мултифункционални ензими учествуваат во процесите на отстранување на реактивните, штетни нузпродукти на оксидативниот стрес во клетките. Покрај тоа, глутатион-S-трансферазите имаат клучна улога во метаболизмот на ксенобиотиците, вклучувајќи ги и хемотераписките агенци.

Генот *GSTP1* често е прекумерно експимиран кај широк спектар на тумори (Khrunin et al., 2010). Покрај тоа, генот *GSTP1* е високо полиморфен, па различните варијантни алели кодираат изоензимски форми кои имаат разлики во однос на каталитичката активност, а со тоа и разлики во ефикасноста на метаболизмот.

Потенцијалната употребливост на полиморфизмите во генот *GSTP1* во предикцијата на токсичните ефекти и на терапискиот исход е, исто така, екстензивно испитувана (Udler et al., 2007; Rocha et al., 2009; Bray et al., 2010; Gor et al., 2010).

За оваа студија, значаен е полиморфизмот rs1695, означен и како rs947894 или *GSTP1* A313G. На молекуларно ниво, тоа подразбира трансверзија A>G на нуклеотидната позиција 313, што резултира со несинонимната супституција Ile105Val во протеинскиот продукт на полиморфниот ген (Yao et al., 2010). ваквата супституција доведува до редуцирана ензимска активност и со тоа до промена на фармакокинетиката на определени лекови. Постојат податоци дека овој полиморфизам значајно корелира со терапевтскиот одговор и токсичните нузеефекти, како и со исходот на болеста при третманот со циклофосфамид кај карциномот на дојката (Pinto et al., 2009; Ge et al., 2013; Wang et al., 2015; Sugishita et al., 2016). Сепак, меѓу истражувањата постојат и контрадикторни резултати, па во некои студии не е идентифицирана значајна поврзаност на полиморфизмот *GSTP1* A313G со

фармакокинетиката и метаболизмот, ниту со клиничката токсичност на доксорубицинолот и циклофосфамидот (Bray et al., 2010; Jamieson et al., 2014; Islam et al., 2015). Покрај тоа, опишани се и големи варијации во фреквенциите на овој полиморфизам меѓу различните етнички групи испитаници (Sharma et al., 2014).

Спротивно на доксорубицинолот, циклофосфамидот се администрира како пролек, кој се подложува на метаболизирање и тоа активација со ензимите од фазата I посредувана со цитохром P450 (CYP) ензимите CYP2B6, CYP3A4 и CYP3A5, како и фаза II, односно инактивација посредувана првенствено преку глутатион S-трансферазите (GST). Активниот метаболит, 4-хидрокси-циклофосфамид, дифундира во малигните клетки и е одговорен за алкилирачката способност на циклофосфамидот. Се смета дека функционалните гени поврзани со транспортот на лекови, како и метаболизмот и репарацијата на DNA, влијаат врз појавата на цитотоксичните ефекти поврзани со хемотерапијата (Tsuji et al., 2015).

2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА СТУДИЈАТА

Основен мотив да се предложи оваа студија беше честата појава на токсични ефекти и нузпојави при адјувантната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентки со карцином на дојката, релативно малиот број на публикации и контрадикторните податоци во достапната литература, како и отсуството на научни студии кои ја анализираат поврзаноста на овие токсични ефекти со генските полиморфизми во Република Северна Македонија.

Ова истражување може да има оригинален научен допринос во расветлувањето на поврзаноста на полиморфизмите на гените вклучени во транспортот и метаболизмот на циклофосфамид и доксорубицин при хемотерапијата кај пациентки со карцином на дојката со појавата на токсични ефекти, со што, перспективно, може да има и апликативна вредност во т.н. персонализиран пристап во изборот на терапевтските агенски, како и планирањето на дозите, динамиката и други параметри на хемотерапијата.

3. ЦЕЛИ

Основна цел на докторската студија е определување на влијанието на селектирани генски полиморфизми врз појавата на токсичните ефекти и нузпојави во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај група од 178 пациентки со карцином на дојката.

Подетално, целите на студијата се:

1. Да се анализираат токсичните ефекти и нузпојави во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин.
2. Да се изврши генотипизација на единечните генски полиморфизми: полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* кај истата група пациентки.
3. Да се определи поврзаноста на секој од полиморфизмите, поединечно, со појавата на токсичните ефекти и нузпојави при терапијата со циклофосфамид и доксорубицин.
4. Да се определи влијанието на комбинацијата на двата полиморфизма врз појавата на токсичните ефекти и нузпојави при терапијата со циклофосфамид и доксорубицин.
5. Да се определи предиктивната вредност на испитуваните полиморфизми во однос на ризикот од појава на соодветни токсични ефекти и нузпојави за да можат, перспективно, да се користат за прилагодување и персонализирање на хемотерапијата според индивидуалните комбинации на селектирани генотипови кај секој поединечен пациент.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. Дизајн на студијата

Во оваа клиничка опсервациска студија спроведено е клиничко следење и генотипизација на полиморфизмите во гените *GSTP1* и *ABCB1*, како и евидентирање на релевантни клиничко-патолошки податоци во база на податоци од група на 178 пациентки со карцином на дојката, од почетокот на апликацијата на првата доза, па сè до истекот на три седмици по завршувањето на последната доза од третманот со комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин, согласно постоечките тераписи протоколи воспоставени на ЈЗУ Клиника за радиотерапија и онкологија во Скопје.

Клиничкиот дел од студијата е спроведен на Клиниката за радиотерапија и онкологија во Скопје, додека молекуларно-генетските, популациско-генетските и статистичките анализи се извршени во Лабораторијата за молекуларна биологија на Природно-математичкиот факултет во Скопје.

4.2. Критериуми за вклучување и исклучување во студијата

Примероците се колектирани само од пациентките кои, по деталното објаснување на постапката, целите, и нивните права, своерачно потпишаа писмена согласност за учество во студијата. Покрај тоа, информациите од пациентите се обработувани конфидентно и согласно одредбите од Законот за заштита на лични податоци. Дозвола за добивање и користење на материјалите и податоците од пациентите во студијата добиена и од Етичката комисија при Медицинскиот факултет во Скопје.

Селекцијата на пациентите е извршена според утврдените **критериуми за вклучување** во истражувањето:

- хистопатолошки докажан карцином на дојка кај женски пациентки;
- третман со комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин, согласно постоечките протоколи на Клиниката;
- клиничко-патолошки стадиум на карциномот на дојката \leq pT3;
- нови случаи (не рецидиви);
- без документирано присуство на хематогени метастази.
- своерачно потпишана согласност од пациентот, достапност на соодветните клинички податоци и други.

Како критериуми за исклучување од студијата, користени се следниве:

- клиничко-патолошки стадиум на карциномот на дојката >pT3;
- рецидиви;
- иноперабилни случаи;
- пациентки кои пред почетокот на првата доза на хемотерапија имале вредности на хемоглобин ≤ 100 g/L или тромбоцитопенија (број на тромбоцити $< 100 \times 10^9/L$), согласно критериумите според СТСАЕ;
- клинички докажани автоимуни заболувања,
- податоци за хронична кортикостероидна или имunosупресивна терапија,
- бремени пациентки,
- нецелосни податоци и недоволен број клинички параметри и слично.

4.3. Клинички и лабораториски податоци за пациентите

Во текот на студијата, беа следени несаканите ефекти согласно дефинициите и критериумите на најновата верзија на препораките на СТСАЕ (Common Terminology Criteria for Adverse Events), верзија 5.0 од 27.11.2017 година (табела 4.1). Оттаму, не беа следени некои чести нузпојави какви што се леукопенијата, наузејата и vomitusот.

Беа регистрирани следниве се следниве несакани ефекти на хемотерапијата:

1. **анемија** (анемијата индуцирана со хемотерапијата е дефинирана како намалување на почетната концентрација на хемоглобинот пред почетокот на хемотерапијата за најмалку 10 g/L, постоење на индикација за трансфузија на крв или за администрирање на еритропоетин, СТСАЕ, верзија 5.0 и според Kirshner et al., 2004);
2. **фебрилна неутропенија** (постои само еден градус и тоа 3, согласно СТСАЕ) и е дефинирана како постоење на единечна фебрилна состојба $> 38,3^\circ\text{C}$ или подолго-трајна фебрилна состојба $\geq 38^\circ\text{C}$ во текот на подолго од 1 час и истовремено детектирана неутропенија со неутрофили $< 1000/\mu\text{L}$;
3. **тромбоцитопенија** (како форма на хематолошко нарушување според СТСАЕ), со вредности на тромбоцитите $< 100 \times 10^9/\mu\text{L}$ во периферната крв;
4. **орален мукозитис** (според повеќе градуси во зависност од изразеноста на симптомите и нивните ефекти врз состојбата на пациентот); и
5. **фебрилна состојба** (според повеќе градуси, во зависност од измерената аксиларна телесна температура и нејзиното времетраење при некои градуси).

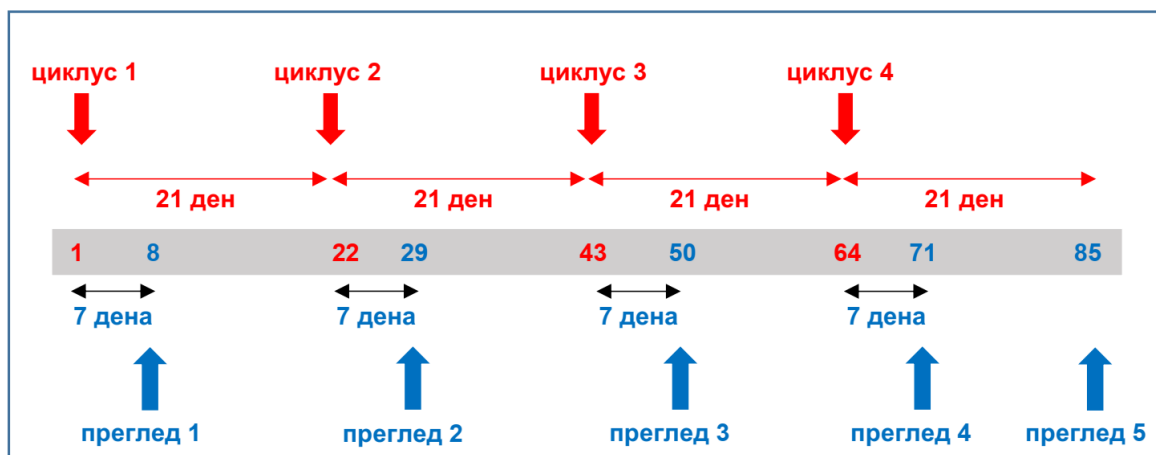
Табела 4.1. Дефиниции и градуси на токсичните ефекти и нузпојави според СТСАЕ*

Терминологија според СТСАЕ	Градус 1	Градус 2	Градус 3	Градус 4	Градус 5
Анемија	хемоглобин 100 - 120 g/L	хемоглобин 80 - 100 g/L	хемоглобин < 80 g/L	живото-загрозувачка состојба; неопходност од итна трансфузија	летален исход
Фебрилна неутропенија	-	-	неутрофили <1000/ μ L со единечна фебрилна состојба >38,3°C или подолготрајна фебрилна состојба \geq 38 °C во текот на подолго од 1 час	живото-загрозувачка состојба; неопходност од итен медицински третман	летален исход
Други специфични нарушувања на хематолимфатичниот систем (како тромбоцитопенија)	асимптоматски или благи симптоми; исклучиво клинички и дијагностички опсервации; не е неопходна медицинска интервенција	индицирани се умерени, минимални, локални или неинвазивни медицински интервенции	изразени или медицински значајни, но кои не се непосредно животозагрозувачки; потребна е хоспитализација или продолжување на постоечката хоспитализација; ограничувања во самоодржувањето на личната нега и на секојдневните активности	живото-загрозувачка состојба; неопходност од итна медицинска интервенција	летален исход
Орален мукозитис	асимптоматски или благи симптоми; не е неопходна медицинска интервенција	умерена болка или улцерации кои не го отежнуваат внесувањето на храна преку устата; индицирана е модификација на исхраната	силна болка; потешкотии при внесувањето на храна преку устата	живото-загрозувачка состојба; неопходност од итен медицински третман	летален исход
Фебрилна состојба	38,0 - 39,0 °C	>39,0 - 40,0 °C	>40,0 °C во текот на \leq 24 часа	>40,0 °C	летален исход

*Извор:

https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_8.5x11.pdf (пристапено на 19.11.2020 г.)

Контролната крвна слика и клиничкиот преглед се извршени пред почнувањето на хемотерапијата. Натомошното клиничко и лабораториско следење и регистрирање на токсичните ефекти и нузпојавите е вршено 7 дена по секоја примена доза, и тоа почнувајќи од првиот ден на започнување на хемотерапијата, како и 21 ден по завршувањето на последната доза од третманот со комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин (слика 4.1).



Слика 4.1. Графички приказ на временските интервали меѓу апликациите на хемотераписките дози и контролните клинички и лабораториски прегледи во текот на комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентките со карцином на дојката. Со црвени вертикални насочени стрелки надолу се означени временските точки секој од четирите циклуси на хемотерапија раздвоени со интервали од по 21 ден, додека со сини стрелки насочени нагоре се означени петте контролни прегледи.

При контролните клинички и лабораториски прегледи, регистрирани се и понатаму се обработувани најниските вредности (надир) на хематолошките параметри, највисоките вредности на аксиларната телесна температура и најизразениот статус на орален мукозитис регистрирани во која било од петте временски точки или меѓу нив при постоење на соодветна клиничка индикација (пријавување на појава треска од страна на пациентот или дијагностицирање на орален мукозитис, на пример).

4.4. Молекуларно-генетски анализи

Во текот на изработката на оваа докторска студија, извршени се молекуларни анализи за определување на полеморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1*, за кои, во последниве години, постојат податоци за поврзаност со појавата на токсични ефекти и нуспојави при терапијата на карциномот на дојката со циклофосфамид и доксорубицин. Од примерокот на до 3 mL венска крв со антикоагулант (динатриумова сол на етилендиамин тетраацетат) изолирана е геномска DNA со стандардната метода на изолување со натриум хлорид, екстракција со хлороформ и последователна преципитација со етанол. DNA изолатите се аликвотирани во неколку епрувети, од кои едната е чувана на +4 до 8 °C и е користена за анализи, додека останатите се чувани во банка на примероци на -18 до -20 °C.

4.4.1. Генотипизација

Регионот од соодветниот ген е амплифициран со полимеразна верижна реакција (PCR, од англ.: polymerase chain reaction) со употреба на пар олигонуклеотидни прајмери (нарачани од компанијата Thermo Fisher); термостабилна Taq-полимераза (AmpliTaq Gold, Thermo Fisher), фабрички подготвен PCR пуфер со магнезиумови јони, смеса од деоксинуклеотиди (dNTP), како и примерок на DNA од испитаникот во реакциски епрувети со тенки ѕидови. Користена е PCR-машина (GeneAmp System 9700, Perkin-Elmer) со соодветен амплификациски програм.

Табела 4.2: Податоци за олигонуклеотидните прајмери и амплификацијата

локус	поли-морфизам	секвенци на олигонуклеотидните прајмери	темп. на анилирање (C°)	ампликон (bp)	референца
<i>ABCB1</i>	rs20325282 (2677G>T/A)	FA: 5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTA-3'	57	222	Kurzawski et al., 2006
		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'			
<i>GSTP1</i>	rs1695 (A>G)	FA: 5'-TTG GTG TAG ATG AGG GAG AT-3'	60	240	Rollinson et al., 2004
		FT: 5'-TTG GTG TAG ATG AGG GAG AC-3'			
		RR: 5'-TGG AGG ACC TCC GCT GCA A-3'			

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 4.2**.

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, односно определувањето должината на електрофоретските ленти во базни парови е вршена со опцијата за анализа на едnodимензионални гелови на софтверот Image J од NIH. 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 повторните анализи целосно се совпаднаа со претходно извршените.

Определувањето на генотипот на **полиморфизмот rs20325282 во генот ABCB1, односно 2677G>T/A**, е извршено со методот на генотипизација со алелно-специфична амплификација со полимеразно верижна реакција (PCR, од англ.: Polymerase Chain Reaction). 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 (Kurzwski et al., 2006). 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 57°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.

Слично, генотипот на **полиморфизмот rs1695 во генот GSTP1**, односно транзицијата **A>G** на нуклеотидната позиција 313 во егзонот 5 од генот, која предизвикува несинонимната супституција Pе105Val на ниво на протеинскиот продукт, е определена со истиот метод, но со соодветни прајмери, како што се наведени во табелата (Rollinson et al., 2004). Користен е следниов амплификациски програм: иницијална денатурација на 94°C во текот на 2 мин., по што следат четириесет циклуси од по три фази: денатурација на 94°C во текот на 30 сек., анилирање на 60°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.

4.5. Статистичка анализа

Статистичките анализи се вршени споредувајќи ги предвидените независни варијабли за генските полиморфизми со клиничко-лабораториските зависни варијабли за типот, градусот, времетраењето, бројот на случувања и други податоци за токсичните ефекти и нузпојави во текот и непосредно по третманот со циклофосфамид и доксорубицин, кај пациентки со карцином на дојката, во однос на двата генски полиморфизми. Покрај тоа, применувани се и дескриптивни статистички методи за приказ на релевантните демографски, клинички и лабораториски податоци. Статистичките и популациско-генетските пресметки се извршени со користење на софтверските додатоци RealStatistics 2015 и GenAIEx 6.5, инсталирани на Microsoft Excel 2016.

Поврзаноста на клиничките и лабораториските податоци за токсичните ефекти и нузпојави кај пациентите со присуството на определените полиморфизми е определена со непараметрискиот Pearson-ов Chi-квадрат тест и Fisher-овиот егзактен тест, како и со Cochran–Armitage тренд-тестот. Нормалната дистрибуција на нумеричките вредности е пресметана со *Shapiro-Wilk* тестот. Параметриските вредности со нормална дистрибуција се анализирани со двонасочниот Student-ов *t*-тест, односно со Mann-Whitney U-тестот при постоење отстапувања од нормалната дистрибуција на вредностите на соодветниот параметар. Од поврзаноста на соодветен полиморфизам со определен нузеефект или друг клинички-релевантен параметар е пресметан и релативниот ризик - *risk ratio*, како и односот на шанси - *odds ratio*. Пресметките на интервалот на доверливост *CI (confidence interval)* се вршени при 95%, односно при $p < 0,05$. Добиените податоци од генотипизација на предвидените полиморфизми кај DNA примероците од секој пациент се користени и за популациско-генетски анализи. За таа цел ќе бидат определени испитуваните, наспроти очекуваните, фреквенции на алелите и генотиповите. За проценка на подобноста на испитуваната група пациенти за популациско-генетски анализи беа пресметани: Харди-Вајнберговата рамнотежа, стапката на генетски диверзитет, стапката на хетерозиготност и други статистички мерки на диверзитетот на алелите во испитуваната популација со кои се изврши проверка на избалансираноста на испитуваната популација, што е важно за веродостојноста на генетските анализи.

5. РЕЗУЛТАТИ

Студијата беше спроведена на вкупно вкупно 178 пациентки со карцином на дојката кај кои беше евалуирана застапеноста и степенот на клиничка изразеност на повеќе типови на токсични ефекти и нузпојави при комбинираната хемотерапија со циклофосамид и доксорубицин. Кај овие пациентки беше извршена и генотипизација на DNA-примероци изолирани од венска крв, по што се определи фреквенцијата на генотиповите и алелите на испитуваните полиморфизми во гените *ABCB1* и *GSTP1*.

Основната цел беше да се утврди генетската поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на токсичните ефекти и нузпојави при хемотерапијата.

Во текот на анализите, регистрирани се одредени демографски, клинички и лабораториски податоци, од кои дел, особено порелеватните за студијата, се прикажани во следниов текст.

Сите пациенти кои учествувале во студијата се од женски пол.

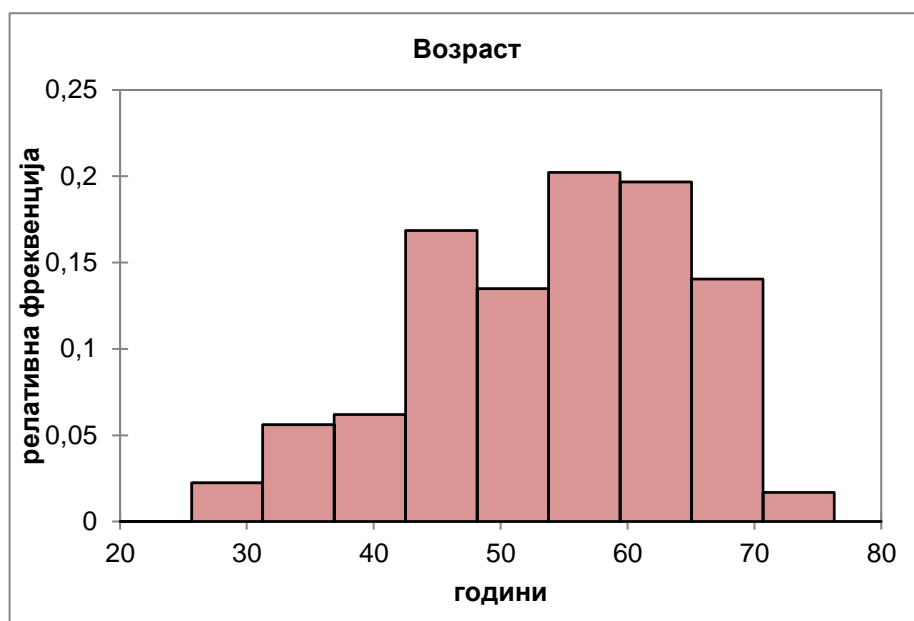
5.1. Возрасна структура на пациентките

Просечната возраст на пациентките во моментот на вклучување во студијата беше $53,85 \pm 10,59$ години, а податоците за возрасната структура се прикажани во табелата 5.1 и на графиконот 5.1.

Табела 5.1: Податоци за возраста на испитуваната група пациентки

параметри	години
просечна возраст	53,85
минимална возраст	28
максимална возраст	75
стандардна девијација (SD)	10,59

Најмладата пациентката од групата е со возраст од 28 години, а највозрасната има 75 години. Според хистограмот, очигледно е дека во оваа студија доминираат пациентките со возраст од 40 до 70 години.



Графикон 5.1: Хистограм за приказ на возрасната структура на испитуваната група пациентки

5.2. Семејна анамнеза за карцином на дојка

Според анамнестичките податоци добиени од пациентките, само кај 27 пациентки (15,17%) постои семејна историја за карцином на дојка кај потесните членови од семесјството (табела 5.2).

Табела 5.2: Податоци за семејна анамнеза за карцином на дојка

Семејна анамнеза	вредности	
	n	%
Нема	151	84,83
Има	27	15,17
Вкупно	178	100,00

5.3. Историја на пушење

Повеќе од половината на пациентките (54,49%) од целата група (n=178) изјавиле дека воопшто не консумираат тутун, а ретко, умерено или интензивно пушат останатите пациентки со карцином на дојката (табела 5.3).

Табела 5.3: Податоци за историја на пушење

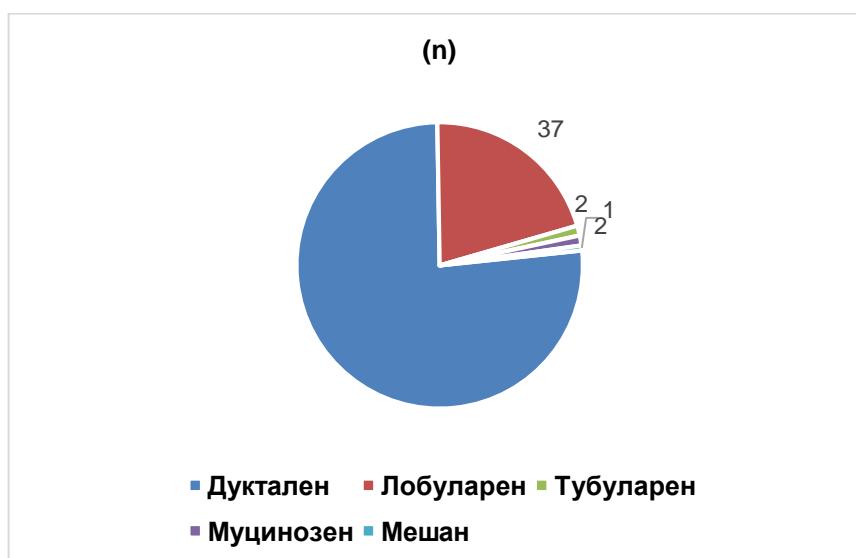
Историја на пушење	Вредности	
	n	%
Непушачи	97	54,49
Ретко	64	35,96
Умерено	15	8,43
Интензивно	2	1,12
Вкупно	178	100,00

5.4. Релевантни клиничко-патолошки податоци

Податоците за хистопатолошкиот тип на карциномот кој е идентифициран кај пациентките, како и резултатот од имунохистохемиската детекција на присуството на естроген рецептор во ткивниот примерок се прикажани во **табелата 5.4** и **графиконот 5.2**.

Табела 5.4: Хистопатолошки податоци за пациентките

Параметар	Вредности	
	n	%
Хистолошки тип		
Дуктален	136	76,40
Лобуларен	37	20,79
Тубуларен	2	1,12
Муцинозен	2	1,12
Мешан	1	0,56
Вкупно	178	100,00



Графикон 5.1: Хистолошки тип на карциномите во испитуваната група

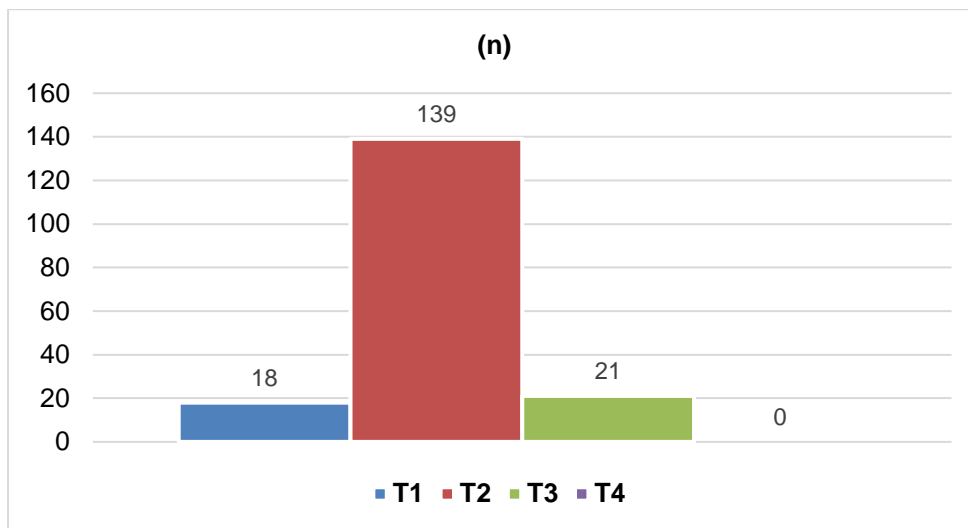
Според податоците од табелата, евидентно е дека најфреквентни се дукталниот и лобуларниот хистолошки тип на карцином на дојката, со вкупна застапеност од речиси 97% од сите 178 пациентки, додека останатите хистолошки типови се застапени со помалку од 3%.

Резултатите од pTNM-класификацијата, како и од клиничко-патолошкиот стадиум на болеста се прикажани во **табелата 5.5**, а заради поголема прегледност и во графичка форма на **графиконите 5.3-5.6**.

Табела 5.5: Приказ на случаите според pTNM-класификацијата и клиничкиот стадиум

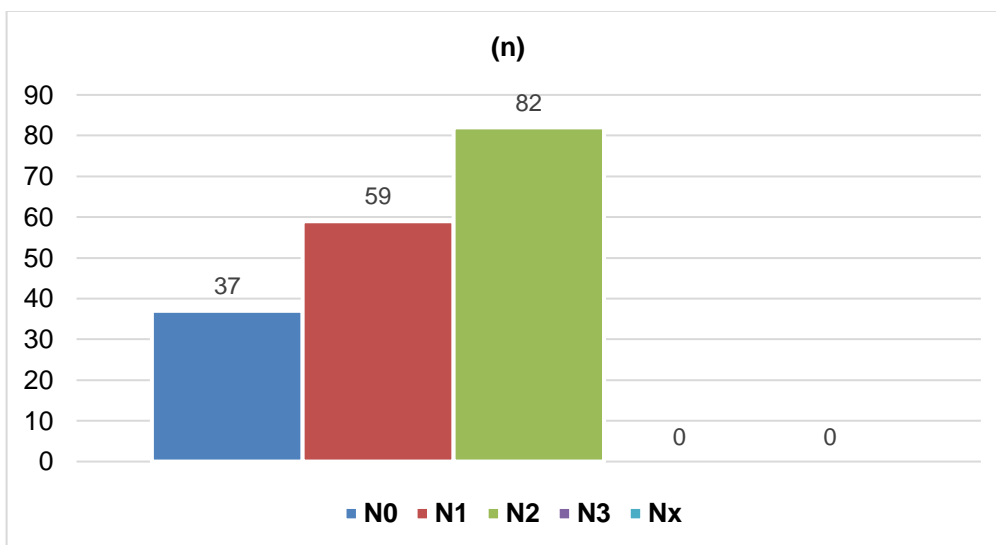
Параметар	Вредности	
	n	%
Примарен тумор - pT		
T1	18	10,11
T2	139	78,09
T3	21	11,80
T4	0	0,00
Вкупно	178	100,00
Регионални лимфни јазли - pN	n	%
N0	37	20,79
N1	59	33,15
N2	82	46,07
N3	0	0,00
Nx	0	0,00
Вкупно	178	100,00
Метастази - M	n	%
Mx	178	100,00
M1	0	0
Вкупно	178	100,00
Хистолошки градус - G	n	%
G1	14	7,87
G2	101	56,74
G3	61	34,27
Не е определен	2	1,12
Вкупно	178	100,00
Стадиум	n	%
Ia	1	0,56
IIa	40	22,47
IIb	51	28,65
IIc	0	0,00
IIIa	86	48,31
IIIb	0	0,00
IIIc	0	0,00
IV	0	0,00
Вкупно	178	100,00

Од прикажаните податоци може да се заклучи дека во испитуваната група на пациентки со карцином на дојката (n=178), примарниот тумор е класифициран како pT2 кај околу 78% од случаите (n=139), групите T1 и T3 имаат приближно еднаква застапеност (10,11% и 11,80%, соодветно), додека, нема ниту една пациентка со T4.



Графикон 5.2: Приказ на застапеноста на патолошкиот параметар pT за големината и екстензивноста на примарниот тумор

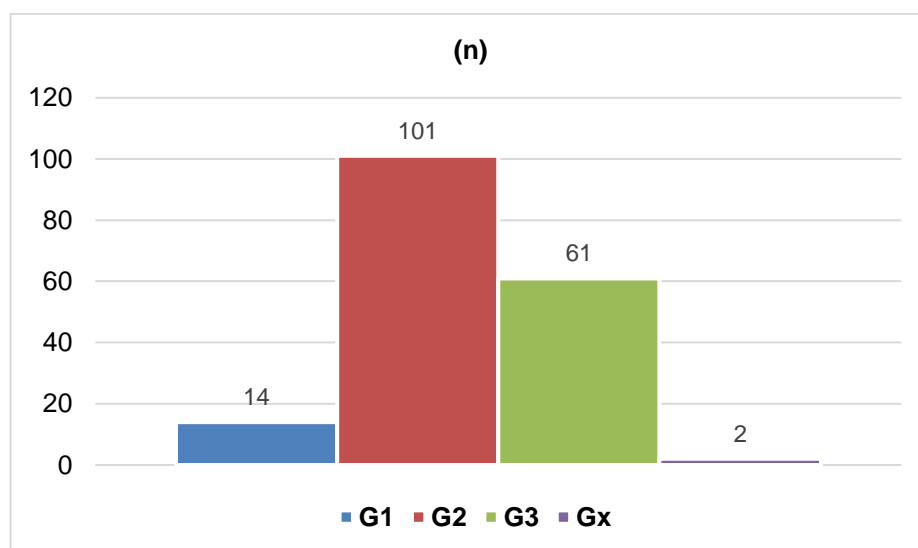
Во однос на регионалното лимфогено метастазирање, со хистолошката анализа не се идентифицирани метастатски депозити во лимфните јазли кај 37 пациентки, додека кај останатите постоел различен опсег на метастазираност.



Графикон 5.3: Приказ на застапеноста на патолошкиот параметар pN за екстензивноста на метастазирањето во регионалните лимфни јазли

Постоењето на системски метастази не е документирано ниту кај една пациентка, согласно критериумите за вклучување во, односно, исклучување од студијата.

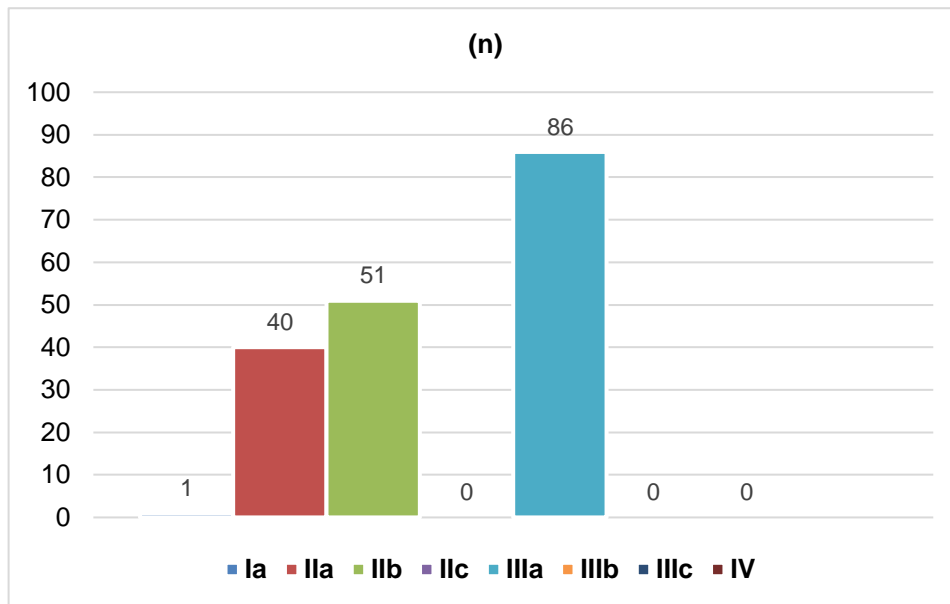
Степенот на хистолошката диференцијација на малигните клетки во примарниот тумор бил класифициран како градус 2 (умерена диференцијација) кај 101 пациентка (56,74%), додека со висок градус на малигнитет биле детектирани 61 пациентки (34,27%). Низок градус на малигнитет бил идентифициран кај само 14 пациентки (7,87%). Градусот не бил определен кај 13 пациентки (11,82%).



Графикон 5.4: Приказ на застапеноста на патолошкиот параметар G за хистолошкиот градус на диференцијација на клетките во примарниот тумор

Стадиумот, односно, клиничко-патолошката опсежност на болеста е определена кај сите 178 пациентки, а најзастапени и со приближно еднаква фреквенција се стадиумите Пб и Ша и тоа кај 51 (28,65%), односно 50 (28,09%) пациентки, соодветно. Стадиумот Па е застапен кај 40 пациентки (22,47%), а веднаш по него следи Пс кај 33 пациентки (18,54%). Најретко се застапени стадиумот Пб кај 3 пациентки (1,69%) и стадиумот Ia кај 1 пациентка (0,56%), додека ниту една пациентка од испитуваната група немала стадиум Па.

Согласно критериумите за вклучување во, односно, исклучување од студијата, ниту една пациентка немала стадиум IV.



Графикон 5.6: Приказ на застапеноста на клиничко-патолошките стадиуми на болеста

5.5. Регистрирани токсични ефекти и нузпојави во текот и непосредно по комбинираниот третман со циклофосфамид и доксорубицин

Во текот на студијата, евалуирани се вкупно 178 пациентки со карцином на дојката третирани со комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин во вкупно 4 циклуси (доза) на растојание од по 21 ден. Споредени се фреквенциите на генотиповите и на алелите на двата испитувани полиморфизми со регистрираните токсични ефекти и нузпојави од почетокот на апликацијата на првата доза, па сè до истекот на три седмици по завршувањето на последната доза од третманот, односно во текот на вкупно 12 седмици (3 месеци).

Критериумите за дефинирање на секоја од наведените состојби асоцирани со хемотерапијата се опишани детално во делот **Материјали и методи**.

Во испитуваната група на пациентки, се регистрираа и беа обработувани само податоците од следниве токсични ефекти: анемија, фебрилна состојба, фебрилна неутропенија, орален мукозитис и тромбоцитопенија.

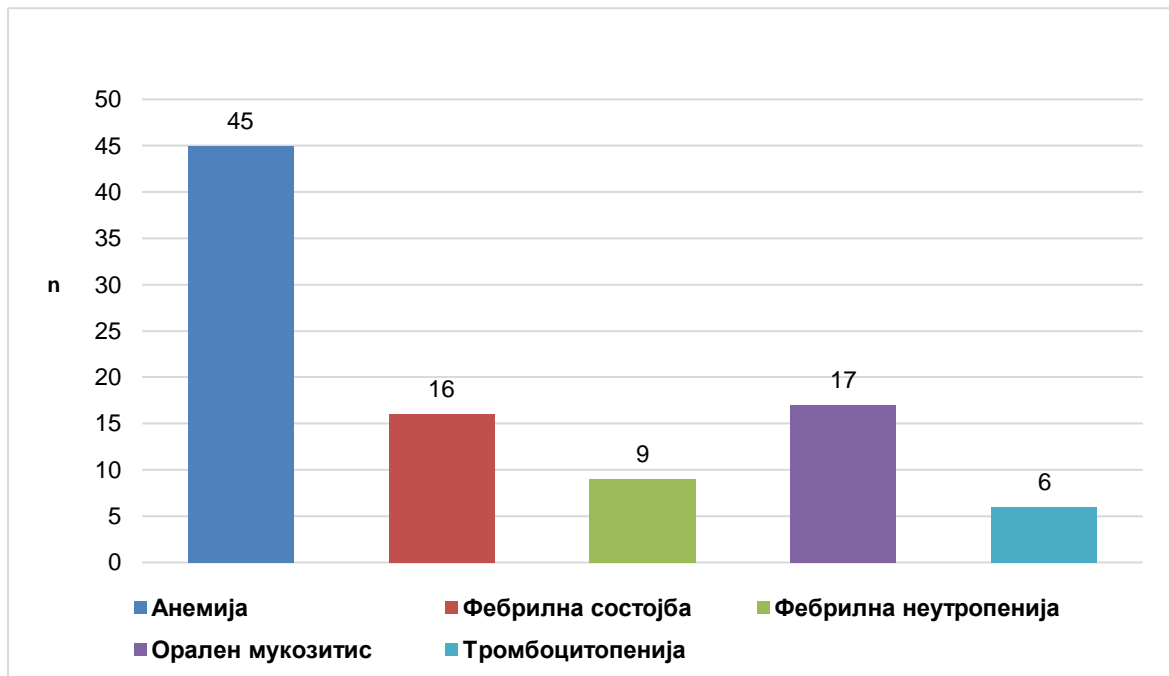
Кај ниту еден пациент во испитуваната група и во предвидениот евалуациски период не се регистрираа други типови на токсични ефекти какви што се невротоксичност, кардиотоксичност, хепатотоксичности и тн. Не се анализирани честите несакани ефекти какви што се наужејата и повраќањето.

Застапеноста на токсичните ефекти и нузпојави кај пациентките со карцином на дојката во текот и непосредно по комбинираниот третман со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во **табелата 5.6** и на **графиконот 5.7**.

Табела 5.6: Застапеност на токсичните ефекти и нузпојави кај пациентките со карцином на дојката во текот и непосредно по комбинираниот третман со циклофосфамид и доксорубицин

Токсичен ефект	n	%
Анемија	45	25,28
Фебрилна состојба	16	8,99
Фебрилна неутропенија	9	5,06
Орален мукозитис	17	9,55
Тромбоцитопенија	6	3,37

Напомена: збирот на пациенти со определен токсичен ефект или нузпојава во табелата е поголем од вкупниот број пациентки во групата поради тоа што кај некои од нив се регистрирани повеќе од еден тип на токсичен ефект или нузпојава, истовремено.



Графикон 5.7: Приказ на застапеноста на токсичните ефекти и неузпојави кај пациентките со карцином на дојката во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија

Од податоците е евидентно дека најзастапена неузпојава во испитуваната група пациентки е анемијата поврзана со хемотерапијата која е регистрирана кај 28,28%. Фебрилна состојба (според користените критериуми) биле регистрирани кај 8,99%, а фебрилната неутропенија кај 5,06% од пациентките.

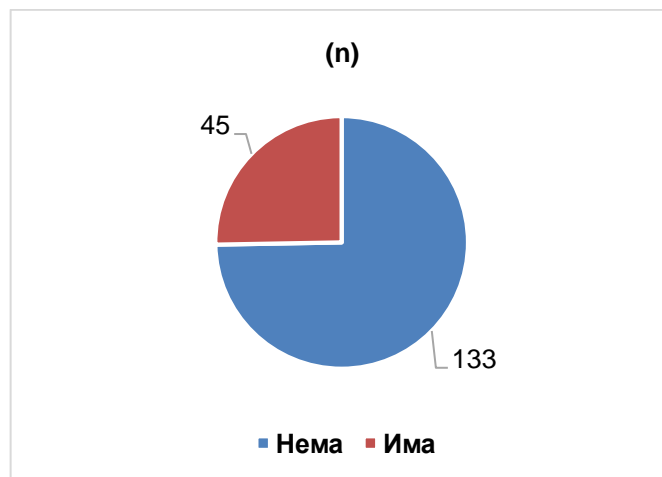
Оралниот мукозитис е идентифициран кај 9,55%, додека најретко била застапена тромбоцитопенијата која се појавила кај 6,36% од испитаниците.

Користејќи ги критериумите за според најновото достапно издание на терминологија и класификација на токсичните ефекти (Common Terminology Criteria for Adverse Events - CTCAE, v5.0) од ноември 2017 година, како и дефинирањето на анемијата поврзана со хемотерапија, регистрираните токсични ефекти и неузпојави во испитуваната група пациентки беа категоризирани само во еден градус, освен оралниот мукозитис, каде беа регистрирани 2 градуса на интензитет: 1-слаб и 2-умерен.

Притоа, орален мукозитис од градус 1 е регистриран кај 6,18%, а со градус 2 кај 3,37% од пациентките.

5.5.1. Анемија поврзана со хемотерапијата

Редукцијата на концентрацијата на хемоглобин во периферната крв за повеќе од 10 g/L во однос на вредноста пред почнување на хемотерапијата или истовременото постоење на пониски вредности од референтните за женскиот пол (<120 g/L) е користена како основен критериум за регистрирање на анемијата поврзана со хемотерапијата и е забележана кај приближно четвртина (25,28%) од пациентките (графикон 5.8).



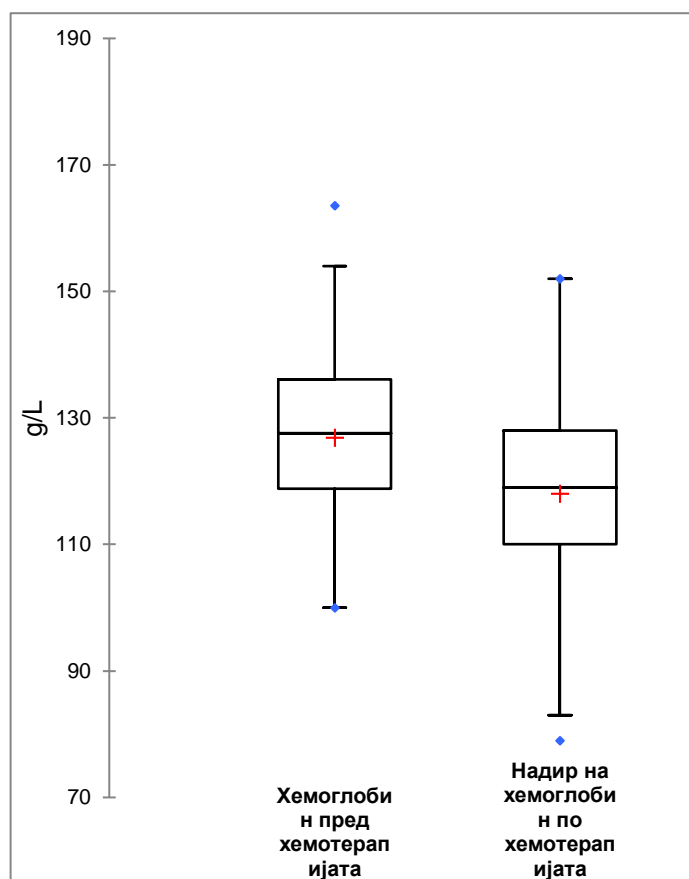
Графикон 5.8: Застапеност на анемија индуцирана од хемотерапијата

Овие квантитативни разлики во рамките на податоците од сите 178 пациентки се статистички високо сигнификантни и ($p < 0,01$) се прикажани во табелата 5.7 и графиконот 5.9.

Табела 5.7: Разлики во статистичките параметри во однос на вредностите на хемоглобин пред и во текот, односно непосредно по комбинираната хемотерапија кај пациентките со карцином на дојката

Параметар (g/L)	Хемоглобин пред хемотерапијата	Најниска вредност на хемоглобин по хемотерапијата	Wilcoxon-тест на парови варијабли *
Минимална вредност	100,00	79,00	< 0,0001
Максимална вредност	163,60	152,00	
Медијана	127,55	119,00	
Просек	126,93	118,08	
Варијанса	159,83	186,73	
Стандардна девијација	12,64	13,66	

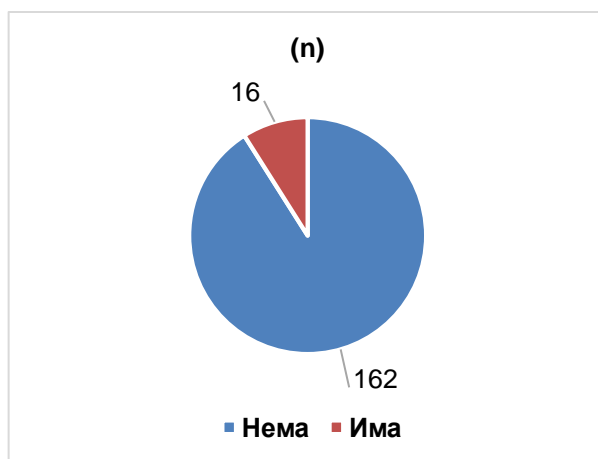
* двонасочен тест



Графикон 5.9: Приказ на разликите во вредностите на хемоглобин пред и непосредно по комбинираната хемотерапија кај пациентките со карцином на дојката

5.5.2. Фебрилна состојба

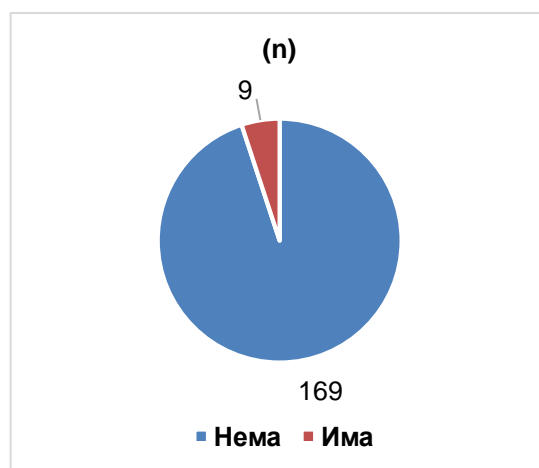
Зголемување на телесната температура кое според СТСАЕ-критериумите е дефинирано како градус 1 (38,0 - 39,0 °C) е регистрирано кај 8.99% од пациентките (графикон 5.10).



Графикон 5.10: Застапеност на фебрилната состојба

5.5.3. Фебрилна неутропенија

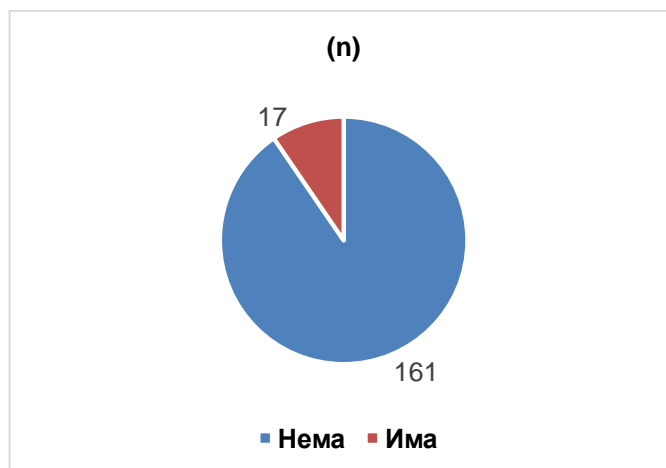
Вредноста на неутрофили $<1000/\mu\text{L}$ со единечна фебрилна состојба $>38,3^\circ\text{C}$ или подолготрајна фебрилна состојба $\geq 38^\circ\text{C}$ во текот на подолго од 1 час е дефинирано како градус 3 според СТСАЕ-критериумите (не постојат градуси 1 и 2 кај оваа верзија). Градус 3 на фебрилна неутропенија е регистриран кај 9,55% од пациентките (графикон 5.11).



Графикон 5.11: Застапеност на фебрилната состојба

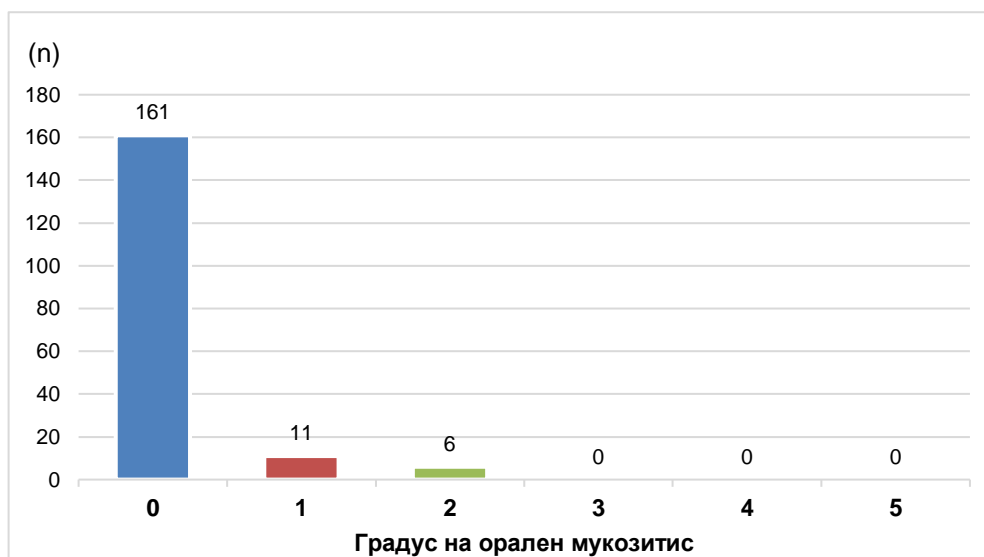
5.5.4. Орален мукозитис

Клиничките манифестации на оралниот мукозитис се регистрирани кај 9,55% од пациентките (графикон 5.12).



Графикон 5.12: Застапеност на оралниот мукозитис

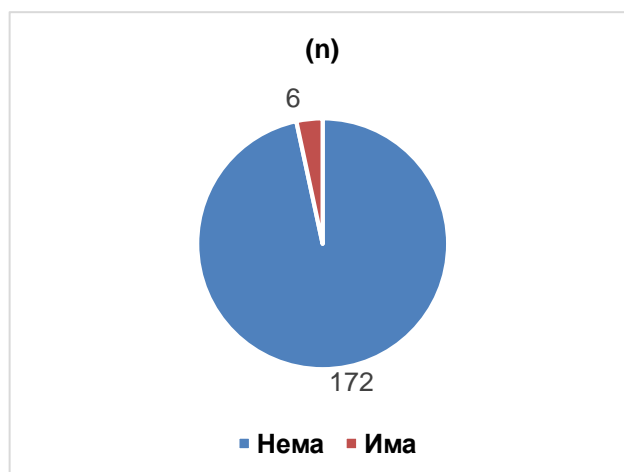
Во однос на СТСАЕ-критериумите, во испитуваната група пациентки се забележани случаи со градус 1 (асимптоматски или благи симптоми; не е неопходна медицинска интервенција) кај 6,18% и со градус 2 (умерена болка или улцерации кои не го отежнуваат внесувањето на храна преку устата при што е индицирана модификација на исхраната) кај 3,37% од пациентките. Не се забележани останатите градуси на овај токсичен ефект (**графикон 5.13**).



Графикон 5.13: Застапеност на градусите на оралниот мукозитис

5.5.5. Тромбоцитопенија

Вредноста на тромбоцитите $<100 \times 10^9/\mu\text{L}$ проследена со асимптоматски или благи симптоми и за која не е неопходна медицинска интервенција е дефинирана како градус 1 според СТСАЕ-критериумите (најблага форма на тромбоцитопенија) и е регистрирана кај 3,37% од пациентките (**графикон 5.14**).

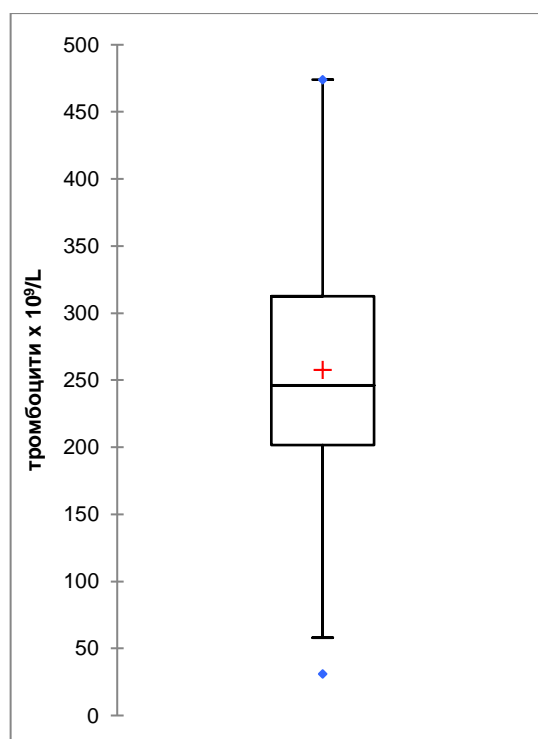


Графикон 5.14: Застапеност на тромбоцитопенијата

Статистичките параметри во однос на најниските измерени вредности на бројот на тромбоцити во периферната крв во текот или непосредно по хемотерапијата се прикажани во **табелата 5.8** и **графиконот 5.15**.

Табела 5.8: Статистички параметри во однос на надирот на тромбоцити во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија кај пациентките со карцином на дојката

Параметар	Надир на тромбоцити
минимална вредност	31,000
максимална вредност	474,000
медијана	246,000
просек	257,556
варијанса	6081,921
стандардна девијација	77,987



Графикон 5.15: Приказ на опсегот на најниските вредности на надирот на тромбоцити во текот и непосредно по комбинираната хемотерапија кај пациентките со карцином на дојката

5.6. Резултати од генотипизацијата

Во оваа студија, определен е генотипот на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* кај DNA примероците од вкупно 178 пациентки со карцином на дојката кои се третирани адјувантно со циклофосфамид и доксорубицин.

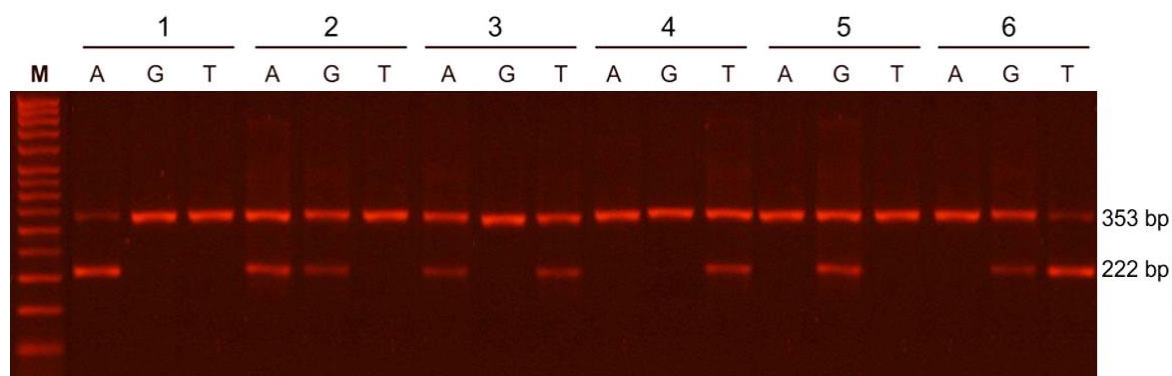
5.6.1. Детекција на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*

При определувањето на генотипот на овој генски полиморфизам, 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 и три типа на хетерозиготни генотипови (GA, GT и AT), како и две хомозиготни варијантни (полиморфни) форми (AA и TT).

Сите овие комбинации на генотипови се земени предвид при статистичките пресметки и популациско-генетските анализи.

Пример за електрофоретотографските резултати од анализата се прикажани на сликата 5.1.

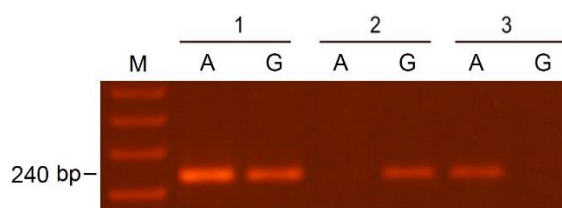


Слика 5.1: Електрофоретотограм од алелно-специфичната PCR-анализа за генотипизирање на rs20325282 во генот *ABCB1* (2677 G>C/T). 1-6: примероци од различни пациенти. М: фабрички маркер со DNA-фрагменти со позната должина изразена во базни парови (bp). Ознаки А, G и Т: алел А, G и Т, соодветно. Во секоја PCR-епрувета користена е и внатрешна контрола со која се амплифицира лента за верификација на амплификацијата и има должина од 353 bp. Алелно-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 2, 6 и 3, соодветно. Хомозиготните варијантни генотипови (AA и TT) се на позициите 1 и 4, соодветно.

5.6.2. Детекција на полиморфизмот rs1695 и во генот *GSTP1*

Амплификација со алелно-специфичната PCR, е вршена во по две реакции, со различни олигонуклеотидни прајмери специфични за секој од алелите посебно: С и Т. Генотиповите на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* беа определени во анализираните DNA примероци од сите 178 пациентки вклучени во студијата. Со оглед на единечниот локус на овој ген, постојат три можни генотипови: AA (неваријантен, див генотип), AG (хетерозиготен генотип) и GG (варијантен генотип). Во локусот постојат само два типа алели: А (див тип алел) и G (варијантен, односно минорен алел).

Пример за електрофоретографските резултати од анализата се прикажани на сликата 5.2.



Слика 5.2: На овој електрофоретограм, прикажани се резултатите на примероци од 3 пациентки. За секој примерок направени се по 2 амплификации, засебно: за алелот со А и алелот G на позицијата 313, па оттаму секој примерок е анализиран во две последователни позиции на агарозниот гел. Кај примерокот од пациентката на позицијата 1, присутни се две електрофоретски ленти и за алелот А и за G, односно примерокот е хетерозиготен за овој полиморфизам. На позицијата 2, присутна е амплификација само кај алелот G, па овој пациент е хомозиготен на варијантниот генотип (GG). На позицијата 3, амплификацијата е присутна само во PCR-епруветата со прајмери специфични за алелот А, односно пациентката е хомозиготна за дивиот генотип (AA).

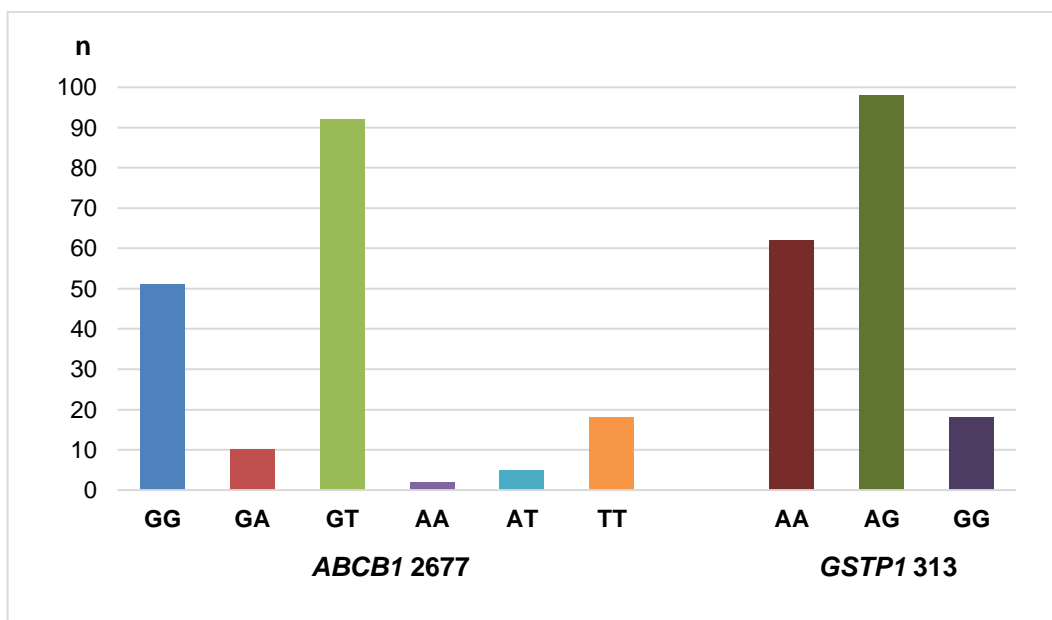
5.6.3. Фреквенции на генотиповите и алелите на испитуваните полиморфизми кај пациентите

Фреквенциите на генотиповите на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* и на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* кај 178 пациентки со карцином на дојката кои се третирани адјувантно со циклофосфамид и доксорубицин, се прикажани во табелата 5.9 и на графиконот 5.16.

Табела 5.9: Дистрибуција на генотиповите на rs20325282 во генот *ABCB1* и на rs1695 во генот *GSTP1* кај целата популација на пациенти

Полиморфизам	Генотип	застапеност на генотипот		
		n	%	f
<i>ABCB1</i> rs20325282 (2677 G>T/A)	GG	51	28,65	0,287
	GA	10	5,62	0,056
	GT	92	51,69	0,517
	AA	2	1,12	0,011
	AT	5	2,81	0,028
	TT	18	10,11	0,101
	Вкупно	178	100,00	1,000
<i>GSTP1</i> rs1695 (313 A>G)	AA	62	34,83	0,391
	AG	98	55,06	0,527
	GG	18	10,11	0,082
	Вкупно	178	100,00	1,000

Вредностите во табелата се изразени во број на индивидуи (n), процентуална застапеност (%) и фреквенција на генотипот (f).



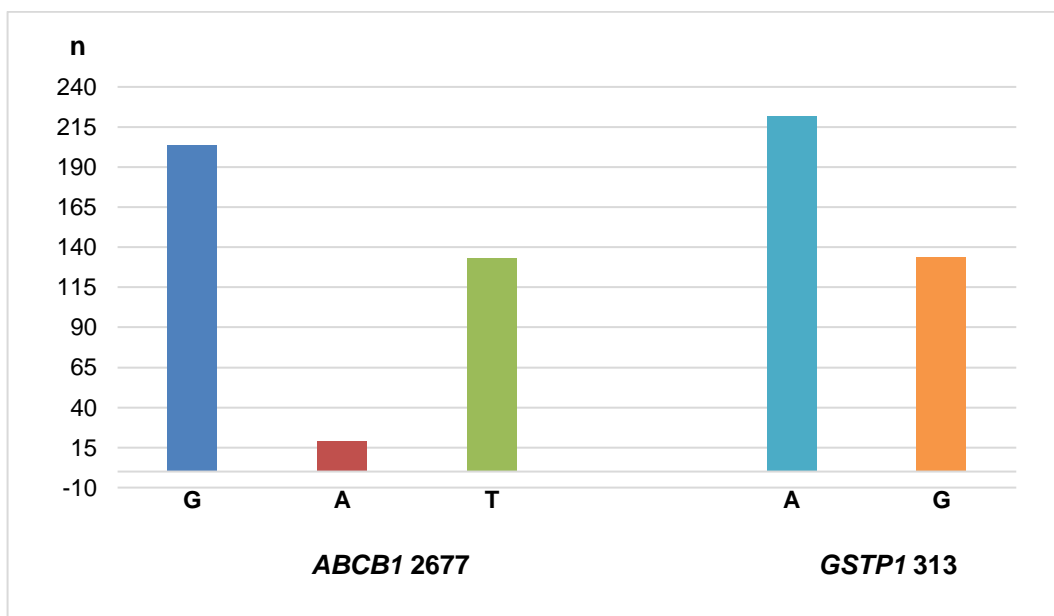
Графикон 5.16: Застапеност на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и на rs1695 во генот *GSTP1* кај целата испитувана популација

На табелата 5.10 и на графиконот 5.17 се прикажани фреквенциите на алелите на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* на rs1695, како и во генот *GSTP1* кај сите 178 пациентки со карцином на дојката.

Табела 5.10: Дистрибуција на алелите на rs20325282 во генот *ABCB1* и на rs1695 во генот *GSTP1* кај целата популација на пациенти

Полиморфизам	Алел	Застапеност на алелот		
		n	%	f
<i>ABCB1</i> rs20325282 (2677 G>T/A)	G	204	57,30	0,573
	A	19	5,34	0,053
	T	133	37,36	0,374
	Вкупно	356	100,00	1,000
<i>GSTP1</i> rs1695 (313 A>G)	A	222	62,36	0,624
	G	134	37,64	0,376
	Вкупно	356	100,00	1,000

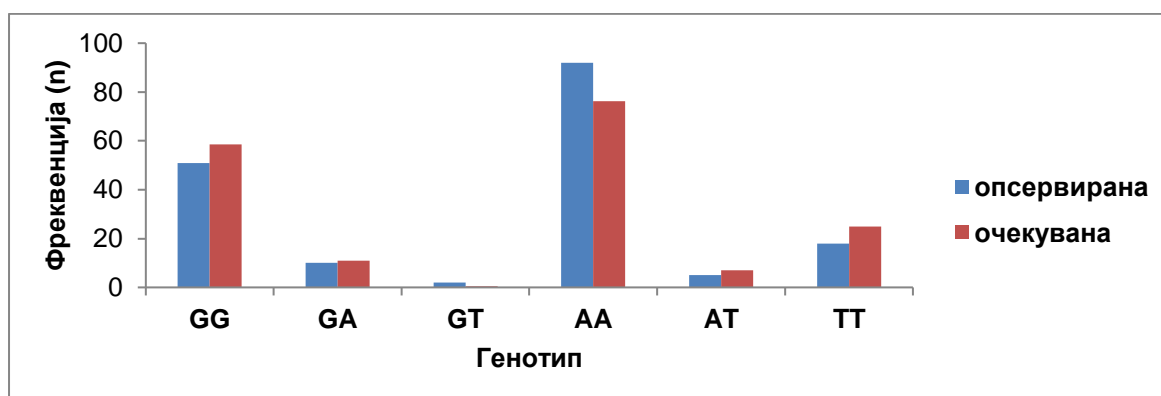
Вредностите во табелата се изразени во број на индивидуи (n), процентуална застапеност (%) и фреквенција на алелот (f).



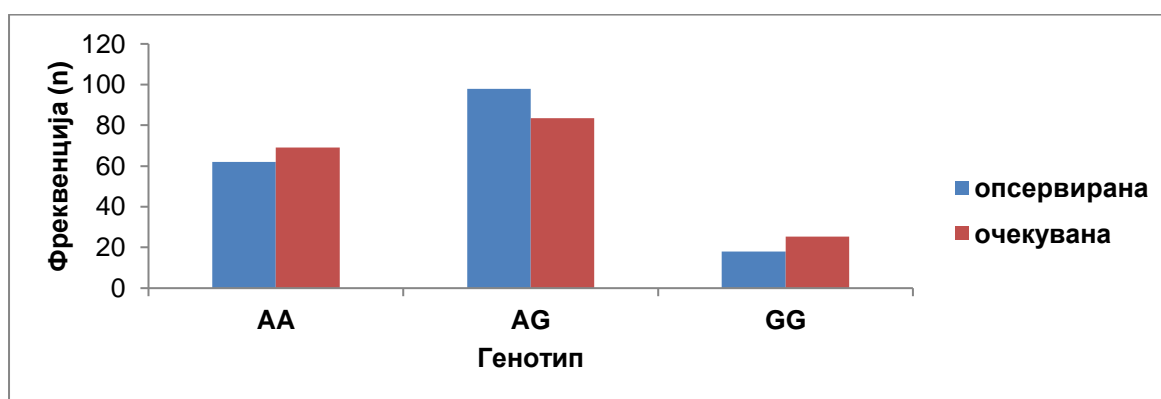
Графикон 5.17: Застапеност на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и на rs1695 во генот *GSTP1* кај целата испитувана популација

5.6.4. Популациско-генетска анализа

За определување на Харди-Вајнбергова рамнотежа беше направена споредба на опсервираните, наспроти очекуваните, фреквенции на генотиповите за секој од двата полиморфизма, поединечно (табела 5.11 и графикони 5.18 и 5.19). Вредностите на p поголеми од 0,05 според χ^2 -тестот укажуваат на тоа дека се во соогласност со Харди-Вајнберговиот принцип на рамнотежа за испитуваниот полиморфизам.



Графикон 5.18: Опсервирана наспроти очекувана фреквенција на генотиповите на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* кај целата испитувана популација заради определување на Харди-Вајнберговата рамнотежа



Графикон 5.19: Опсервирана наспроти очекувана фреквенција на генотиповите на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* кај целата испитувана популација заради определување на Харди-Вајнберговата рамнотежа

Табела 5.11: Популациско-генетска анализа во однос на испитуваните полиморфизми кај целата група на пациенти

полиморфизам	гено-тип	фреквенција на генотипови		тест за HWE		хетерозиготност			број на алели		Shannon-ов информативен индекс <i>I</i>
		опс.	очек.	χ^2	<i>p</i>	опс.	очек.	<i>F</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	
<i>ABCB1</i> rs2032528 2 (2677 G>T/A)	GG	51	58,449	5,374	0,146	0,601	0,529	-0,136	3,000	2,124	0,843
	GA	10	10,888								
	AA	2	0,507								
	GT	92	76,213								
	AT	5	7,098								
	TT	18	24,844								
<i>GSTP1</i> rs1695 (313 A>G)	AA	62	69,219	3,029	0,082	0,551	0,469	-0,173	2,000	1,885	0,662
	AG	98	83,562								
	GG	18	25,219								
пресметки за двата полиморфизма		просечни вредности				0,576	0,499	-0,154	2,500	2,004	0,753
		стандардна грешка (SE)				0,025	0,030	0,018	0,500	0,120	0,091

Кратенки: HWE = Hardy Weinberg-ова рамнотежа; опс. = опсервирани; очек. = очекувани; *F* = фиксациски индекс; *Na* = број на алели во локусот; *Ne* = пресметан број на ефективни алели во локусот.

Анализите покажаа дека популацијата е во Харди-Вајнбергова рамнотежа во однос на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* кај популацијата од 178 пациентки со карцином на дојката ($p > 0,05$).

Од прикажаните пресметки, може да се заклучи дека е евидентен умерен вишок на хетерозиготност во однос на полиморфизмот на генот *GSTP1*, а негативна вредност на фиксацискиот индекс *F* е идентифицирана кај испитуваната популација во однос на двата генски полиморфизми.

5.7. Генетски анализи за определување на поврзаноста на испитуваните полиморфизми со појавата на токсични ефекти и нузпојави

Во оваа студија, определен е генотипот на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* кај DNA примероците од вкупно 178 пациентки со карцином на дојката кои се третирани со комбинирана адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин во вкупно 4 циклуси (доза) на растојание од по 21 ден. Споредени се фреквенциите на генотиповите и на алелите на двата испитувани полиморфизми со регистрираните токсични ефекти и нузпојави од почетокот на апликацијата на првата доза, па сè до истекот на три седмици по завршувањето на последната доза од третманот, односно во текот на вкупно 12 седмици (3 месеци).

Поврзаноста на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и на rs1695 во генот *GSTP1* со појавата на токсичните ефекти и нузпојави е анализирана со повеќе статистички и генетско-статистички анализи. За почеток, користени се Fisher-овиот егзактен тест за определување на статистичката значајност на постоењето на поврзаност на секој од двата полиморфизми, поединечно, со секој од регистрираните токсични ефекти и нузпојави, исто така, поединечно. Потоа се користени следниве генетски модели за статистичка анализа на поврзаноста меѓу полиморфизмите и токсичните ефекти: генотипски, доминантен, рецесивен, хетерозиготен, супердоминантен, алелен и адитивен. Заради просторот, во натамошниот текст се прикажани само резултатите од соодветниот генетски модел каде постоела статистички највисока значајност при поврзаноста на полиморфизмите со токсичните ефекти. Генетско-статистичките пресметки се вршени со монолокусна анализа (за секој од двата полиморфизми, поединечно), како и со билокусна анализа (за двата полиморфизма, истовремено), со користење на Chi-квадрат тестот (χ^2) и Cochran-Armitage тестот за ординална поврзаност, и двата при двонасочна конфигурација. Пресметани се и статистичкиот однос на шанси (*odds ratio*), како и односот на ризик (*risk ratio*), двата при интервал на доверливост од 95% (95% CI).

Во текот на овие анализи, карактеристичните комбинации на фреквенциите на генотиповите и/или алелите, од една страна, се споредувани со појавата на токсичните ефекти и нузпојави, од друга страна.

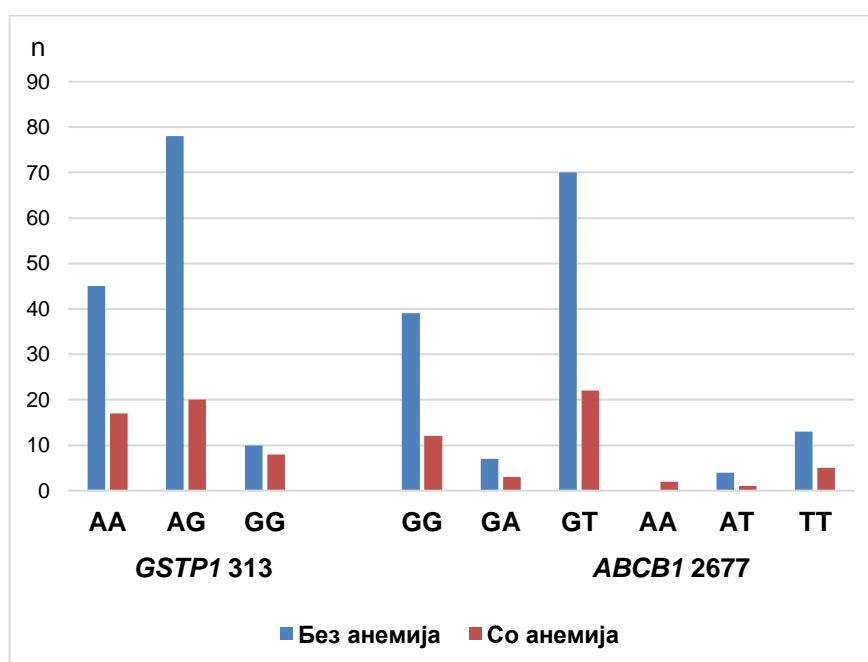
Споредени се генетските параметри со следниве токсични ефекти и нузпојави: анемија, фебрилна состојба, фебрилна неутропенија, орален мукозитис и тромбоцитопенија.

5.7.1. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на анемија предизвикана од хемотерапијата

Разликите меѓу фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на анемија асоцирана со хемотерапијата со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана на табелата 5.12 и на графиконот 5.20.

Табела 5.12: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на анемија поврзана со хемотерапијата

Полиморфизам	Генотип	Без анемија		Со анемија		Fisher-ов егзактен тест
		n	%	n	%	<i>p</i>
<i>ABCB1</i> 2677	GG	39	29,32	12	26,67	0,352
	GA	7	5,26	3	6,67	
	GT	70	52,63	22	48,89	
	AA	0	0,00	2	4,44	
	AT	4	3,01	1	2,22	
	TT	13	9,77	5	11,11	
	Вкупно	133	100,00	45	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	45	33,83	17	37,78	0,088
	AG	78	58,65	20	44,44	
	GG	10	7,52	8	17,78	
	Вкупно	133	100,00	45	100,00	



Графикон 5.20: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на анемија поврзана со хемотерапијата

Од прикажаните податоци е забележливо постоењето на разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на анемија поврзана со хемотерапијата, но истите не се статистички значајни ниту при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p > 0,05$), ниту кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$). Користените критериуми за регистрираниот токсичен ефект, односно полиморфизам, се како што е опишано претходно во главата: **Материјал и методи**.

Генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на анемија кај пациентките се вршени со **генотипскиот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, односно со **рецесивниот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, а резултатите се прикажани во **табелата 5.13**.

Табела 5.13: Поврзаност на анемијата поврзана со хемотерапијата со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без анемија		Со анемија		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>ABCB1</i> 2677	GG	39	29,32	12	26,67	0,712	0,700	референтен генотип	референтен генотип
	GA + GT	77	57,89	25	55,56			1,055 (0,48 - 2,32)	1,042 (0,57 - 1,90)
	AA + AT + TT	17	12,78	8	17,78			1,529 (0,53 - 4,42)	1,360 (0,64 - 2,90)
	Вкупно	133	100,00	45	100,00				
<i>GSTP1</i> 313	GG	10	7,52	8	17,78	3,893	0,048	2,659 (0,98 - 7,23)	1,922 (1,07 - 3,46)
	AA + AG	123	92,48	37	82,22				
	Вкупно	133	100,00	45	100,00				

Кратенки: *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Како што е забележливо од прикажаните резултати, пациентките кои се носители на хомозиготниот варијантен генотип GG на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, имаат околу 2,6 пати повисока веројатност од појава на клинички значајна анемија при третманот со наведените хемотерапевтици, соодветно, во однос на пациентките носители на дивниот генотип AA или на хетерозиготите AG ($p < 0,05$). Пресметаниот ризик (*relative risk*) за појава на анемија кај пациентките со генотипот

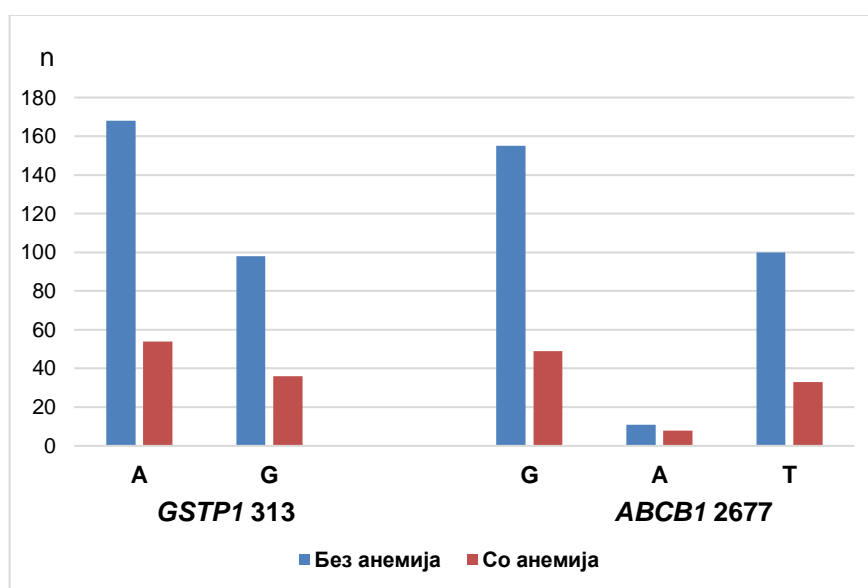
GG е повисок за приближно 2 пати во однос на тие кои се носители на дивiotот генотип AA или на хетерозиготниот AG.

Кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, резултатите од генотипскиот модел на генетската анализа покажуваат дека нема статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенциите на хомозиготните носители на дивiotот генотип GG, хетерозиготите GA, GT и AT или носителите на варијантните хомозиготни генотипови AA и TT ($p > 0,05$).

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на анемија кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосамид и доксорубицин е прикажана во **табелата 5.14** и на **графиконот 5.21**.

Табела 5.14: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на анемија поврзана со хемотерапијата

Полиморфизам	Алел	Без анемија		Со анемија		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>ABCB1</i> 2677	G	155	58,27	49	54,44	0,222
	A	11	4,14	8	8,89	
	T	100	37,59	33	36,67	
	Вкупно	266	100,00	90	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	168	63,16	54	60,00	0,616
	G	98	36,84	36	40,00	
	Вкупно	266	100,00	90	100,00	



Графикон 5.21: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на анемија поврзана со хемотерапијата

Забележливи се разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на анемија. Овие разлики не се статистички сигнификантни како кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, така и кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p>0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на анемија кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.15**.

Табела 5.15: Поврзаност на анемијата поврзана со хемотерапијата со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без анемија		Со анемија		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	98	36,84	36	40,00	0,286	0,593	1,143 (0,70 - 1,87)	1,104 (0,77 - 1,59)
	A	168	63,16	54	60,00				
	Вкупно	266	100,00	90	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	111	41,73	41	45,56	0,402	0,526	1,168 (0,72 - 1,89)	1,123 (0,79 - 1,61)
	G	155	58,27	49	54,44				
	Вкупно	266	100,00	90	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, нема сигнификантна разлика во дистрибуцијата на дивiot и на варијантниот алел A и G, соодветно, во однос на појавата на клинички значајна анемија при третманот со наведените хемотерапететици ($p>0,05$). Слично, не е најдена статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенциите на носителите на дивiot алел G, ниту на варијантните алели A и T меѓу групите на пациенти со и без појава на анемија ($p>0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на анемија.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochrane-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.16**.

Табела 5.16: Поврзаност на анемијата поврзана со хемотерапијата со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијантни алели	Без анемија		Со анемија		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	45	33,83	17	37,78	0,588	0,557
	1 G	78	58,65	20	44,44		
	2 G	10	7,52	8	17,78		
	Вкупно	133	100,00	45	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	39	29,32	12	26,67	0,697	0,486
	1 A / T	77	57,89	25	55,56		
	2 A / T	17	12,78	8	17,78		
	Вкупно	133	100,00	45	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот Cochran-Armitage тест. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Евидентно е отсуство на статистички значајна поврзаност на анемијата со линеарното зголемување на присуството на варијантниот алел G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* или со двете варијантни алели на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

Билокусна анализа

За да се проценат генетската поврзаност на двата испитувани полиморфизми: полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено, со клиничката регистрација на анемијата поврзана со хемотерапијата, анализирани се генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките.

Пресметките се вршени за шест пара комбинации составени од по еден од генотиповите од хомозиготниот див тип, хетерозиготниот и хомозиготниот варијантен генотип за полиморфизмот во генот *GSTP1*, од една страна, како и по еден од хомозиготните генотипови на генот *ABCB1*. Поради ниските вредности на фреквенциите на генотипови од генот *ABCB1*, групирани се комбинациите на сите останати генотипови (GA + GT + AA + AT + TT).

Во првата група на генетски анализи, споредбата на сите шест комбинации на генотипски фреквенции од двата гена, истовремено, е извршена групно со двонасочниот Mantel-Haenszel-овиот тест за стратификација, и тоа со 3 стратуми и со

пресметка на егзактната p -вредност, а пресметан е и заедничкиот веројатносен индекс на односот на шанси OR (табела 5.17).

Табела 5.17: Разлики во фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* при појавата на анемија поврзана со хемотерапијата со билокусниот модел

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип на <i>ABCB1</i> 2677	Без анемија	Со анемија	Билокусна анализа		
				Mantel-Haenszel	p	OR (95% CI)
		n	n			
AA	GG	12	5	0,043	0,423	1,173 (0,52 - 2,78)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	33	12			
AG	GG	24	4			
AG	GA + GT + AA + AT + TT	54	16			
GG	GG	3	3			
GG	GA + GT + AA + AT + TT	7	5			
Вкупно		133	45			

Кратенки: OR =odds ratio (однос на шанси); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Користен е двонасочен Mantel-Haenszel-ов тест. Критична вредност на тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Резултатите од анализите покажуваат дека не постои статистички значајна поврзаност на кој било од 6-те пара комбинации на генотипски фреквенции од двата гена ($p>0,05$). Иако вредноста на OR е повисока од 1, истата е нерелевантна поради отсуството на статистичка сигнификантност, односно вредноста $p>0,05$.

Во втората група анализи, споредувани се комбинациите на генотипски фреквенции од двата гена меѓу бројот на пациенти без и со анемија поврзана со хемотерапијата, користејќи го двонасочниот χ^2 -тест, како и пресметување на односот на шанси и на ризик, за секој од трите стратуми на комбинации на генотипови од двата гена, како што е прикажано во табелата 5.18.

Како што може да се забележи од прикажаните податоци, поради малиот број на групи индивидуи со некои од генотипските комбинации, пресметки биле невозможни со посочените статистички методи.

Отсуството на испитаници во некоја од комбинациските групи не дозволи пресметување на односот на шанси и на ризик.

Табела 5.18: Поврзаност на анемијата поврзана со хемотерапијата со фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Гено-тип <i>GSTP1</i> 313	Генотип <i>ABCB1</i> 2677	Без анемија		Со анемија		χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
AA	GG	12	26,67	5	29,41	0,047	0,829	0,873 (0,25 - 3,00)	0,907 (0,38 - 2,19)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	33	73,33	12	70,59				
Вкупно		45	100,00	17	100,00	100,00			
AG	GG	24	30,77	4	20,00	0,905	0,342	1,778 (0,54 - 5,88)	1,600 (0,59 - 4,37)
AG	GA + GT + AA + AT + TT	54	69,23	16	80,00				
Вкупно		78	100,00	20	100,00	100,00			
GG	GG	3	30,00	3	37,50	0,113	0,737	0,714 (0,10 - 5,12)	0,833 (0,29 - 2,37)
GG	GA + GT + AA + AT + TT	7	70,00	5	62,50				
Вкупно		10	100,00	8	100,00	100,00			

Кратенки: н.п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Покрај тоа, постоењето на зголемени или намалени вредности на односот на шанси и/или на ризик во останатите комбинациски групи не беше статистички значајна ($p>0,05$).

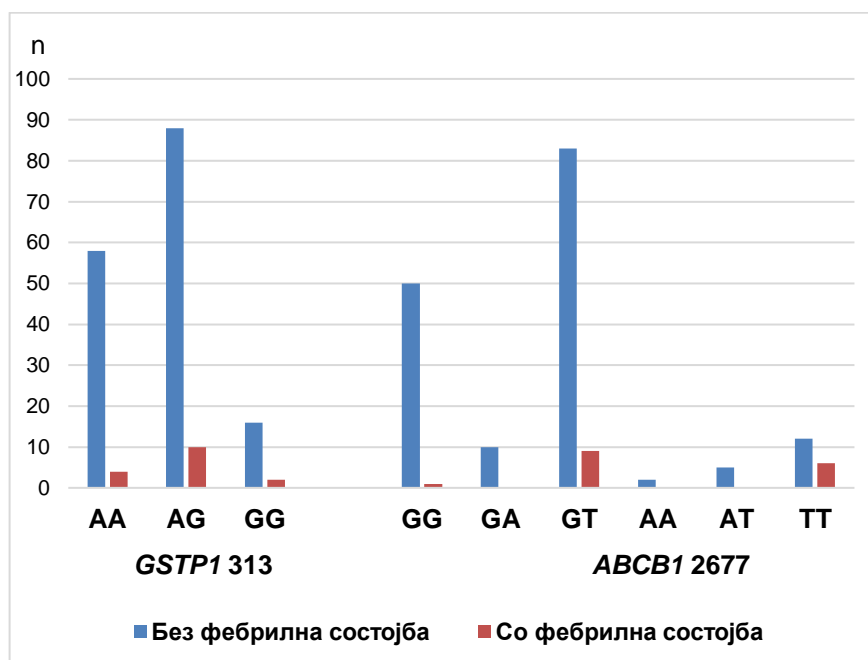
Оттаму, појавата на анемија поврзана со хемотерапијата во испитуваната група на пациентки, не е поврзана со билокусен ефект на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено.

5.7.2. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на фебрилна состојба

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубин е прикажана на **табелата 5.19** и на **графиконот 5.22**.

Табела 5.19: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба

Полиморфизам	Генотип	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		Fisher-ов егзактен тест
		n	%	n	%	<i>p</i>
<i>ABCB1</i> 2677	GG	50	30,86	1	6,25	1,000
	GA	10	6,17	0	0,00	
	GT	83	51,23	9	56,25	
	AA	2	1,23	0	0,00	
	AT	5	3,09	0	0,00	
	TT	12	7,41	6	37,50	
	Вкупно	162	100,00	16	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	35,80	4	25,00	0,627
	AG	88	54,32	10	62,50	
	GG	16	9,88	2	12,50	
	Вкупно	162	100,00	16	100,00	



Графикон 5.22: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба

Од резултатите можат да се забележат разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на фебрилна состојба. Но, тие разлики не се статистички значајни, како при споредбата кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, така и при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*. Користените критериуми за регистрираниот токсичен ефект, односно полиморфизам, се како што е опишано претходно во главата: **Материјал и методи**.

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на фебрилна состојба кај пациентките кои се вршени со **генотипскиот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и со **рецесивниот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, се прикажани во табелата 5.20.

Табела 5.20: Поврзаност на фебрилната состојба со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	35,80	4	25,00	0,764	0,683	реф.	реф.
	AG	88	54,32	10	62,50			1,648 (0,49 - 5,50)	1,582 (0,52 - 4,82)
	GG	16	9,88	2	12,50			1,813 (0,30 - 10,81)	1,722 (0,34 - 8,65)
	Вкупно	162	100,00	16	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	AA + AT + TT	19	11,73	6	37,50	8,011	0,005	4,516 (1,47 - 13,83)	3,672 (1,46 - 9,21)
	GG + GA + GT	143	88,27	10	62,50				
	Вкупно	162	100,00	16	100,00				

Кратенки: *n. p.* = непресметливо; *OR=odds ratio* (однос на шанси); *RR=risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

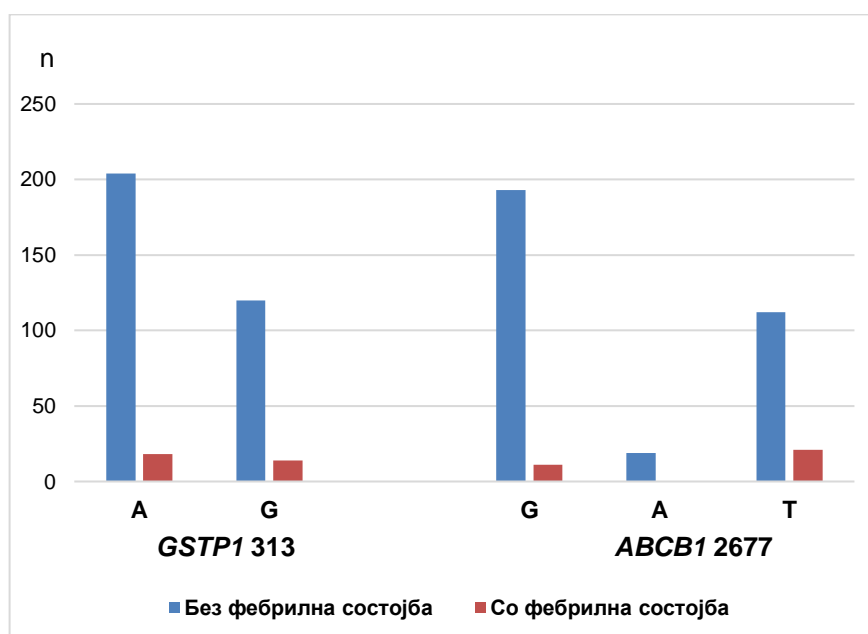
Кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, носителите на генотиповите AA, AT или TT имаат околу 4,5 пати повисока веројатност, односно приближно 3,7 пати повисок ризик, за појава на фебрилна состојба во текот на третманот со наведените хемотерапетици, соодветно, во однос на пациентките носители на генотиповите GG, GA или GT ($p < 0,01$). Спротивно на тоа, разликите во фреквенциите на генотиповите на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* не се статистички значајни во однос на појавата на клинички значајна фебрилна состојба при третманот со

наведените хемотерапевтици ($p > 0,05$). Вредностите на пресметаниот однос на шанси и на ризик за појава на фебрилна состојба кај пациентките покажуваат отстапувања од 1, но немаат статистичка сигнификантност, па се нерелевантни за споредба.

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубин е прикажана во **табелата 5.21** и на **графиконот 5.23**.

Табела 5.21: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба

Полиморфизам	Алел	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		Fisher-ов егзактен тест
		n	%	n	%	<i>p</i>
<i>ABCB1</i> 2677	G	193	59,57	11	34,38	0,003
	A	19	5,86	0	0,00	
	T	112	34,57	21	65,63	
	Вкупно	324	100,00	32	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	204	62,96	18	56,25	0,452
	G	120	37,04	14	43,75	
	Вкупно	324	100,00	32	100,00	



Графикон 5.23: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба

Забележливо е дека и покрај присутните разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на фебрилна состојба, овие разлики се статистички несигнификантни ($p > 0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на фебрилна состојба кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.22**.

Табела 5.22: Поврзаност на фебрилната состојба со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	120	37,04	14	43,75	0,559	0,455	1,322 (0,63 - 2,75)	1,289 (0,66 - 2,50)
	A	204	62,96	18	56,25				
	Вкупно	324	100,00	32	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	131	40,43	21	65,63	7,555	0,006	2,813 (1,31 - 6,03)	2,562 (1,27 - 5,15)
	G	193	59,57	11	34,38				
	Вкупно	324	100,00	32	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, носителите на варијантните алели (A или T) имаат околу 2,8 пати повисока веројатност, односно приближно 2,5 пати повисок ризик, за појава на фебрилна состојба во текот на третманот со наведените хемотерапевтици, соодветно, во однос на пациентките носители на дивниот алел G ($p < 0,01$). Спротивно на тоа, кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, не е најдена статистички значајна поврзаност на присуството на варијантниот алел G, наспроти дивниот тип на алел A со фебрилната состојба ($p > 0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на фебрилна состојба.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochran-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.23**.

Табела 5.23: Поврзаност на фебрилната состојба со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијатни алели	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	58	35,80	4	25,00	0,822	0,411
	1 G	88	54,32	10	62,50		
	2 G	16	9,88	2	12,50		
	Вкупно	162	100,00	16	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	50	30,86	1	6,25	3,019	0,003
	1 A / T	93	57,41	9	56,25		
	2 A / T	19	11,73	6	37,50		
	Вкупно	162	100,00	16	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот Cochran-Armitage тест. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Постои статистички високо значајна поврзаност ($p < 0,01$) на фебрилната состојба со линеарното зголемување на присуството на варијантните алели (A или T) кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*. Од прикажаните вредности произлегува дека генетската поврзаност на фебрилната состојба расте со бројот на наведените алели: 0 A/T < 1 A/T < 2 A/T. Таквата поврзаност не е најдена кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p > 0,05$).

Билокусна анализа

За проценка на генетската поврзаност на двата испитувани полиморфизми, rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено, со клиничката регистрација на фебрилната состојба, анализирани се генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките.

Пресметките се вршени за шест пара комбинации составени од по еден од генотиповите од хомозиготниот див тип, хетерозиготниот и хомозиготниот варијантен генотип за полиморфизмот во генот *GSTP1*, од една страна, како и по еден од хомозиготните генотипови на генот *ABCB1*. Поради ниските вредности на фреквенциите на генотипови од генот *ABCB1*, групирани се комбинациите на сите останати генотипови (GA + GT + AA + AT + TT).

Во првата група на генетски анализи, споредбата на сите шест комбинации на генотипски фреквенци од двата гена, истовремено, е извршена групно со двонасочниот Mantel-Haenszel-овиот тест за стратификација, и тоа со 3 стратуми и со пресметка на егзактната p -вредност, а пресметан е и заедничкиот веројатносен индекс на односот на шанси OR (табела 5.24).

Табела 5.24: Разлики во фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* при појавата на фебрилна состојба со билокусниот модел

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип на <i>ABCB1</i> 2677	Без фебрилна состојба	Со фебрилна состојба	Билокусна анализа		
		n	n	Mantel-Haenszel	p	OR (95% CI)
AA	GG	17	0	3,217	0,027	6,817 (0,98 - 288,02)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	41	4			
AG	GG	27	1			
AG	GA + GT + AA + AT + TT	61	9			
GG	GG	6	0			
GG	GA + GT + AA + AT + TT	10	2			
Вкупно		162	16			

Кратенки: OR =odds ratio (однос на шанси); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Користен е двонасочен Mantel-Haenszel-ов тест. Критична вредност на тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Резултатите од анализите покажуваат дека постои статистички сигнификантна разлика во фреквенциите на 6-те пара комбинации на наведените генотипови од двата испитувани полиморфизми ($p < 0,05$). Вредноста на OR покажува дека овие разлики ја зголемуваат веројатноста за појава на фебрилна состојба за речиси 7 пати во однос на сите останати комбинации на генотипови од испитуваните генски полиморфизми.

Во втората група анализи, споредувани се комбинациите на генотипски фреквенци од двата гена меѓу бројот на пациенти без и со фебрилна состојба, користејќи го двонасочниот χ^2 -тест, како и пресметување на односот на шанси и на ризик, за секој од трите стратуми на комбинации на генотипови од двата гена, како што е прикажано во табелата 5.25.

Како што може да се забележи од прикажаните податоци, поради целосно отсуство на индивидуи кај некои од генотипските комбинации, пресметки биле невозможни со посочените статистички методи.

Слично, иако постои гранична сигнификантна разлика во дистрибуцијата од првиот стратум на комбинации на генотиповите од двата гена меѓу пациентките без и со фебрилна состојба, отсуството на испитаници во некоја од комбинациските групи не дозволи пресметување на односот на шанси и на ризик.

Табела 5.25: Поврзаност на фебрилната состојба со фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCBI* и rs1695 во генот *GSTP1*

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип <i>ABCBI</i> 2677	Без фебрилна состојба		Со фебрилна состојба		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
AA	GG	17	29,31	0	0,00	1,615	0,204	н.п.	н.п.
AA	GA + GT + AA + AT + TT	41	70,69	4	100,00				
Вкупно		58	100,00	4	100,00				
AG	GG	27	30,68	1	10,00	1,882	0,170	3,984 (0,48 - 33,03)	3,600 (0,48 - 27,11)
AG	GA + GT + AA + AT + TT	61	69,32	9	90,00				
Вкупно		88	100,00	10	100,00				
GG	GG	6	37,50	0	0,00	1,125	0,289	н.п.	н.п.
GG	GA + GT + AA + AT + TT	10	62,50	2	100,00				
Вкупно		16	100,00	2	100,00				

Кратенки: н.п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Покрај тоа, постоењето на зголемени вредности на односот на шанси и/или на ризик во останатите комбинациски групи не беше статистички значајна ($p>0,05$).

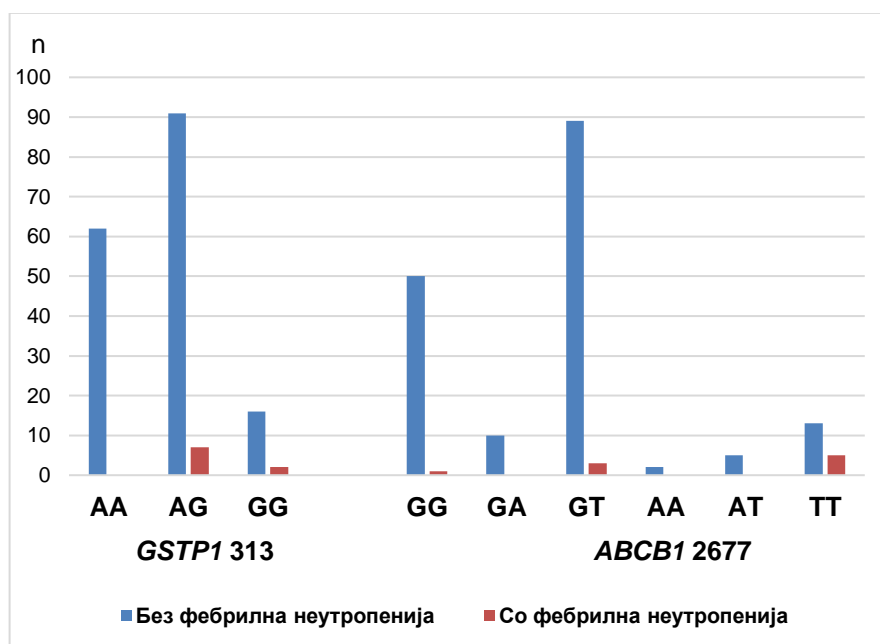
Оттаму, појавата на фебрилна состојба во испитуваната група на пациентки, не е поврзана со јасен билокусен ефект на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCBI*, истовремено.

5.7.3. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на фебрилна неутропенија

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубин е прикажана на **табелата 5.18** и на **графиконот 5.24**.

Табела 5.18: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија

Полиморфизам	Генотип	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		Fisher-ов егзактен тест
		n	%	n	%	<i>p</i>
<i>ABCB1</i> 2677	GG	50	29,59	1	11,11	1,000
	GA	10	5,92	0	0,00	
	GT	89	52,66	3	33,33	
	AA	2	1,18	0	0,00	
	AT	5	2,96	0	0,00	
	TT	13	7,69	5	55,56	
	Вкупно	169	100,00	9	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	62	36,69	0	0,00	0,025
	AG	91	53,85	7	77,78	
	GG	16	9,47	2	22,22	
	Вкупно	169	100,00	9	100,00	



Графикон 5.24: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија

Разликите се статистички значајни при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p < 0,05$), но поради малиот број на испитаници во поединечните подгрупи, не можат да се пресметаат вредностите на односите на шанси и на ризик. Не се најдени статистички сигнификантни разлики кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на фебрилна неутропенија кај пациентките кои се вршени со **доминантниот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, како и со **рецесивниот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, се прикажани во **табелата 5.19**.

Табела 5.19: Поврзаност на фебрилната неутропенија со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	AG + GG	107	63,31	9	100,00	5,067	0,024	н.п.	н.п.
	AA	62	36,69	0	0,00				
	Вкупно	169	100,00	9	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	AA + AT + TT	20	11,83	5	55,56	13,530	0,0002	9,313 (2,31 - 37,58)	7,650 (2,20 - 26,57)
	GG + GA + GT	149	88,17	4	44,44				
	Вкупно	169	100,00	9	100,00				

Кратенки: н. п. = непресметливо; OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

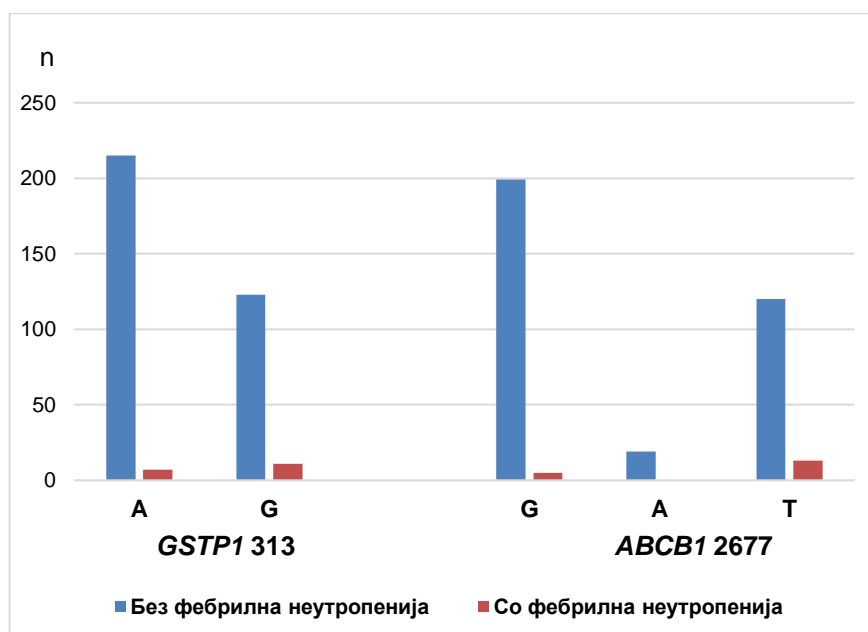
Како што е забележливо од прикажаните резултати, фреквенциите на хомозиготниот варијантниот генотип GG, како и хетерозиготите AG од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, се значајно различни во однос на застапеноста на фебрилната неутропенија во споредба со дивниот генотип AA од овој полиморфизам ($p < 0,05$), но поради малиот број на испитаници во подгрупите, не можеше да се пресметаат односите на шанси и на ризик. Од друга страна, носителите на генотиповите AA, AT или TT од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат повеќе од 9 пати повисока веројатност, односно повеќе од 7,6 пати повисок ризик (*relative risk*) од појава на фебрилна неутропенија при третманот со наведените

хемотерапевтици во однос на пациентките носители на генотиповите GG, GA или GT, при што оваа разлика е статистички високо сигнификантна ($p < 0,01$).

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во **табелата 5.20** и на **графиконот 5.25**.

Табела 5.20: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија

Полиморфизам	Алел	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		Fisher-ов егзактен тест p
		n	%	n	%	
<i>ABCB1</i> 2677	G	199	58,88	5	27,78	0,010
	A	19	5,62	0	0,00	
	T	120	35,50	13	72,22	
	Вкупно	338	100,00	18	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	215	63,61	7	38,89	0,045
	G	123	36,39	11	61,11	
	Вкупно	338	100,00	18	100,00	



Графикон 5.25: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија

Забележливо е дека и регистрираните разлики во фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на фебрилна неутропенија, се статистички сигнификантни ($p < 0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на фебрилна неутропенија кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.21**.

Табела 5.21: Поврзаност на фебрилната неутропенија со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	123	36,39	11	61,11	4,449	0,035	2,747 (1,04 - 7,27)	2,603 (1,03 - 6,55)
	A	215	63,61	7	38,89				
	Вкупно	338	100,00	18	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	139	41,12	13	72,22	6,755	0,009	3,722 (1,30 - 10,68)	3,489 (1,27 - 9,58)
	G	199	58,88	5	27,78				
	Вкупно	338	100,00	18	100,00				

Кратенки: *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, носителите на варијантните алели (A или T) имаат околу 3,7 пати повисока веројатност, односно приближно 3,5 пати повисок ризик, за појава на фебрилна неутропенија во текот на третманот со наведените хемотерапетици, соодветно, во однос на пациентките носители на дивниот алел G ($p < 0,01$). Кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, носителите на варијантниот алел G имаат приближно 2,7 пати повисока веројатност, односно приближно 2,6 пати повисок ризик, за фебрилна неутропенија при третманот со наведените хемотерапетици, во однос на пациентките носители на дивниот алел A ($p < 0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на фебрилна неутропенија.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochran-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.22**.

Табела 5.22: Поврзаност на фебрилната неутропенија со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијатни алели	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	62	36,69	0	0,00	2,319	0,020
	1 G	91	53,85	7	77,78		
	2 G	16	9,47	2	22,22		
	Вкупно	169	100,00	9	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	50	29,59	1	11,11	2,855	0,004
	1 A / T	99	58,58	3	33,33		
	2 A / T	20	11,83	5	55,56		
	Вкупно	169	100,00	9	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот Cochran-Armitage тест. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Постои статистички високо значајна поврзаност ($p < 0,01$) на фебрилната неутропенија со линеарното зголемување на присуството на варијантните алели (A или T) кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*. Од прикажаните вредности произлегува дека генетската поврзаност на фебрилната неутропенија расте со бројот на наведените алели: $0 A/T < 1 A/T < 2 A/T$. Значајна поврзаност е најдена и кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, каде постои линеарна зависност од присуството на варијантниот алел G ($p < 0,05$).

Блокусна анализа

За проценка на генетската поврзаност на двата испитувани полиморфизми, rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено, со клиничката регистрација на фебрилната неутропенија, анализирани се генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките.

Пресметките се вршени за шест пара комбинации составени од по еден од генотиповите од хомозиготниот див тип, хетерозиготниот и хомозиготниот варијантен генотип за полиморфизмот во генот *GSTP1*, од една страна, како и по еден од хомозиготните генотипови на генот *ABCB1*. Поради ниските вредности на фреквенциите на генотипови од генот *ABCB1*, групирани се комбинациите на сите останати генотипови (GA + GT + AA + AT + TT).

Во првата група на генетски анализи, споредбата на сите шест комбинации на генотипски фреквенци од двата гена, истовремено, е извршена групно со двонасочниот Mantel-Haenszel-овиот тест за стратификација, и тоа со 3 стратуми и со пресметка на егзактната p -вредност, а пресметан е и заедничкиот веројатносен индекс на односот на шанси OR (табела 5.23).

Табела 5.23: Разлики во фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* при појавата на фебрилна неутропенија со билокусниот модел

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип на <i>ABCB1</i> 2677	Без фебрилна неутропенија	Со фебрилна неутропенија	Билокусна анализа		
		а	б	Mantel-Haenszel	p	OR (95% CI)
		n	n			
AA	GG	17	0	0,774	0,193	3,552 (0,45 - 163,75)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	45	0			
AG	GG	27	1			
AG	GA + GT + AA + AT + TT	64	6			
GG	GG	6	0			
GG	GA + GT + AA + AT + TT	10	2			
Вкупно		169	9			

Кратенки: OR =odds ratio (однос на шанси); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Користен е двонасочен Mantel-Haenszel-ов тест. Критична вредност на тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Резултатите од анализите покажуваат дека не постои статистички сигнификантна разлика во фреквенциите на 6-те пара комбинации на наведените генотипови од двата испитувани полиморфизми и покрај пресметаната вредност на OR ($p>0,05$).

Во втората група анализи, споредувани се комбинациите на генотипски фреквенци од двата гена меѓу бројот на пациенти без и со фебрилна неутропенија, користејќи го двонасочниот χ^2 -тест, како и пресметување на односот на шанси и на ризик, за секој од трите стратуми на комбинации на генотипови од двата гена, како што е прикажано во табелата 5.24.

Како што може да се забележи од прикажаните податоци, поради целосно отсуство на индивидуи кај некои од генотипските комбинации, пресметки биле невозможни со посочените статистички методи.

Слично, иако постои гранична сигнификантна разлика во дистрибуцијата од првиот стратум на комбинации на генотиповите од двата гена меѓу пациентките без и со фебрилна неутропенија, отсуството на испитаници во некоја од комбинациските подгрупи не дозволи пресметување на односот на шанси и на ризик.

Табела 5.24: Поврзаност на фебрилната неутропенија со фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Гено-тип <i>GSTP1</i> 313	Генотип <i>ABCB1</i> 2677	Без фебрилна неутропенија		Со фебрилна неутропенија		χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
AA	GG	17	27,42	0	0,00	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
AA	GA + GT + AA + AT + TT	45	72,58	0	0,00				
Вкупно		62	100,00	0	0,00				
AG	GG	27	29,67	1	14,29	0,754	0,385	2,531 (0,29 - 22,04)	2,400 (0,30 - 19,04)
AG	GA + GT + AA + AT + TT	64	70,33	6	85,71				
Вкупно		91	100,00	7	100,00				
GG	GG	6	37,50	0	0,00	1,125	0,289	н.п.	н.п.
GG	GA + GT + AA + AT + TT	10	62,50	2	100,00				
Вкупно		16	100,00	2	100,00				

Кратенки: н.п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Покрај тоа, постоењето на зголемени вредности на односот на шанси и/или на ризик во останатите комбинациски групи не беше статистички значајна ($p>0,05$).

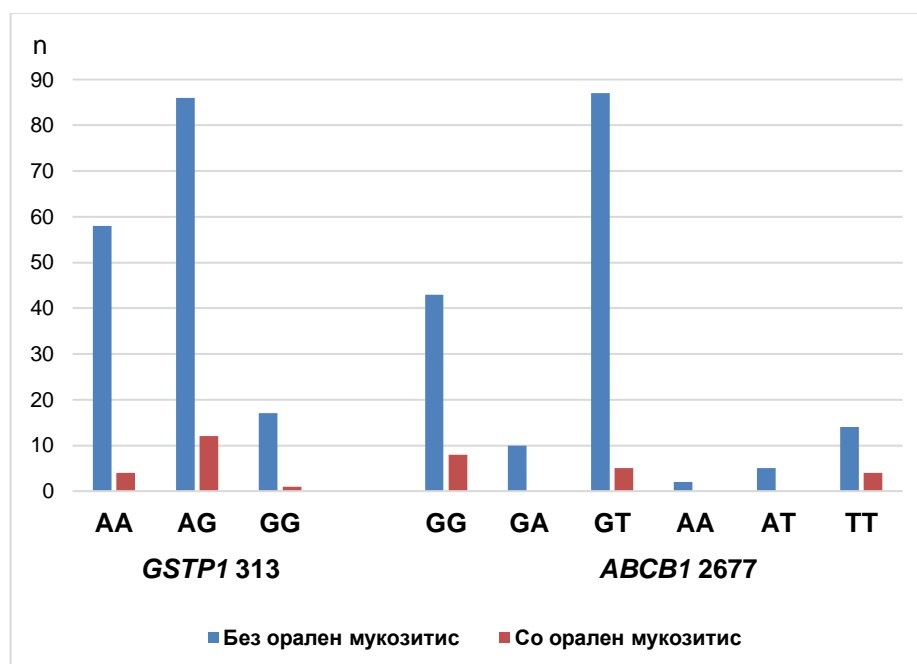
Оттаму, појавата на фебрилна неутропенија во испитуваната група на пациентки, не е поврзана со билокусен ефект на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено.

5.7.4. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на орален мукозитис

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубин е прикажана на **табелата 5.25** и на **графиконот 5.26**.

Табела 5.25: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>ABCB1</i> 2677	GG	43	26,71	8	47,06	1,000
	GA	10	6,21	0	0,00	
	GT	87	54,04	5	29,41	
	AA	2	1,24	0	0,00	
	AT	5	3,11	0	0,00	
	TT	14	8,70	4	23,53	
	Вкупно	161	100,00	17	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	36,02	4	23,53	0,503
	AG	86	53,42	12	70,59	
	GG	17	10,56	1	5,88	
	Вкупно	161	100,00	17	100,00	



Графикон 5.26: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис

Иако се забележуваат разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на орален мукозитис, тие разлики не се статистички значајни, како при споредбата кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, така и при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p>0,05$). Користените критериуми за регистрираниот токсичен ефект, односно полиморфизам, се опишани претходно во главата: **Материјал и методи**.

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на орален мукозитис кај пациентките кои се вршени со **генотипскиот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и со **супердоминантниот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, се прикажани во **табелата 5.26**.

Табела 5.26: Поврзаност на оралниот мукозитис со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	36,02	4	23,53	1,845	0,397	реф.	реф.
	AG	86	53,42	12	70,59			2,023 (0,62 - 6,58)	1,898 (0,64 - 5,62)
	GG	17	10,56	1	5,88			0,853 (0,09 - 8,15)	0,861 (0,10 - 7,23)
	Вкупно	161	100,00	17	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	GA + GT	97	60,25	5	29,41	5,976	0,015	0,275 (0,09 - 0,82)	0,310 (0,11 - 0,84)
	GG + AA + AT + TT	64	39,75	12	70,59				
	Вкупно	161	100,00	17	100,00				

Кратенки: *n. p.* = непресметливо; *OR=odds ratio* (однос на шанси); *RR=risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

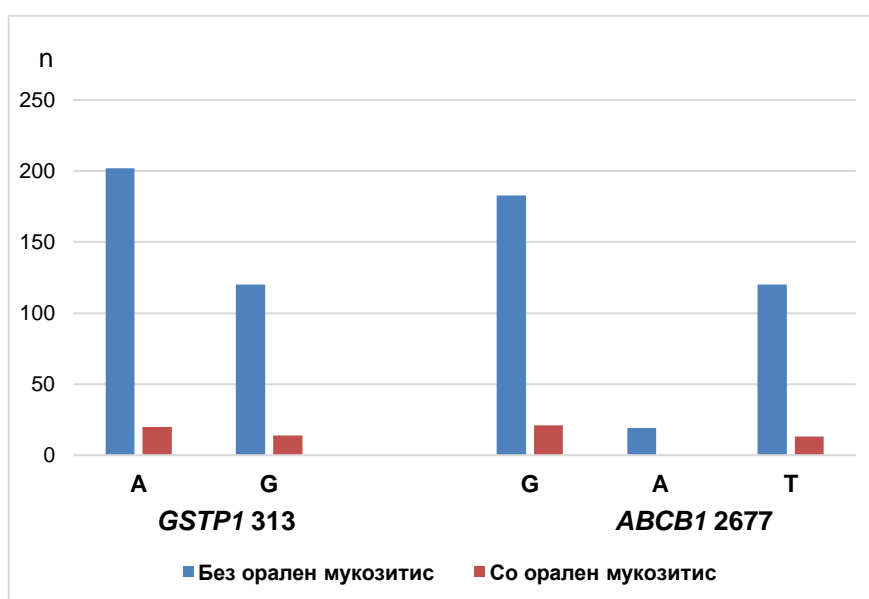
Од табелата е евидентно дека носителите на генотиповите GA или GT на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат 0,275 пати помали шанси да развијат орален мукозитис во однос на носителите на генотиповите GG, AA, AT или TT, при што разликите се сигнификантни ($p<0,05$). Поинаку формулирано, произлегува дека намалувањето на шансите изнесува ($1-0,275=0,725$) односно овие носители имаат 72,5% пониска веројатност за орален мукозитис. Пресметаните вредности на релативниот ризик се 0,31 пати (односно 31,0%) или намалување на

ризикот за 69% (100%-31%=71%). За разлика од тоа, споредените групи на фреквенции на испитуваните генотипови од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* не покажуваат статистички значајни разлики во однос на појавата на клинички значаен орален мукозитис при третманот со наведените хемотерапевтици ($p>0,05$).

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во **табелата 5.27** и на **графиконот 5.27**.

Табела 5.27: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис

Полиморфизам	Алел	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		Fisher-ов егзактен тест p
		п	%	п	%	
<i>ABCB1</i> 2677	G	189	56,59	15	68,18	0,444
	A	19	5,69	0	0,00	
	T	126	37,72	7	31,82	
	Вкупно	334	100,00	22	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	202	62,73	20	58,82	0,711
	G	120	37,27	14	41,18	
	Вкупно	322	100,00	34	100,00	



Графикон 5.27: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис

Евидентно е дека и покрај присутните разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на орален мукозитис, овие разлики се статистички несигнификантни ($p > 0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.28**.

Табела 5.28: Поврзаност на оралниот мукозитис со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	120	37,27	14	41,18	0,200	0,655	1,178 (0,57 - 2,42)	1,160 (0,61 - 2,22)
	A	202	62,73	20	58,82				
	Вкупно	322	100,00	34	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	139	43,17	13	38,24	0,306	0,580	0,815 (0,39 - 1,68)	0,831 (0,43 - 1,61)
	G	183	56,83	21	61,76				
	Вкупно	322	100,00	34	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Не се регистрирани статистички значајни разлики во дистрибуцијата на фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми меѓу пациентките во однос на појавата на орален мукозитис ($p > 0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на орален мукозитис.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochrane-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.29**.

Табела 5.29: Поврзаност на оралниот мукозитис со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијантни алели	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	42	39,62	1	25,00	0,196	0,845
	1 G	55	51,89	3	75,00		
	2 G	9	8,49	0	0,00		
	Вкупно	106	100,00	4	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	32	30,19	1	25,00	0,275	0,783
	1 A / T	59	55,66	3	75,00		
	2 A / T	15	14,15	0	0,00		
	Вкупно	106	100,00	4	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот тест Cochran-Armitage. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Евидентно е дека и при ваквата генетска анализа, не постои статистички значајна поврзаност на оралниот мукозитис со линерното зголемување на присуството на варијантниот алел G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, ниту на двете варијантни алели на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

Билокусна анализа

За да се процени генетската поврзаност на двата испитувани полиморфизми, rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено, со клиничката регистрација на оралниот мукозитис, анализирани се генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките.

Пресметките се вршени за шест пара комбинации составени од по еден од генотиповите од хомозиготниот див тип, хетерозиготниот и хомозиготниот варијантен генотип за полиморфизмот во генот *GSTP1*, од една страна, како и по еден од хомозиготните генотипови на генот *ABCB1*. Поради ниските вредности на фреквенциите на генотипови од генот *ABCB1*, групирани се комбинациите на сите останати генотипови (GA + GT + AA + AT + TT).

Во првата група на генетски анализи, споредбата на сите шест комбинации на генотипски фреквенции од двата гена, истовремено, е извршена групно со двонасочниот Mantel-Haenszel-овиот тест за стратификација, и тоа со 3 стратуми и со пресметка на егзактната p -вредност, а пресметан е и заедничкиот веројатносен индекс на односот на шанси *OR* (табела 5.30).

Табела 5.30: Разлики во фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* при појавата на орален мукозитис со билокусниот модел

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип на <i>ABCB1</i> 2677	Без орален мукозитис	Со орален мукозитис	Билокусна анализа		
				Mantel-Haenszel	<i>p</i>	OR (95% CI)
		n	n			
AA	GG	14	3	2,215	1,000	0,410 (0,13 - 1,31)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	44	1			
AG	GG	24	4			
AG	GA + GT + AA + AT + TT	62	8			
GG	GG	5	1			
GG	GA + GT + AA + AT + TT	12	0			
Вкупно		161	17			

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Користен е двонасочен Mantel-Haenszel-ов тест. Критична вредност на тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Резултатите од анализите покажуваат дека не постои статистички значајна поврзаност на кој било од 6-те пара комбинации на генотипски фреквенции од двата гена ($p > 0,05$). Иако вредноста на OR е пониска од 1, не е релевантна поради отсуството на статистичка сигнификантност, односно вредноста $p > 0,05$.

Во втората група анализи, споредувани се комбинациите на генотипски фреквенции од двата гена меѓу бројот на пациенти без и со орален мукозитис, користејќи го двонасочниот χ^2 -тест, како и пресметување на односот на шанси и на ризик, за секој од трите стратуми на комбинации на генотипови од двата гена, како што е прикажано во **табелата 5.31**.

Како што може да се забележи од прикажаните податоци, поради целосно отсуство на индивидуи кај некои од генотипските комбинации, пресметките биле невозможни со посочените статистички методи.

Од податоците може да се забележи статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата од првиот стратум на комбинации на генотиповите од двата гена меѓу пациентките без и со орален мукозитис, при што тие кои се носители и на генотипот AA од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и на генотипот GG од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат 0,106 пати помали шанси, односно околу 0,126 пати

понизок ризик од појава на клинички релевантен орален мукозитис во однос на останатите комбинации на генотипови од двата генски полиморфизми, при што разликите се сигнификантни ($p < 0,05$).

Табела 5.31: Поврзаност на оралниот мукозитис со фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип <i>ABCB1</i> 2677	Без орален мукозитис		Со орален мукозитис		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		n	%	n	%				
AA	GG	14	24,14	3	75,00	4,864	0,027	0,106 (0,01 - 1,10)	0,126 (0,01 - 1,13)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	44	75,86	1	25,00				
Вкупно		58	100,00	4	100,00				
AG	GG	24	27,91	4	33,33	0,152	0,697	0,774 (0,21 - 2,81)	0,800 (0,26 - 2,45)
AG	GA + GT + AA + AT + TT	62	72,09	8	66,67				
Вкупно		86	100,00	12	100,00				
GG	GG	5	29,41	1	100,00	2,118	0,146	н.п.	н.п.
GG	GA + GT + AA + AT + TT	12	70,59	0	0,00				
Вкупно		17	100,00	1	100,00				

Кратенки: н.п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Разликите меѓу останатите комбинациски групи не беа статистички значајни ($p > 0,05$).

Оттаму, појавата на орален мукозитис во испитуваната група на пациентки, поврзана со билокусен ефект при истовремено присуство на генотипот AA од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и на генотипот GG од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*.

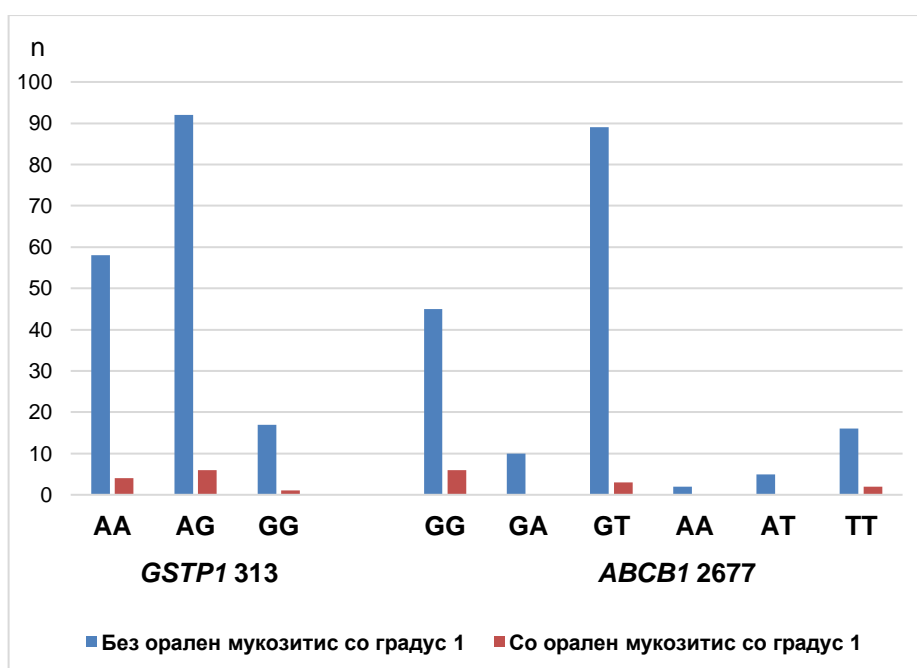
Со оглед на тоа што во испитуваната група се забележани случаи на орален мукозитис со градус 1 кај 6,18% и со градус 2 кај 3,37% од пациентките, направени се генетско-статистички анализи и во однос на секој од овие два градуса, засебно.

Орален мукозитис - градус 1

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1 кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана на табелата 5.32 и на графиконот 5.28.

Табела 5.32: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис со градус 1		Со орален мукозитис со градус 1		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>ABCB1</i> 2677	GG	45	26,95	6	54,55	1,000
	GA	10	5,99	0	0,00	
	GT	89	53,29	3	27,27	
	AA	2	1,20	0	0,00	
	AT	5	2,99	0	0,00	
	TT	16	9,58	2	18,18	
	Вкупно		167	100,00	11	
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	34,73	4	36,36	1,000
	AG	92	55,09	6	54,55	
	GG	17	10,18	1	9,09	
	Вкупно		167	100,00	11	



Графикон 5.28: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1

Покрај евидентните разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на орален мукозитис со градус 1, тие разлики не се статистички значајни, како при споредбата кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, така и при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p>0,05$).

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1 кај пациентките кои се вршени со **генотипскиот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и со **хетерозиготниот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, се прикажани во **табелата 5.33**.

Табела 5.33: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 1 со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис со градус 1		Со орален мукозитис со градус 1		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	AA	58	34,73	4	36,36	0,021	0,990	реф.	реф.
	AG	92	55,09	6	54,55			0,946 (0,26 - 3,49)	0,949 (0,28 - 3,23)
	GG	17	10,18	1	9,09			0,853 (0,09 - 8,15)	0,861 (0,10 - 7,23)
	Вкупно	167	100,00	11	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	GA + GT	99	68,75	3	33,33	4,781	0,029	0,227 (0,05 - 0,95)	0,250 (0,07 - 0,96)
	GG	45	31,25	6	66,67				
	Вкупно	144	100,00	9	100,00				

Кратенки: *n. p.* = непресметливо; *OR*=*odds ratio* (однос на шанси); *RR*=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

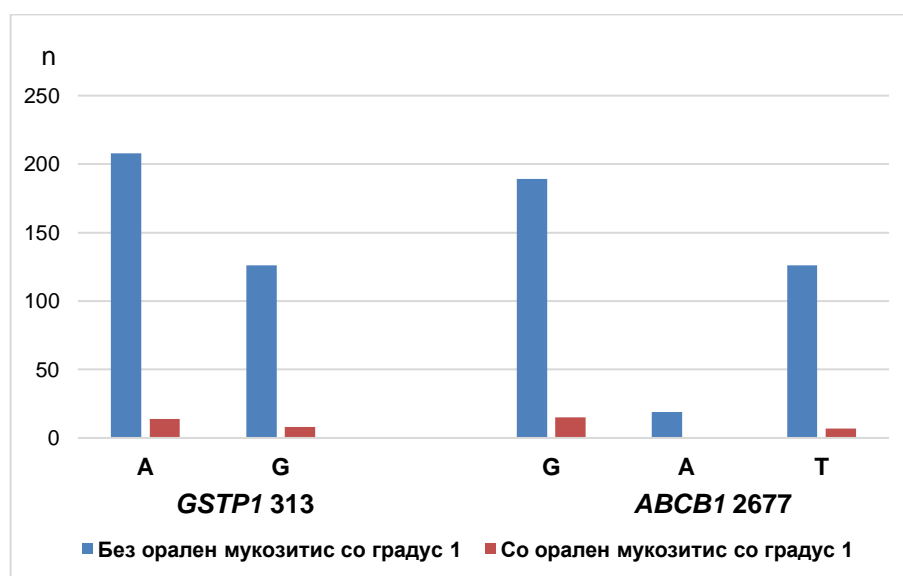
Од табелата е евидентно дека носителите на генотиповите GA или GT на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат 0,227 пати (односно 22,7%) помала веројатност да развијат орален мукозитис со градус 1 во однос на носителите на генотипот GG, при што разликите се сигнификантни ($p<0,05$). Поинаку формулирано, произлегува дека намалувањето на шансите изнесува 77,3% ($100\%-22,7\%=77,3\%$). Пресметаните вредности на релативниот ризик се 0,25 пати (односно 25,0%) пониски, односно има намалување на ризикот за 75%. За разлика од тоа, споредените групи на

фреквенции на испитуваните генотипови од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* не покажуваат статистички значајни разлики во однос на појавата на клинички значаен орален мукозитис со градус 1 при третманот со наведените хемотерапевтици ($p>0,05$).

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1 кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во табелата 5.34 и на графиконот 5.29.

Табела 5.34: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1

Полиморфизам	Алел	Без орален мукозитис со градус 1		Со орален мукозитис со градус 1		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		n	%	n	%	
<i>ABCB1</i> 2677	G	189	56,59	15	68,18	0,509
	A	19	5,69	0	0,00	
	T	126	37,72	7	31,82	
	Вкупно	334	100,00	22	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	208	62,28	14	63,64	1,000
	G	126	37,72	8	36,36	
	Вкупно	334	100,00	22	100,00	



Графикон 5.29: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1

Евидентно е дека и покрај присутните разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на орален мукозитис со градус 1, овие разлики се статистички несигнификантни ($p>0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 1 кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.35**.

Табела 5.35: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 1 со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без орален мукозитис со градус 1		Со орален мукозитис со градус 1		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	126	37,72	8	36,36	0,016	0,898	0,943 (0,38 - 2,31)	0,947 (0,41 - 2,20)
	A	208	62,28	14	63,64				
	Вкупно	334	100,00	22	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	145	43,41	7	31,82	1,134	0,287	0,608 (0,24 - 1,53)	0,626 (0,26 - 1,50)
	G	189	56,59	15	68,18				
	Вкупно	334	100,00	22	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Не се регистрирани статистички значајни разлики во дистрибуцијата на фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми меѓу пациентките во однос на појавата на орален мукозитис со градус 1 ($p>0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на орален мукозитис со градус 1.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochrane-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.36**.

Табела 5.36: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 1 со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијатни алели	Без орален мукозитис со градус 1		Со орален мукозитис со градус 1		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	58	34,73	4	36,36	0,140	0,888
	1 G	92	55,09	6	54,55		
	2 G	17	10,18	1	9,09		
	Вкупно	167	100,00	11	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	45	26,95	6	54,55	1,170	0,242
	1 A / T	99	59,28	3	27,27		
	2 A / T	23	13,77	2	18,18		
	Вкупно	167	100,00	11	100,00		

Кратенка: $|z|$ = вредност добиена со двонасочниот тест Cochran-Armitage. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Се забележува дека и при ваквата генетска анализа, не постои статистички значајна поврзаност на оралниот мукозитис со градус 1 со линерното зголемување на присуството на варијантниот алел G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, ниту на двете варијантни алели на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

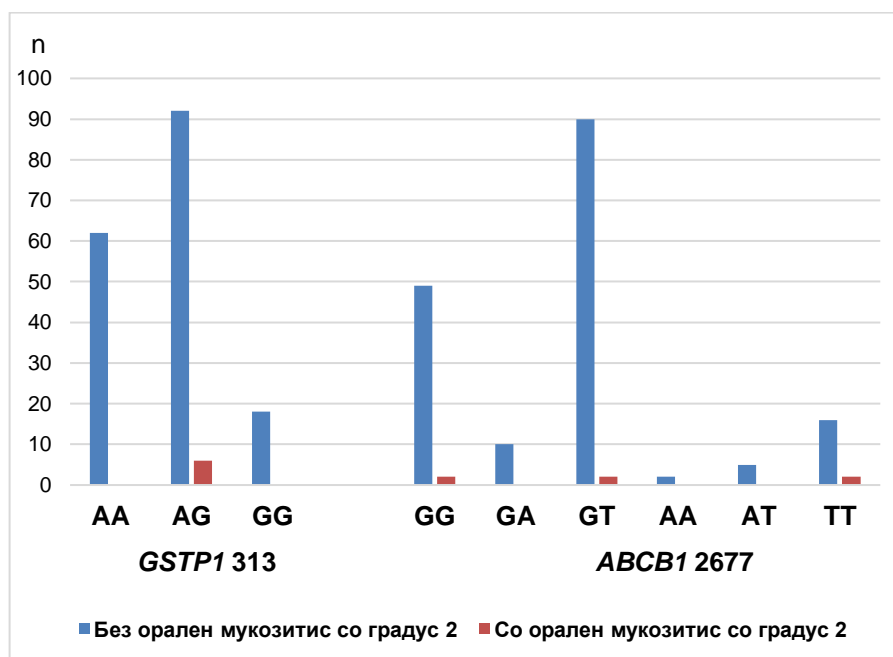
Поради малиот број на испитаници со градус 1 на оралниот мукозитис, не е вршена билokusната анализа, односно споредба на клиничката регистрација на оралниот мукозитис со градус 1 со генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките, истовремено.

Орален мукозитис - градус 2

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2 кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана на табелата 5.37 и на графиконот 5.30.

Табела 5.37: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис со градус 2		Со орален мукозитис со градус 2		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>ABCB1</i> 2677	GG	49	28,49	2	33,33	1,000
	GA	10	5,81	0	0,00	
	GT	90	52,33	2	33,33	
	AA	2	1,16	0	0,00	
	AT	5	2,91	0	0,00	
	TT	16	9,30	2	33,33	
	Вкупно	172	100,00	6	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	62	36,05	0	0,00	0,114
	AG	92	53,49	6	100,00	
	GG	18	10,47	0	0,00	
	Вкупно	172	100,00	6	100,00	



Графикон 5.30: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2

Покрај евидентните разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на орален мукозитис со градус 2, тие разлики не се статистички значајни, како при споредбата кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, така и при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p > 0,05$).

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2 кај пациентките кои се вршени со **супердоминантниот модел** кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и со **рецесивниот модел** кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, се прикажани во **табелата 5.38**.

Табела 5.38: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 2 со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без орален мукозитис со градус 2		Со орален мукозитис со градус 2		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	AG	92	53,49	6	100,00	5,069	0,024	н.п.	н.п.
	AA + GG	80	46,51	0	0,00				
	Вкупно	172	100,00	6	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	AA + AT + TT	23	13,37	2	33,33	1,914	0,167	3,239 (0,56 - 18,70)	3,060 (0,59 - 15,84)
	GG + GA + GT	149	86,63	4	66,67				
	Вкупно	172	100,00	6	100,00				

Кратенки: н. п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Од табелата е евидентно дека разликите во фреквенциите на генотиповите AA или GG на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* се разликуваат сигнификантно од тие на носителите на генотипот AG во однос на појавата на орален мукозитис со градус 2 ($p < 0,05$). Но, со оглед на малиот број испитаници во подгрупите, не беа пресметани вредности на односите на шанси и на релативниот ризик.

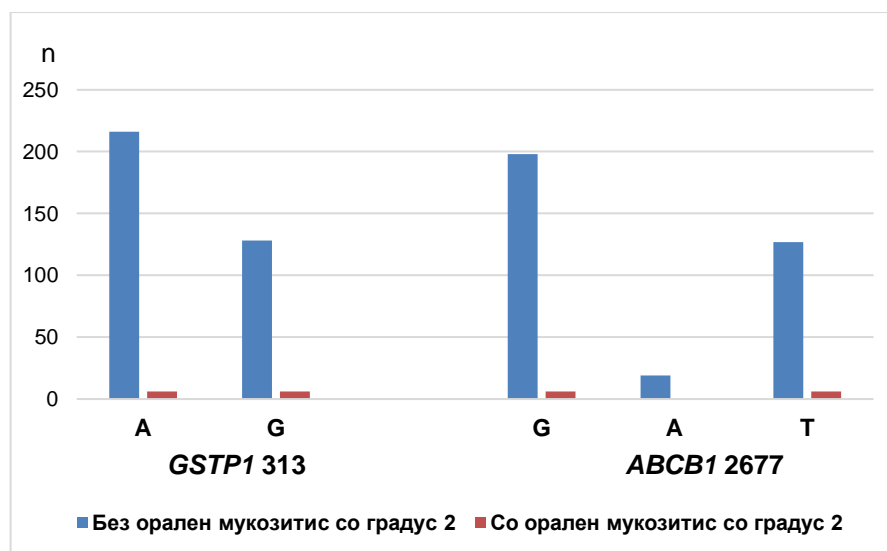
За разлика од тоа, споредените групи на фреквенции на испитуваните генотипови од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* не покажуваат

статистички значајни разлики во однос на појавата на клинички значаен орален мукозитис со градус 2 при третманот со наведените хемотерапевтици ($p>0,05$).

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2 кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во табелата 5.39 и на графиконот 5.31.

Табела 5.39: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2

Полиморфизам	Алел	Без орален мукозитис со градус 2		Со орален мукозитис со градус 2		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>ABCB1</i> 2677	G	198	57,56	6	50,00	0,770
	A	19	5,52	0	0,00	
	T	127	36,92	6	50,00	
	Вкупно	344	100,00	12	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	G	216	62,79	6	50,00	0,379
	A	128	37,21	6	50,00	
	Вкупно	344	100,00	12	100,00	



Графикон 5.31: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2

Евидентно е дека и покрај присутните разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во

присуство на орален мукозитис со градус 2, овие разлики се статистички несигнификантни ($p>0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на орален мукозитис со градус 2 кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.40**.

Табела 5.40: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 2 со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без орален мукозитис со градус 2		Со орален мукозитис со градус 2		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	128	37,21	6	50,00	0,808	0,369	1,688 (0,53 - 5,34)	1,657 (0,55 - 5,03)
	A	216	62,79	6	50,00				
	Вкупно	344	100,00	12	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	146	42,44	6	50,00	0,271	0,603	1,356 (0,43 - 4,29)	1,342 (0,44 - 4,08)
	G	198	57,56	6	50,00				
	Вкупно	344	100,00	12	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Не се регистрирани статистички значајни разлики во дистрибуцијата на фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми меѓу пациентките во однос на појавата на орален мукозитис со градус 2 ($p>0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на орален мукозитис со градус 2.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochrane-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.41**.

Табела 5.41: Поврзаност на оралниот мукозитис со градус 2 со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијантни алели	Без орален мукозитис со градус 2		Со орален мукозитис со градус 2		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	62	36,05	0	0,00	0,988	0,323
	1 G	92	53,49	6	100,00		
	2 G	18	10,47	0	0,00		
	Вкупно	172	100,00	6	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	49	28,49	2	33,33	0,571	0,568
	1 A / T	100	58,14	2	33,33		
	2 A / T	23	13,37	2	33,33		
	Вкупно	172	100,00	6	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот тест Cochran-Armitage. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Се забележува дека и при ваквата генетска анализа, не постои статистички значајна поврзаност на оралниот мукозитис со градус 2 со линерното зголемување на присуството на варијантниот алел G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, ниту на двете варијантни алели на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

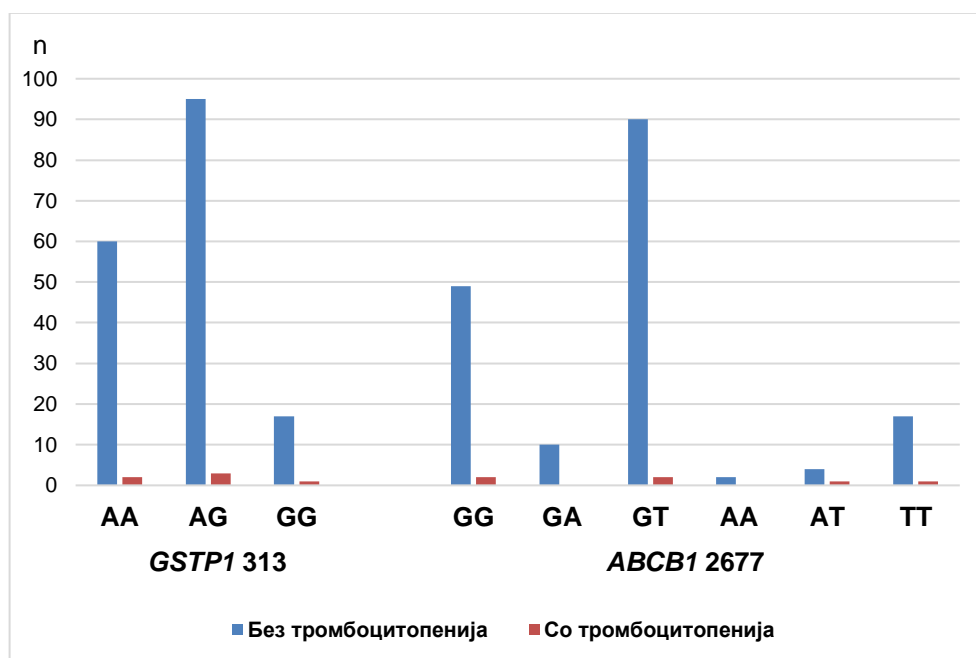
Поради малиот број на испитаници со градус 2 на оралниот мукозитис, не е вршена билокусната анализа, односно споредба на клиничката регистрација на оралниот мукозитис со градус 2 со генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките, истовремено.

5.7.5. Поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на тромбоцитопенија

Споредбата на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубин е прикажана на **табелата 5.42** и на **графиконот 5.32**.

Табела 5.42: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија

Полиморфизам	Генотип	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		Fisher-ов егзактен тест <i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<i>ABCB1</i> 2677	GG	49	28,49	2	33,33	1,000
	GA	10	5,81	0	0,00	
	GT	90	52,33	2	33,33	
	AA	2	1,16	0	0,00	
	AT	4	2,33	1	16,67	
	TT	17	9,88	1	16,67	
	Вкупно	172	100,00	6	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	AA	60	34,88	2	33,33	0,690
	AG	95	55,23	3	50,00	
	GG	17	9,88	1	16,67	
	Вкупно	172	100,00	6	100,00	



Графикон 5.32: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија

Евидентни се разлики меѓу фреквенциите на генотиповите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на тромбоцитопенија. Но, тие разлики не се статистички значајни, како при споредбата кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, така и при споредбата кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p>0,05$). Користените критериуми за регистрираниот токсичен ефект, односно полиморфизам, се како што е опишано претходно во главата: **Материјал и методи**.

Резултатите од генетските анализи за определувањето на поврзаност меѓу фреквенциите на генотиповите и присуството или отсуството на тромбоцитопенија кај пациентките кои се вршени со **генотипскиот модел** и кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* и кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, се прикажани во **табелата 5.43**.

Табела 5.43: Поврзаност на тромбоцитопенијата со генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Генотип	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	AA	60	34,88	2	33,33	0,297	0,862	реф.	реф.
	AG	95	55,23	3	50,00			0,947 (0,15 - 5,84)	0,949 (0,16 - 5,52)
	GG	17	9,88	1	16,67			1,765 (0,15 - 20,66)	1,722 (0,17 - 17,92)
	Вкупно	172	100,00	6	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	GG	49	28,49	2	33,33	2,315	0,314	реф.	реф.
	GA + GT	100	58,14	2	33,33			0,490 (0,07 - 3,58)	0,500 (0,07 - 3,45)
	AA + AT + TT	23	13,37	2	33,33			2,130 (0,28 - 16,09)	2,040 (0,30 - 13,65)
	Вкупно	172	100,00	6	100,00				

Кратенки: н. п. = непресметливо; OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

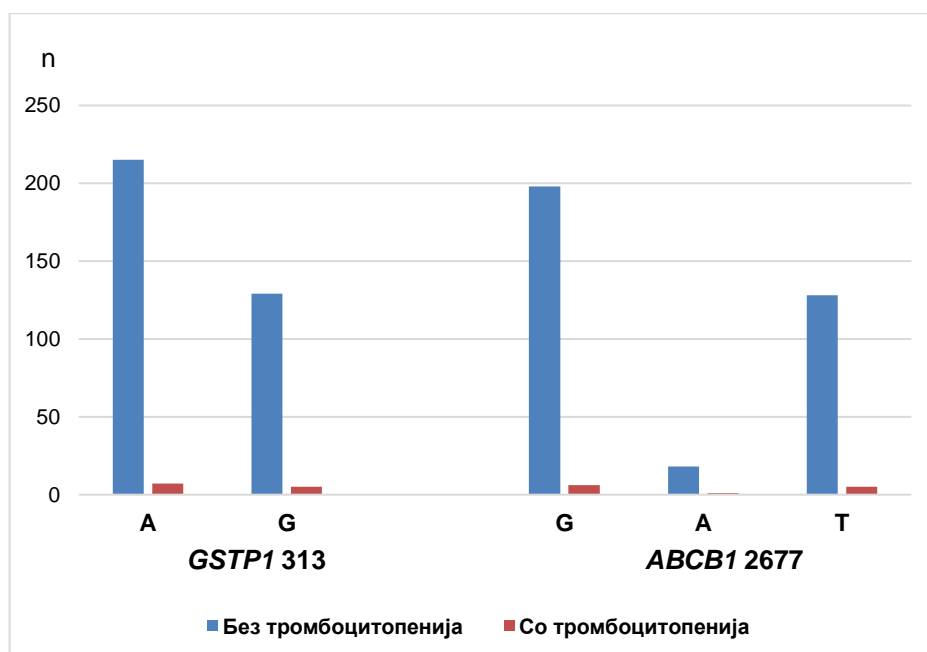
Од табелата е евидентно дека ниту еден од споредените групи на фреквенции на испитуваните генотипови од полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, не покажуваат статистички значајни разлики во однос на појавата на клинички значајна тромбоцитопенија при третманот со наведените хемотерапевтици ($p>0,05$). Вредностите на пресметаниот однос на шанси и на ризик за појава на

тромбоцитопенија кај пациентките покажуваат отстапувања од 1, но немаат статистичка сигнификантност, па се нерелевантни за споредба.

Споредбата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин е прикажана во **табелата 5.44** и на **графиконот 5.33**.

Табела 5.44: Споредба на фреквенциите на генотиповите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија

Полиморфизам	Алел	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		Fisher-ов егзактен тест
		n	%	n	%	p
<i>ABCB1</i> 2677	G	198	57,56	6	50,00	0,594
	A	18	5,23	1	8,33	
	T	128	37,21	5	41,67	
	Вкупно	344	100,00	12	100,00	
<i>GSTP1</i> 313	A	215	62,50	7	58,33	0,769
	G	129	37,50	5	41,67	
	Вкупно	344	100,00	12	100,00	



Графикон 5.33: Споредба на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија

Забележливо е дека и покрај присутните разлики меѓу фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми кај пациентките, односно при отсуство и во присуство на тромбоцитопенија, овие разлики се статистички несигнификантни ($p > 0,05$).

Анализата на фреквенциите на алелите на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, во однос на присуството или отсуството на тромбоцитопенија кај пациентките, е вршена со користење на **алелиот модел** при што χ^2 вредностите се пресметани со двонасочниот тест. Резултатите од анализите се прикажани во **табелата 5.45**.

Табела 5.45: Поврзаност на тромбоцитопенијата со алелните фреквенции на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Алели	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		χ^2	<i>p</i>	OR (95% CI)	RR (95% CI)
		n	%	n	%				
<i>GSTP1</i> 313	G	129	37,50	5	41,67	0,086	0,770	1,190 (0,37 - 3,83)	1,183 (0,38 - 3,65)
	A	215	62,50	7	58,33				
	Вкупно	344	100,00	12	100,00				
<i>ABCB1</i> 2677	A + T	146	42,44	6	50,00	0,271	0,603	1,356 (0,43 - 4,29)	1,342 (0,44 - 4,08)
	G	198	57,56	6	50,00				
	Вкупно	344	100,00	12	100,00				

Кратенки: OR=*odds ratio* (однос на шанси); RR=*risk ratio* (однос на ризик); 95% CI=*confidence interval* (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Не се регистрирани статистички значајни разлики во дистрибуцијата на фреквенциите на алелите на двата испитувани полиморфизми меѓу пациентките во однос на појавата на тромбоцитопенија ($p > 0,05$).

Понатаму, применета е генетската анализа со **адитивниот модел**, при што се споредени фреквенциите на пациентките кои се не се носители, потоа на тие кои се носители на еден варијантен алел (G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*), односно на двете варијантни алели (A или T кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*), во однос на присуството на тромбоцитопенија.

За оваа споредба користен е двонасочниот тест за ординална поврзаност Cochrane-Armitage. Резултатите се прикажани во **табелата 5.46**.

Табела 5.46: Поврзаност на тромбоцитопенијата со варијантните алели на полиморфизмите rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1*

Полиморфизам	Број на варијатни алели	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		Cochran-Armitage тест	
		n	%	n	%	z	p
<i>GSTP1</i> 313	0 G	60	34,88	2	33,33	0,322	0,747
	1 G	95	55,23	3	50,00		
	2 G	17	9,88	1	16,67		
	Вкупно	172	100,00	6	100,00		
<i>ABCB1</i> 2677	0 A / T	49	28,49	2	33,33	0,571	0,568
	1 A / T	100	58,14	2	33,33		
	2 A / T	23	13,37	2	33,33		
	Вкупно	172	100,00	6	100,00		

Кратенка: |z| = вредност добиена со двонасочниот Cochran-Armitage тест. Критична вредност за тестот при оваа пресметка е: 1,959.

Евидентно е дека и при ваквата генетска анализа, не постои статистички значајна поврзаност на тромбоцитопенијата со линерното зголемување на присуството на варијантниот алел G кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, ниту на двете варијантни алели на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* ($p > 0,05$).

Билокусна анализа

За проценка на генетската поврзаност на двата испитувани полиморфизми, rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено, со клиничката регистрација на тромбоцитопенијата, анализирани се генотипските и алелните фреквенции на овие два локуса кај пациентките.

Пресметките се вршени за шест пара комбинации составени од по еден од генотиповите од хомозиготниот див тип, хетерозиготниот и хомозиготниот варијантен генотип за полиморфизмот во генот *GSTP1*, од една страна, како и по еден од хомозиготните генотипови на генот *ABCB1*. Поради ниските вредности на фреквенциите на генотипови од генот *ABCB1*, групирани се комбинациите на сите останати генотипови (GA + GT + AA + AT + TT).

Во првата група на генетски анализи, споредбата на сите шест комбинации на генотипски фреквенции од двата гена, истовремено, е извршена групно со двонасочниот Mantel-Haenszel-овиот тест за стратификација, и тоа со 3 стратуми и со пресметка на егзактната p -вредност, а пресметан е и заедничкиот веројатносен индекс на односот на шанси OR (табела 5.47).

Табела 5.47: Разлики во фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 и во генот *GSTP1* при појавата на тромбоцитопенија со билokusниот модел

Генотип <i>GSTP1</i> 313	Генотип на <i>ABCB1</i> 2677	Без тромбоцитопенија	Со тромбоцитопенија	Билokusна анализа		
		n	n	Mantel-Haenszel	p	OR (95% CI)
AA	GG	17	0	0,047	0,825	0,815 (0,11 - 9,15)
AA	GA + GT + AA + AT + TT	43	2			
AG	GG	26	2			
AG	GA + GT + AA + AT + TT	69	1			
GG	GG	6	0			
GG	GA + GT + AA + AT + TT	11	1			
Вкупно		172	6			

Кратенки: н. п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Користен е двонасочен Mantel-Haenszel-ов тест. Критична вредност на тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Резултатите од анализите покажуваат дека не постои статистички значајна поврзаност на кој било од 6-те пара комбинации на генотипски фреквенции од двата гена ($p > 0,05$). Вредноста на *OR* е непресметлива заради отсуство на испитаници во некоја од фреквентните групи.

Во втората група анализи, споредувани се комбинациите на генотипски фреквенции од двата гена меѓу бројот на пациенти без и со тромбоцитопенија, користејќи го двонасочниот χ^2 -тест, како и пресметување на односот на шанси и на ризик, за секој од трите стратуми на комбинации на генотипови од двата гена, како што е прикажано во **табелата 5.48**.

Како што може да се забележи од прикажаните податоци, поради целосно отсуство на индивидуи кај некои од генотипските комбинации, пресметки биле невозможни со посочените статистички методи.

Слично, иако постои гранична сигнификантна разлика во дистрибуцијата од првиот стратум на комбинации на генотиповите од двата гена меѓу пациентките без и со тромбоцитопенија, отсуството на испитаници во некоја од комбинациските групи не дозволи пресметување на односот на шанси и на ризик.

Табела 5.48: Поврзаност на тромбоцитопенијата со фреквенцијата на комбинации на генотипови на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCBI* и rs1695 во генот *GSTP1*

Гено-тип <i>GSTP1</i> 313	Генотип <i>ABCBI</i> 2677	Без тромбоцитопенија		Со тромбоцитопенија		χ^2	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% CI)	<i>RR</i> (95% CI)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
AA	GG	17	28,33	0	0,00	0,781	0,377	н.п.	н.п.
AA	GA + GT + AA + AT + TT	43	71,67	2	100,00				
Вкупно		60	100,00	2	100,00				
AG	GG	26	27,37	2	66,67	2,201	0,138	0,188 (0,02 - 2,17)	0,200 (0,02 - 2,12)
AG	GA + GT + AA + AT + TT	69	72,63	1	33,33				
Вкупно		95	100,00	3	100,00				
GG	GG	6	35,29	0	0,00	0,529	0,467	н.п.	н.п.
GG	GA + GT + AA + AT + TT	11	64,71	1	100,00				
Вкупно		17	100,00	1	100,00				

Кратенки: н.п. = непресметливо; *OR*=odds ratio (однос на шанси); *RR*=risk ratio (однос на ризик); 95% CI=confidence interval (интервал на доверливост при 95%). Критична вредност на χ^2 -тестот во оваа пресметка е: 3,841.

Покрај тоа, постоењето на зголемени вредности на односот на шанси и/или на ризик во останатите комбинациски групи не беше статистички значајна ($p > 0,05$).

Оттаму произлегува дека појавата на тромбоцитопенија во испитуваната група на пациентки, не е поврзана со билокусен ефект на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCBI*, истовремено.

5.7.6. Резиме на генетската поврзаност на испитуваните полиморфизми со појавата на токсични ефекти и нузпојави

Заради поголема прегледност, во табелата 5.49 се прикажани сумарните резултати од анализите со кои се определи генетската поврзаност на двата полиморфизма rs20325282 во генот *ABCB1* и rs1695 во генот *GSTP1* со токсичните ефекти и нузпојави кај пациентките со карцином на дојката при комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин.

Табела 5.49: Преглед на резултатите од анализите за определување на генетска поврзаност на испитуваните полиморфизми со токсичните ефекти и нузпојави

Токсичен ефект или нузпојава	Статистичка значајност на разликите во присуството на полиморфизмот		
	Полиморфизам rs1695 во генот <i>GSTP</i>	Полиморфизам rs20325282 во генот <i>ABCB1</i>	Комбинација на двата полиморфизма истовремено (<i>GSTP</i> + <i>ABCB1</i>)
	<i>p</i> (модел)	<i>p</i> (модел)	<i>p</i> (генотипска комбинација)
Анемија	0,048 (рецесивен)	н. с.	н. с.
Фебрилна состојба	н. с.	0,005 (рецесивен) 0,006 (алелен) 0,003 (адитивен)	н. с.
Фебрилна неутропенија	0,024 (доминантен) 0,035 (алелен) 0,020 (адитивен)	0,0002 (рецесивен) 0,009 (алелен) 0,004 (адитивен)	н. с.
Орален мукозитис (сите пациенти)	н. с.	0,015 (супердоминантен)	0,027 (AA + GG)
Орален мукозитис градус 1	н. с.	0,029 (хетерозиготен)	/
Орален мукозитис градус 2	0,024 (супердоминантен)	н. с.	/
Тромбоцитопенија	н. с.	н. с.	н. с.

Кратенка: н. с. = нема статистички значајна разлика ($p > 0,05$)

6. ДИСКУСИЈА

Во оваа студија, извршена е анализа на генетската поврзаност на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, поединечно, како и на нивната комбинација, со појавата на токсичните ефекти и нузпојави кај група од 178 пациентки со карцином на дојката во текот и непосредно по комбинираната адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин.

Генетско-статистичките пресметки се вршени со монолокусна анализа (за секој од двата полиморфизми, поединечно), како и со билокусна анализа (за комбинација на двата полиморфизма, истовремено). Во текот на овие анализи, карактеристичните комбинации на фреквенциите на генотиповите и/или алелите, од една страна, се споредувани со појавата на токсичните ефекти и нузпојави, од друга страна. Како што е вообичаено при истражувањата каде има релативно малиот број на пациенти, некои од фреквенциите на генотиповите и/или алелите се групирани според соодветниот генетски модел.

Во испитуваната група на пациентки, се регистрираа само анемија, фебрилна состојба, фебрилна неутропенија, орален мукозитис и тромбоцитопенија. Кај ниту еден пациент во испитуваната група во предвидениот евалуациски период, односно од првиот ден на започнување на хемотерапијата, па сè до 21 ден по завршувањето на последната доза, а не се регистрираа други токсични ефекти: се невротоксичност, кардиотоксичност, хепатотоксичности и тн. Согласно етаблираните критериуми, не се анализирани честите несакани ефекти какви што се наузејата и повраќањето.

Најзастапени нузпојави на хемотерапијата во испитуваната група е анемијата поврзана со хемотерапијата која е регистрирана кај 45 пациентки (28,28%).

Фебрилна состојба (според користените критериуми) биле регистрирани кај 16 пациентки, односно кај 8,99%, а фебрилната неутропенија кај 9 (5,06%) пациентки.

Оралниот мукозитис е идентифициран кај 17 испитанички (9,55%), при што се регистрирани случаи на орален мукозитис со градус 1 кај 6,18% и со градус 2 кај 3,37% од пациентките, па засебно е анализирана и генетската поврзаност на секој од овие два градуса.

Најретко била застапена тромбоцитопенијата која се појавила кај 6 (3,37%) од испитаничките.

Анемија поврзана со хемотерапијата со градус 1 е регистрирана кај вкупно 45 пациентки од испитуваната група на пациентки со карцином на дојката. Генетските анализи покажаа дека носителите на хомозиготниот варијантен генотип GG на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, имаат околу 2,6 пати повисока веројатност од појава на анемија при третманот со наведените хемотерапевтици во однос на носителите на дивниот генотип AA и на хетерозиготите AG ($p < 0,05$). Пресметаниот ризик за појава на анемија кај пациентките со генотипот GG е повисок за речиси 2 пати во однос на тие кои се носители на дивниот генотип AA и хетерозиготниот AG. Кај полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1*, резултатите од генотипскиот модел на генетската анализа покажуваат дека нема статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенциите на хомозиготните носители на дивниот генотип GG, хетерозиготите GA, GT и AT и носителите на варијантните хомозиготни генотипови AA и TT ($p > 0,05$). Не е најдена поврзаност со алелната фреквенција на кој било од двата испитувани полиморфизми.

При анализа на појавата на анемија во испитуваната група на пациентки, не е наједна генетска поврзаност со двата полиморфизма rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1*, истовремено.

Покрај депресијата на еритропоезата, постои јасна поврзаност на двата испитувани полиморфизми и со клиничките манифестации на потиснувањето на белата крвна лоза, односно неутропенијата и тоа кога е асоцирана со фебрилна состојба. Анализите покажаа дека носителите на генотиповите AA, AT или TT од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат повеќе од 9 пати повисока веројатност од појава на фебрилна неутропенија во текот на третманот со наведените хемотерапевтици во однос на пациентките носители на генотиповите GG, GA или GT ($p < 0,01$). Носителите на варијантните алели (A или T) на овој полиморфизам имаат околу 3,7 пати повисока веројатност за појава на фебрилна неутропенија во однос на пациентките носители на дивниот алел G ($p < 0,01$). Кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, носителите на варијантниот алел G имаат приближно 2,7 пати повисока веројатност за појава на фебрилна неутропенија во однос на пациентките со дивниот алел A ($p < 0,05$). Не е идентифициран билокусен ефект на двата испитувани полиморфизми, истовремено, со оваа нузпојава.

Причините за сите погоре наведени регистрирани ефекти и генетската поврзаност можат да се бараат во повеќе насоки, а пред сè во механизмите со кои двата хемотерапевтски лекови делуваат на ниво на клетките и на целиот организам, односно на нивната системска фармакокинетика и фармакодинамика. Адјувантната

хемотерапија со комбинација на доксорубицин и циклофосфамид, е стандарден режим кој вообичаено се користи лекување на карциномот на дојката. Интрацелуларниот транспорт на доксорубицинот е посредуван преку фамилијата на протеини-транспортите на органски анјонски соединенија, пред сè преку *ABCB1*. Полиморфизмите во генот *ABCB1* кој го кодира истоимениот протеин, имаат значително влијание врз циркулирачките и интрацелуларните нивоа на доксорубицинот кај пациентките со карцином на дојката. Тоа резултира со сигнификантно зголемување на серумските нивоа и намален клиренс кај пациенти со варијантите генотипови, односно алели, на овој полиморфизам на генот *ABCB1*.

Во повеќе студии се опишани ефектите на неколку гени, вклучувајќи го и *ABCB1*, врз мембранскиот транспорт на доксорубицинот и врз клиничките токсични ефекти (Wang et al., 2005; Sissung et al., 2006; Huang et al., 2007; Fung et al., 2009; Franke et al., 2010; Thorn et al., 2011). Генетската асоцираност на генот *ABCB1* со појавата на токсичност при терапијата и со други хемотераписки лекови е, исто така, екстензивно истражувана во голем број студии (Henderson et al., 2003; Erdélyi et al., 2006; Tran et al., 2006; Chang et al., 2009; Franke et al., 2010; Kudzi et al., 2010).

Досега се објавени резултатите од поголем број студии и клинички испитувања за проучување на влијанието на генетските варијанти во генот *ABCB1* во однос на несаканите ефекти од третманот на карциномот на дојката. Притоа, најчесто биле забележани: појавата на едем, фебрилна состојба, гастроинтестинална токсичност вклучувајќи ја дијареата, како и разни типови на хематолошка токсични реакции. Поголемиот дел од студиите ги фокусирале своите истражувања врз хематолошка токсичност, какви што се анемијата, леукопенијата, неутропенијата и тромбоцитопенијата.

Во студијата на Tsai со соработниците, објавена во 2009 година, анализирани биле 59 жени од Тајван со карцином на дојката кои биле третирани со комбинирана адјувантна терапија со доцетаксел, епирубицин и циклофосфамид (Tsai et al., 2009). Во ова истражување биле генотипизирани следниве полиморфизми во генот *ABCB1*: промоторните полиморфизми -41A>G и -45C>G, како и полиморфизмите лоцирани во егзонските региони на генот, и тоа 1236C>T, 2677G>T/A и 3435C>T. Во истата студија биле забележани несакани дејства и токсични ефекти, односно појава на неутропенија, фебрилна неутропенија, леукопенија, фебрилна леукопенија, плеврален излив, дијареа, треска и едем. Авторите покажале постоење на значајна генетска асоцијација на генотипот *ABCB1* 2677GG со фебрилна состојба ($p=0,024$) и

фебрилна неутропенија ($p=0,027$), додека генотипот 3435C/C бил поврзан со леукопенија ($p=0,057$).

Во студијата на Икеда (2015 г.) била извршена евалуација на поврзаноста меѓу фебрилната неутропенија предизвикана од хемотерапија и полиморфизмите на генот ABCB1 кај пациенти со карцином на дојка (Ikeda et al., 2015). Биле вклучени 141 пациентки со карцином на дојката третирани со доксорубицин и циклофосфамид (АС) хемотерапија. Примероците од периферна крв добиени од пациентките биле генотипизирани за полиморфизмите ABCB1 2677G> T/A и 3435C>T. Генотиповите потоа биле анализирани во однос на нивната поврзаност со фебрилна неутропенија од градус 3 или повисока, и нивната употребливост како индикатори за ризик преку употреба на мултиваријатна логистичка регресија. Застапеноста на пациенти со фебрилна неутропенија од градус 3 или повисока била 85,7% во групата хомозиготна варијанта на генотипот, односно 80% и 58,6% во хетерозиготна варијанта и генотипот GG, соодветно ($p=0,021$). Мултиваријатната анализа на логистичка регресија покажала дека полиморфизмот ABCB1 2677G> T/A е силен предиктор за фебрилна неутропенија од градус 3 или повисока (однос на шанси: 3,76; интервал на доверба при 95%: 1,44-9,81; $p=0,007$). Авторите заклучуваат дека полиморфизмите во генот ABCB1 можат да бидат индикатори за степенот на фебрилна неутропенија предизвикана од хемотерапија кај пациенти третирани со АС со рак на дојка.

Спротивно на тоа, во истражувањето на Cizmarikova со соработниците (2010 г.) не била најдена генетска асоцијација на полиморфизмот 3435C>T во истиот ген со хематолошката токсичност кај пациенти со карцином на дојката, иако биле регистрирани широк опсег на интензитети на токсични ефекти (2-4), и тоа: анемија, леукопенија, неутропенија и тромбцитопенија (Cizmarikova et al., 2010).

Во однос на полиморфизмот 1236C>T во генот ABCB1, постојат неколку публикации кои го поврзуваат генотипот со хемотоксичноста при комбинираната хемотерапија на карциномот на дојката. Во најмалку две студии е најдено дека варијантниот генотип ABCB1 1236C>T полиморфизмот не бил поврзан со потешките градуси на токсичност индуцирана од цитостатиците (степен 3 или 4) (Tsai et al., 2009; Zhang et al., 2011).

Сепак, во студијата на Chaturvedi со соработниците (2013 г.), спроведена врз 207 пациентки од Северна Индија со карцином на дојката, најдена е значајна асоцијација на полиморфизмот 1236C>T на овој ген со анемија ($p=0,046$) (Chaturvedi et al., 2013). Во рамките на истата студија, исто така, бил евалуиран ефектот на

полиморфизмите *ABCB1* 2677G>T/A и 3435C>T врз хематолошката токсичност, но не била најдена никаква сигнификантна поврзаност (Chaturvedi et al., 2013).

Во студијата на Ји со соработниците во 2013 година, било испитувано влијанието на полиморфизмите на 2677G> T/A, 3435C> T и 1236C> T на овој ген, со хематолошка токсичност кај 153 кинески пациентки со карцином на дојката (Ји et al., 2013). Според објавените резултати, во оваа студија не била идентифицирана асоцијација на кој било од испитуваните три полиморфизми во генот *ABCB1* со градусите 3-4 на неутропенија.

Покрај хематолошката токсичност, гастроинтестиналните нузпојави и токсичности се чести несакани ефекти кај пациентките со карцином на дојката третирани со циклофосфамид и доксорубицин. Во мошне обемната клиничка студија предодена од Yao со соработниците (2014 г.) биле анализирани вкупно 78 полиморфизми (SNP) во гените *ABCB1*, *ABCC1* и *ALDH1A1* кај 882 пациенти со рак на дојка запишани во SWOG Фаза III испитување S0221 и не најде ниту еден од полиморфизмите *ABCB1* кои се значително поврзани со повисоките градуси на хематолошка токсичност (3-4, како и гастроинтестиналната токсичност и нузпојави (Yao et al., 2014).

Во голем број досега објавени студии се забележани значителни разлики во фармакокинетиката и биотрансформација на циклофосфамидот помеѓу индивидуи третирани со овој лек, и тоа како кај возрасните, така и кај децата со малигни заболувања. Системска изложеност на метаболитите на циклофосфамид по администрирањето на прецизни терапевтски дози на циклофосфамид може да варира и до 10 пати помеѓу пациентите (de Jonge et al., 2005). Меѓуиндивидуалните разлики во нивоата на експресија на специфичните CYP ензими, како и разликите во поединечната активност на овие ензими, можат да претставуваат дел од причините за ваквата фармакокинетска варијабилност (Shimada et al., 1994). На пример, ефективноста на CYP2B6 при активирањето на циклофосфамидот значително се разликува меѓу примероците на црниот дроб од различни индивидуи, веројатно како резултат на разликите во експресиските нивоа на CYP протеините (Roy et al., 1999). Профилот на индукција или инхибиција на CYP-системот може да биде многу променлив кај пациентите (Huang et al., 2000).

Покрај тоа, Dockham со сор. утврдиле дека постои трикратна меѓуиндивидуална варијација во фракцијата на еритроцитите во однос на изоензимот ALDH1. Оттаму, варијациите на хематокритот можат да влијаат врз ефикасноста на медикаментите (Dockham et al., 1992).

Циклофосфамидот е фармаколошки прекурзор, односно пролек. Оттаму, неопходна е метаболна активација за негово хемотераписко делување. По парентералната апликација, активацијата се одвива преку низа ензимски реакции постредувани од цитохром оксидазите CYP2B6 и CYP2C9, а во помала мерка и со CYP3A4 и CYP3A5, во хепатоцитите, со кои циклофосфамидот прво се конвертира до 4-хидроксициклофосфамид (Zhang et al., 2005). Потоа, ова соединение се конвертира во неговата таутомерна форма алдофосфамид, а тој пак, спонтано се деградира до фосфорамид мустард, кој е всушност терапевтски активниот молекул. Соединенијата 4-хидроксициклофосфамид и алдофосфамид се детоксифицираат преку коњугација посредувана со повеќе ензими од суперфамилијата на глутатион-S-трансферази (GSTA1, GSTM1, GSTP1 и GSTT1), како и со алдехид дехидрогеназите (ALDH1A1 и ALDH3A1) до карбоксициклофосфамид (de Jonge et al., 2005; Moreb et al., 2005). Сите овие ензими се наоѓаат во хепатоцитите.

Генските полиморфизми кои доведуваат до несинонимни супституции на аминокиселинските остатоци во ензимите кои ги кодираат можат да ја намалат ефикасноста на детоксификацијата на циклофосфамидот и на неговите метаболити, зголемувајќи ги нивните концентрации и времетраењето на клиренсот, а со тоа можат да имаат големо влијание врз појавата на токсични ефекти и нуспојави, како и на секундарни малигнитети (Pinto et al., 2009).

Поврзаноста на генскиот полиморфизам *GSTP1* rs1695 со токсичните ефекти, каква што е леукопенијата, неутропенијата и фебрилната неутропенија, при адјувантната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентки со карцином на дојката е опишана во повеќе студии (Hayes et al., 1994; Dirven et al., 1995; Korjar et al., 2002; Choi et al., 2006; González-Neira et al., 2012). Полиморфизмите во генот *GSTP1* се поврзани и со појавата на разни токсични ефекти при комбинираната хемотерапија на крациномот на дојката, вклучувајќи ја неуропатијата (Lecomte et al., 2006; Zárate et al., 2007; Mir et al., 2009; Inada et al., 2010), како и појавата на токсични ефекти при хемотерапијата на други типови на малигни и автоимуни заболувања (Zhong et al., 2006; Braun et al., 2009).

За илустрирање на важноста и клиничката сигнификантност од генетската поврзаност на полиморфизмот *GSTP1* rs1695 со токсичните ефекти при третманот со циклофосфамид можат да послужат и приказите на случаи кои не се ретки во литературата. Така, Tran со сор. (Tran et al., 2008) прикажува случај на млада пациентка (возраст 25 години) кај која ниска иницијална доза на циклофосфамид

администрирана заради третман на автоимуно заболување предизвикала низа на животозагрозувачки токсични ефекти.

Zhang и сор. (Zhang et al., 2011) во својата студија ги истражувале полиморфизмите во гените *CYP3A*, *GSTP1* и *MDR1* и нивната поврзаност со терапевтскиот одговор и токсичните ефекти кај 120 пациентки со карцином на дојката при третман со епирубин и циклофосфамид. Во однос на полиморфизмот *GSTP1* rs1695, авторите забележале пониска токсичност и нуспојави при постоење на дивниот хомозигот или хетерозигот. Опишаните токсични ефекти не биле статистички поврзани со возраста на пациентките, стадиумот, статусот на менопауза, како ниту со дозата на лековите.

Слично, во истражувањето спроведено од Tulsyan со сор. (Tulsyan et al., 2013), анализирани биле 207 пациентки со карцином на дојката кои биле третирани со антрациклински препарати. Генотипизацијата била извршена на два гена од фамилијата на глутатион трансферази, вклучувајќи го и полиморфизмот кој е коирстен и во нашата студија: *GSTP1* rs1695. Авторите опишале дека нивните анализи утврдиле статистички значајна поврзаност на варијантниот и хетерозиготниот генотип од овој полиморфизам со појавата на хематолошка токсичност и сметаат дека ваквите фармакогенетски истражувања можат да создадат тестови за предикција на исходот и токсичноста на хемотерапијата кај пациентите со канцер.

Клучната улога на генетските полиморфизми во детерминирањето на приемчивоста кон хематолошка токсичност на доксорубинот и циклофосфамидот е потврдена и во студии во кои се користени анимални модели во контролирани услови (Gatti et al., 2017).

Сепак, меѓу истражувањата постојат и контрадикторни резултати, па во некои студии не е идентифицирана значајна поврзаност на полиморфизмот *GSTP1* A313G со фармакокинетиката и метаболизмот, ниту со клиничката токсичност на доксорубинот и циклофосфамидот.

Во студијата на Low со сор., анализирани биле вкупно 403 пациентки со карцином на дојка, третирани со циклофосфамид и доксорубин, од кои кај 184 се појавиле токсични ефекти и служеле како група на испитаници и 219 кај кои не се појавиле токсични ефекти и имале улога на контролна група (Low et al., 2009). Како токсични ефекти, во оваа студија биле следени само оние случаи кај кои се појавила леукопенија или неутропенија со градус 3 или повисок, како и гастроинтестинална токсичност со градус 2 или повисок. Во студијата биле определувани генотиповите

на вкупно 143 полиморфизми во 13 кандидатни гени: *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ALDH1A1*, *ALDH3A1*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *ABCC2* и *ABCC4*. Овие гени се инволвирани во активацијата, метаболизмот и транспортот на циклофосфамидот. Од интерес за оваа студија е дека полиморфизмите во генот *GSTP1* не покажале генетска поврзаност со токсичните ефекти во оваа студија.

Генетска поврзаност не е најдена и во истражувањето на со Jamieson соp. (Jamieson et al., 2014). Во оваа фармакогенетската студија биле испитувани фармаколошките ефектите на циклофосфамидот (комбиниран со епирубицин и 5-флуороурацил) при адјувантна терапија на 51 пациентка со карцином на дојката. Биле определувани концентрациите на циклофосфамидот и на неколку негови метаболити во плазмата во различни временски интервали по администрирањето, користејќи течна хроматографија и масена спектрометрија (LCMS). Генотипизацијата била извршена на 11 гени чии продукти се вклучени во метаболизмот на циклофосфамид и го вклучуваат генот *GSTP1*. Според авторите на публикацијата, определуваните генетски полиморфизми имаат само минорно влијание врз адјувантната терапија на карциномот на дојката со циклофосфамид и антрациклини.

Отсуство на генетска поврзаност е соопштена и од Islam соp. (Islam et al., 2015). Во таа студија, испитувани се полиморфизмите *GSTP1* rs1695 и *ABCC4* rs9561778, како и појавата на токсични ефекти при хемотерапијата со циклофосфамид, епирубицин и 5-флуороурацил кај 256 пациентки со карцином на дојката. Особено интересно е дека полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* не покажал поврзаност со ниту еден тип или градус на токсичност, за разлика од полиморфизмот *ABCC4* rs9561778. Интересно е што полиморфизмот *GSTP1* rs1695 покажал статистички високо значајна поврзаност со терапевтскиот одговор кај пациентите.

Таквите контрадикторни резултати не се невообичаени кај генетско-асоцијативните студии и можат да се предизвикани од низа независни фактори, вклучувајќи ги: инхерентната генетска контитуција која произлегува од етничката-демографската структура на полупацијата пациенти која е испитувана во студијата, но, и разни надворешни фактори какви што се географското поднебје, исхраната, експонираноста кон енвайронментални загадувања и случни, често слабо проучени, влијанија (Pinto et al., 2009; O'Donnell et al., 2009; Leong et al., 2010).

Покрај генетските полиморфизми, и други фактори какви што се состојбата на болните, нивната телесна тежина, возраста, исхраната, стресот, како и циркадијалните и сезонските варијации, можат значително да влијаат врз базалното ниво на ензимската активност и со тоа, врз метаболизмот на циклофосфамид

(Forrester et al., 1992). Идентифицирањето на факторите кои влијаат врз метаболизмот на циклофосфамидот и доксорубицинот можат да има клучна клиничка важност и досега се извршени голем број студии со користење на геномски анализи и microarray-базирана технологија за таа цел (Weigelt et al., 2012; Horak et al., 2013).

Комплексните, тешко забележливи интеракции меѓу овие генетски и надворешни фактори се најверојатната причина за разноликоста во резултатите од сличните студии.

Потребни се дополнителни истражувања за да се потврди генетската асоцијација и да се процени попрецизно предиктивната вредност на полиморфизмот *GSTP1* rs1695 со што истиот може да има потенцијално практична примена во персонализираната медицина, односно да се користи при изборот и дозирањето на хемотерапевтиците според индивидуалната генотипска комбинација кај секој поединечен пациент. Со таквиот пристап, може да се редуцира веројатноста од појавата на сериозни токсични ефекти, каква што е леукопенијата и неутропенијата, со своите потенцијално животозагрозувачки последици и компликации, како и да се намали морбидитетот и морталитетот поврзан со хемотерапијата (Jamieson et al., 2014).

Иако со релативно низок број на испитаници, резултатите од нашата студија се во прилог на растечката употреба на испитувањето на генските полиморфизми поврзани со цитостатици во регионални популации на пациенти. Во тој смисол, идентификацијата на специфичните функционални варијанти на овие два испитувани гени кои се поврзани со определени типови на токсични ефекти, а за кои дополнително постојат литературни податоци дека се поврзани и со ефикасноста при нивната употреба, можат да бидат користени за непосреден скрининг на пациенти пред почнување на терапијата. Предикцијата на токсичните ефекти може да помогне да се редуцира нивната појава преку администрирање на пониски дози, како и поригорозна контрола на определени параметри, како и профилактична терапија или поагресивна при појавата на првите симптоми поврзани со токсичноста. Индивидуален избор, дозирање и определување на тераписката шема за секој пациент, засебно, а врз основа на анализиран панел на генетски полиморфизми е предложен од страна на повеќе автори (Buysse et al., 2013; Westbrook et al., 2013; Cocco et al., 2016).

Сето ова укажува дека овие генетски маркери во комбинација со други клинички и молекуларни фактори можат да бидат корисни во предвидувањето на ризикот од фебрилна неутропенија и за оние со низок ризик, профилактички CSF не

може да бидат потребни. Секако, овие резултати треба дополнително да се потврдат и со дополнителни независни студии со вклучување на поголем број испитануички, како и да се валидираат, пред да се дадат клинички препораки за нивна употреба.

Со таквиот индивидуален пристап кон пациентот би се овозможило поефективно и порационално користење на економските ресурси во здравството, со што ќе се отвори и патот за персонализирана медицина при адјувантната хемотерапија на карциномот на дојката во Република Северна Македонија.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

Во оваа студија, извршена е анализа на генетската поврзаност на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и на rs20325282 во генот *ABCB1*, поединечно, како и на нивната комбинација, со појавата на токсичните ефекти и нузпојави кај група од 178 пациентки со карцином на дојката во текот и непосредно по комбинираната адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин.

Врз основа на добиените резултати од оваа студија, обемената анализа, како и критичното споредување со достапната литература, можат да се донесат следниве заклучоци:

1. Во испитуваната група на пациентки, најзастапена нузпојава е анемијата поврзана со хемотерапијата која е регистрирана кај 28,28%. Фебрилна состојба (според користените критериуми) биле регистрирани кај 8,99%, а фебрилната неутропенија кај 5,06% од пациентките. Оралниот мукозитис е идентифициран кај 9,55%, додека најретко била застапена тромбоцитопенијата која се појавила кај 6,36% од испитаниците.

Токсичните ефекти кај кои е најдена сигнификантна генетска поврзаност со испитуваните полиморфизми rs1695 во генот *GSTP1* и/или со rs20325282 во генот *ABCB1*, се однесуваат на анемија поврзана со хемотерапијата, фебрилна неутропенија, фебрилна состојба и орален мукозитис. Не е најдена генетска поврзаност на полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1* со појавата на тромбоцитопенија.

2. Анемија поврзана со хемотерапијата е регистрирана кај вкупно 43,64% од испитуваната група на пациентки со карцином на дојката и најдена е генетска поврзаност со полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*. Пациентките кои се носители на хомозиготниот варијантен генотип GG на овој полиморфизам имаат околу 2,6 пати повисока веројатност од појава на анемија поврзана со хемотерапијата во однос на пациентките носители на дивниот генотип AA или на хетерозиготите AG ($p < 0,05$). Не е најдена генетска поврзаност со полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* со билокусен ефект на двата полиморфизма, истовремено.

3. Носителите на генотиповите AA, AT или TT полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат околу 4,5 пати повисока веројатност за појава на фебрилна состојба во текот на третманот со комбинираната хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин, во однос на пациентките носители на генотиповите GG, GA или GT ($p < 0,01$). Таквата поврзаност не е најдена кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* ($p > 0,05$) ниту со истовремениот ефект на двата полиморфизма.

4. Во однос на фебрилната неутропенија во текот на третманот, носителите на генотиповите AA, AT или TT од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат повеќе од 9 пати повисока веројатност од појава на оваа состојба при третманот со наведените хемотерапевтици во однос на пациентките носители на генотиповите GG, GA или GT ($p < 0,01$). Носителите на варијантните алели (A или T) на овој полиморфизам имаат околу 3,7 пати повисока веројатност за појава на фебрилна неутропенија во однос на пациентките носители на дивниот алел G ($p < 0,01$).

Кај полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1*, носителите на варијантниот алел G имаат приближно 2,7 пати повисока веројатност за појава на фебрилна неутропенија во однос на пациентките со дивниот алел A ($p < 0,05$). Не е идентифициран билокусен ефект на двата испитувани полиморфизми, истовремено, со оваа нулпојава.

5. Носителите на генотиповите GA или GT на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат 0,275 пати (72,5%) пониска веројатност да развијат кој било градус на орален мукозитис, односно делуваат протективно во споредба со носителите на генотиповите GG, AA, AT или TT, при што разликите се сигнификантни ($p < 0,05$). Слична протективна улога имаат истите полиморфизми и кај регистрираните случаи на орален мукозитис со градус 1.

За разлика од тоа, полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* не покажува статистички значајна поврзаност со појавата на вкупниот број на пациентки со орален мукозитис, како и со градус 1 од оваа несакана појава при третманот со наведените хемотерапевтици кај ($p > 0,05$). Генотиповите AA или GG на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* се разликуваат сигнификантно од тие на носителите на генотипот AG во однос на појавата на орален мукозитис со градус 2 ($p < 0,05$).

Во однос на билокусниот, комбиниран ефект на двата полиморфизма, истовремено, носителите на генотипот AA од полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* и на генотипот GG од полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* имаат 0,106 пати (89,4%) помали шанси за клинички релевантен орален мукозитис во однос на

останатите комбинации на генотипови од двата генски полиморфизми, при што разликите се сигнификантни ($p < 0,05$).

б. Резултатите од нашата студија покажуваат дека полиморфизмите rs1695 во генот *GSTP1* и rs20325282 во генот *ABCB1* имаат потенцијал, по соодветната валидација, да се користат како генетски маркери за предикцијата на ризикот од појава на повеќе токсични ефекти и нузпојави при комбинираната адјувантна хемотерапија со циклофосфамид и доксорубицин кај пациентки со карцином на дојката.

Генотипизацијата на полиморфизмот rs1695 во генот *GSTP1* може да помогне во предикцијата на зголемениот ризик од развој на анемија поврзана со хемотерапијата и фебрилна неутропенија, додека определувањето на полиморфизмот rs20325282 во генот *ABCB1* може да ги идентифицира пациентките со повисок ризик од појава на фебрилна состојба и фебрилна неутропенија. И двата полиморфизма, како и нивната комбинација, можат да бидат предиктори за намален ризик, односно за протективен ефект од појава на орален мукозитис (градус 1 и 2).

На тој начин, овие генски полиморфизми, можат да бидат користени за прилагодување и персонализирање на хемотерапијата според индивидуалната генотипска комбинација кај секој поединечен пациент.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Abe H, Mori T, Kawai Y, Cho H, Kubota Y, Umeda T, Kurumi Y, Tani T. Feasibility and toxicity of docetaxel before or after fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2013; 18(3):487-91. doi: 10.1007/s10147-012-0407-7.
2. Ahmed JH, Makonnen E, Bisaso RK, Mukonzo JK, Fotoohi A, Aseffa A, Howe R, Hassan M, Aklillu E. Population Pharmacokinetic, Pharmacogenetic, and Pharmacodynamic Analysis of Cyclophosphamide in Ethiopian Breast Cancer Patients. *Front Pharmacol.* 2020; 11:406. doi: 10.3389/fphar.2020.00406.
3. Arakawa Y, Shirai Y, Hayashi K, Tanaka Y, Matsumoto A, Nishikawa K, Yano S. Effects of gene polymorphisms on the risk of severe hyponatremia during DCF chemotherapy for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018 Oct;16(4):5455-5462. doi: 10.3892/ol.2018.9236.
4. Bennett CL, Djulbegovic B, Norris LB, Armitage JO. Colony-stimulating factors for febrile neutropenia during cancer therapy. *N Engl J Med.* 2013; 368(12):1131-9. doi: 10.1056/NEJMct1210890.
5. Biganzoli L, Cufer T, Bruning P, Coleman R, Duchateau L, Calvert AH, Gamucci T, Twelves C, Fargeot P, Epelbaum R, Lohrisch C, Piccart MJ. Doxorubicin and paclitaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: The European Organization for Research and Treatment of Cancer 10961 Multicenter Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20(14):3114-21.
6. Blackhall FH, Howell S, Newman B. Pharmacogenetics in the management of breast cancer -- prospects for individualised treatment. *Fam Cancer.* 2006; 5(2): 151-7. doi: 10.1007/s10689-005-3241-5.
7. Blohmer JU, Schmid P, Hilfrich J, Friese K, Kleine-Tebbe A, Koelbl H, Sommer H, Morack G, Wischnewsky MB, Lichtenegger W, Kuemmel S. Epirubicin and cyclophosphamide versus epirubicin and docetaxel as first-line therapy for women with metastatic breast cancer: final results of a randomised phase III trial. *Ann Oncol.* 2010; 21(7):1430-5. doi: 10.1093/annonc/mdp585.
8. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med.* 1995; 332(14):901-6. doi: 10.1056/NEJM199504063321401.
9. Bonadonna G, Zambetti M, Moliterni A, Gianni L, Valagussa P. Clinical relevance of different sequencing of doxorubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and Fluorouracil in operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22(9):1614-20.
10. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, Allan JM, Parmar MK, Quirke P, Seymour MT. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol.* 2009; 27(33):5519-28. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6283.
11. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, Boddy AV. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer.* 2010; 102(6):1003-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605587.

12. Brown SA, Sandhu N, Herrmann J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(12):718-31. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.168.
13. Buchholz TA, Stivers DN, Stec J, Ayers M, Clark E, Bolt A, Sahin AA, Symmans WF, Hess KR, Kuerer HM, Valero V, Hortobagyi GN, Pusztai L. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *Cancer J*. 2002; 8(6):461-8.
14. Buyse M, Michiels S. Omics-based clinical trial designs. *Curr Opin Oncol*. 2013; 25(3):289-95. doi: 10.1097/CCO.0b013e32835ff2fe.
15. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.
16. Chang AE, Wu QV, Jenkins IC, Specht JM, Gadi VK, Gralow JR, Salazar LG, Kurland BF, Linden HM. Phase I/II Trial of Combined Pegylated Liposomal Doxorubicin and Cyclophosphamide in Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2017. pii: S1526-8209(17)30280-X. doi: 10.1016/j.clbc.2017.10.005.
17. Chang H, Rha SY, Jeung HC, Im CK, Ahn JB, Kwon WS, Yoo NC, Roh JK, Chung HC. 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):272-7. doi: 10.1093/annonc/mdn624.
18. Chaturvedi P, Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Agarwal S, Mittal RD, Mittal B. Influence of ABCB1 genetic variants in breast cancer treatment outcomes. *Cancer Epidemiol*. 2013; 37(5):754-61. doi: 10.1016/j.canep.2013.04.012.
19. Chen B, Fang J, Zhang W, Jin Z, Yu Z, Cai W. Detection of C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphism of MDR1 by amplification refractory mutation system PCR. *J Clin Lab Anal*. 2009; 23(2):110-6. doi: 10.1002/jcla.20299.
20. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A; WHI Investigators. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*. 2003; 289(24):3243-53.
21. Choi JY, Nowell SA, Blanco JG, Ambrosone CB. The role of genetic variability in drug metabolism pathways in breast cancer prognosis. *Pharmacogenomics*. 2006; 7(4):613-24. doi: 10.2217/14622416.7.4.613.
22. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, Zhang H, McLellan M, Yau C, Kandoth C, Bowlby R, Shen H, Hayat S, Fieldhouse R, Lester SC, Tse GM, Factor RE, Collins LC, Allison KH, Chen YY, Jensen K, Johnson NB, Oesterreich S, Mills GB, Cherniack AD, Robertson G, Benz C, Sander C, Laird PW, Hoadley KA, King TA; TCGA Research Network, Perou CM. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*. 2015; 163(2): 506-19. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.033.
23. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, Habalova V, Kohut A, Linkova A, Sarissky M, Mojzic J, Mirossay L, Mirossay A. MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J*. 2010; 10(1):62-9. doi: 10.1038/tpj.2009.41.
24. Cleeland CS, Allen JD, Roberts SA, Brell JM, Giralt SA, Khakoo AY, Kirch RA, Kwitkowski VE, Liao Z, Skillings J. Reducing the toxicity of cancer therapy:

- recognizing needs, taking action. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012; 9(8):471-8. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.99.
25. Cocca M, Bedognetti D, La Bianca M, Gasparini P, Girotto G. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *J Transl Med*. 2016; 14:22. doi: 10.1186/s12967-016-0778-z.
 26. de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*. 2005; 44(11):1135-64. doi: 10.2165/00003088-200544110-00003.
 27. Dirven HA, van Ommen B, van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res*. 1994; 54(23):6215-20.
 28. Dockham PA, Lee MO, Sladek NE. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem Pharmacol*. 1992; 43(11):2453-69.
 29. Dranitsaris G, Clemons M, Verma S, Lau C, Vincent M. Chemotherapy-induced anaemia during adjuvant treatment for breast cancer: development of a prediction model. *Lancet Oncol*. 2005; 6(11):856-63. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70394-6.
 30. Eiermann W, Pienkowski T, Crown J, Sadeghi S, Martin M, Chan A, Saleh M, Sehdev S, Provencher L, Semiglazov V, Press M, Sauter G, Lindsay MA, Riva A, Buyse M, Drevot P, Taupin H, Mackey JR. Phase III study of doxorubicin/cyclophosphamide with concomitant versus sequential docetaxel as adjuvant treatment in patients with human epidermal growth factor receptor 2-normal, node-positive breast cancer: BCIRG-005 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29(29):3877-84. doi: 10.1200/JCO.2010.28.5437.
 31. Erdélyi DJ, Kámory E, Zalka A, Semsei AF, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Borgulya G, Magyarosy E, Galántai I, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovács GT. The role of ABC-transporter gene polymorphisms in chemotherapy induced immunosuppression, a retrospective study in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Immunol*. 2006; 244(2):121-4. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.02.007.
 32. Evans TR, Yellowlees A, Foster E, Earl H, Cameron DA, Hutcheon AW, Coleman RE, Perren T, Gallagher CJ, Quigley M, Crown J, Jones AL, Highley M, Leonard RC, Mansi JL. Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. *J Clin Oncol*. 2005; 23(13):2988-95.
 33. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. 11th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013. <http://globocan.iarc.fr>. Пристапено на 19.6.2016 г.
 34. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013; 49(6):1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.

35. Ferreira RJ, dos Santos DJ, Ferreira MJ. P-glycoprotein and membrane roles in multidrug resistance. *Future Med Chem.* 2015; 7(7):929-46. doi: 10.4155/fmc.15.36.
36. Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, Kitteringham NR, McLaren AW, Miles JS, Skett P, et al. Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem J.* 1992; 281 (Pt 2):359-68.
37. Franke RM, Gardner ER, Sparreboom A. Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(2):220–30. doi: 10.2174/138161210790112683.
38. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(5):860–71. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.014.
39. Gatti DM, Weber SN, Goodwin NC, Lammert F, Churchill GA. Genetic background influences susceptibility to chemotherapy-induced hematotoxicity. *Pharmacogenomics J.* 2017. doi: 10.1038/tpj.2017.23.
40. Gatti DM, Weber SN, Goodwin NC, Lammert F, Churchill GA. Genetic background influences susceptibility to chemotherapy-induced hematotoxicity. *Pharmacogenomics J.* 2018; 18(2): 319-330. doi: 10.1038/tpj.2017.23.
41. Ge J, Tian AX, Wang QS, Kong PZ, Yu Y, Li XQ, Cao XC, Feng YM. The GSTP1 105Val allele increases breast cancer risk and aggressiveness but enhances response to cyclophosphamide chemotherapy in North China. *PLoS One.* 2013; 8(6):e67589. doi: 10.1371/journal.pone.0067589.
42. Goldstein LJ, O'Neill A, Sparano JA, Perez EA, Shulman LN, Martino S, Davidson NE. Concurrent doxorubicin plus docetaxel is not more effective than concurrent doxorubicin plus cyclophosphamide in operable breast cancer with 0 to 3 positive axillary nodes: North American Breast Cancer Intergroup Trial E 2197. *J Clin Oncol.* 2008; 26(25):4092-9. doi: 10.1200/JCO.2008.16.7841.
43. González-Neira A. Pharmacogenetics of chemotherapy efficacy in breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2012; 13(6):677-90. doi: 10.2217/pgs.12.44.
44. Gor PP, Su HI, Gray RJ, Gimotty PA, Horn M, Aplenc R, Vaughan WP, Tallman MS, Rebbeck TR, DeMichele A. Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(3):R26. doi: 10.1186/bcr2570.
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
46. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30(6):445-600.
47. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E 3rd, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):976–83. doi: 10.1200/JCO.2003.02.063.

48. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ, Rouzier R, Sneige N, Ross JS, Vidaurre T, Gómez HL, Hortobagyi GN, Pusztai L. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 10;24(26):4236-44. doi: 10.1200/JCO.2006.05.6861.
49. Horak CE, Pusztai L, Xing G, Trifan OC, Saura C, Tseng LM, Chan S, Welcher R, Liu D. Biomarker analysis of neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or Paclitaxel in early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(6):1587-95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1359.
50. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jan-Feb;59(1):42-55. doi: 10.3322/caac.20002.
51. Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(1):183–201. doi: 10.1007/s10555-007-9050-6.
52. Huang Z, Roy P, Waxman DJ. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(8):961-72.
53. Ikeda M, Tsuji D, Yamamoto K, Kim YI, Daimon T, Iwabe Y, Hatori M, Makuta R, Hayashi H, Inoue K, Nakamichi H, Shiokawa M, Itoh K. Relationship between ABCB1 gene polymorphisms and severe neutropenia in patients with breast cancer treated with doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015; 30(2):149-53. doi: 10.1016/j.dmpk.2014.09.009.
54. Inada M, Sato M, Morita S, Kitagawa K, Kawada K, Mitsuma A, Sawaki M, Fujita K, Ando Y. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010; 48(11):729-34.
55. Islam MS, Islam MS, Parvin S, Ahmed MU, Bin Sayeed MS, Uddin MM, Hussain SM, Hasnat A. Effect of GSTP1 and ABCC4 gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients. *Tumour Biol.* 2015; 36(7):5451-7. doi: 10.1007/s13277-015-3211-y.
56. Jamieson D, Lee J, Cresti N, Jackson R, Griffin M, Sludden J, Verrill M, Boddy AV. Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014; 74(4):667-74. doi: 10.1007/s00280-014-2541-6.
57. Jeibouei S., Akbari M.E., Kalbasi A., Aref A.R., Ajoudanian M., Rezvani A., Zali H. Personalized medicine in breast cancer: Pharmacogenomics approaches. *Pharmacogenomics Pers. Med.* 2019; 12:59–73. doi: 10.2147/PGPM.S167886.
58. Jereczek-Fossa B, Jassem J, Karnicka-Młodkowska H, Badzio A, Moś-Antkowiak R, Krawczyk K, Kowal E, Pilarska-Machowicz A, Radzikowska E, Malak K. Does chemotherapy-induced leukopenia predict a response in small-cell lung cancer? *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998; 124(2):106-12. doi: 10.1007/s004320050141.
59. Ji M, Tang J, Zhao J, Xu B, Qin J, Lu J. Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13(5):264-71. doi: 10.4161/cbt.18920.

60. Jones RL, Walsh G, Ashley S, Chua S, Agarwal R, O'Brien M, Johnston S, Smith IE. A randomised pilot Phase II study of doxorubicin and cyclophosphamide (AC) or epirubicin and cyclophosphamide (EC) given 2 weekly with pegfilgrastim (accelerated) vs 3 weekly (standard) for women with early breast cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100(2):305-10. doi: 10.1038/sj.bjc.6604862.
61. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2010; 10(1):54-61. doi: 10.1038/tpj.2009.45.
62. Kim CG, Sohn J, Chon H, Kim JH, Heo SJ, Cho H, Kim IJ, Kim SI, Park S, Park HS, Kim GM. Incidence of Febrile Neutropenia in Korean Female Breast Cancer Patients Receiving Preoperative or Postoperative Doxorubicin/Cyclophosphamide Followed by Docetaxel Chemotherapy. *J Breast Cancer*. 2016; 19(1):76-82. doi: 10.4048/jbc.2016.19.1.76.
63. Kirshner J, Hatch M, Hennessy DD, Fridman M, Tannous RE. Anemia in stage II and III breast cancer patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy. *Oncologist*. 2004; 9(1): 25-32. doi: 10.1634/theoncologist.9-1-25.
64. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2002; 22(1):13-30.
65. Kuderer NM, Dale DC, Crawford J, Cosler LE, Lyman GH. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. *Cancer*. 2006; 106(10):2258-66. doi: 10.1002/cncr.21847.
66. Kuderer NM, Dale DC, Crawford J, Lyman GH. Impact of primary prophylaxis with granulocyte colony-stimulating factor on febrile neutropenia and mortality in adult cancer patients receiving chemotherapy: a systematic review. *J Clin Oncol*. 2007; 25(21):3158-67. doi: 10.1200/JCO.2006.08.8823.
67. Kudzi W, Dodoo AN, Mills JJ. Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans?. *BMC Med Genet*. 2010; 11:111. doi: 10.1186/1471-2350-11-111.
68. 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.
69. Lal S, Wong ZW, Jada SR, Xiang X, Chen Shu X, Ang PC, Figg WD, Lee EJ, Chowbay B. Novel SLC22A16 polymorphisms and influence on doxorubicin pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6):567-75. doi: 10.2217/14622416.8.6.567.
70. Lavanderos MA, Cayún JP, Roco Á, Sandoval C, Cerpa L, Rubilar JC, Cerro R, Molina-Mellico S, Celedón C, Cerda B, García-Martín E, Agúndez JAG, Acevedo C, Peña K, Cáceres DD, Varela NM, Quiñones LA. Association Study Among Candidate Genetic Polymorphisms and Chemotherapy-Related Severe Toxicity in Testicular Cancer Patients. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 206. doi: 10.3389/fphar.2019.00206.
71. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(10):3050-6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2076.

72. Leong SP, Shen ZZ, Liu TJ, Agarwal G, Tajima T, Paik NS, Sandelin K, Derossis A, Cody H, Foulkes WD. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J Surg.* 2010; 34(10):2308-24. doi: 10.1007/s00268-010-0683-1.
73. Li S, Lang GT, Zhang YZ, Yu KD, Shao ZM, Zhang Q. Interaction between glutathione S-transferase M1-null/present polymorphism and adjuvant chemotherapy influences the survival of breast cancer. *Cancer Med.* 2018; 7:4202–7. doi: 10.1002/cam4.1567.
74. Liu W, Zhang CC, Li K. Prognostic value of chemotherapy-induced leukopenia in small-cell lung cancer. *Cancer Biol Med.* 2013; 10(2): 92-8. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2013.02.005.
75. Loesch D, Greco FA, Senzer NN, Burris HA, Hainsworth JD, Jones S, Vukelja SJ, Sandbach J, Holmes F, Sedlacek S, Pippen J, Lindquist D, McIntyre K, Blum JL, Modiano MR, Boehm KA, Zhan F, Asmar L, Robert N. Phase III multicenter trial of doxorubicin plus cyclophosphamide followed by paclitaxel compared with doxorubicin plus paclitaxel followed by weekly paclitaxel as adjuvant therapy for women with high-risk breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(18):2958-65. doi: 10.1200/JCO.2009.24.1000.
76. Low SK, Kiyotani K, Mushiroda T, Daigo Y, Nakamura Y, Zembutsu H. Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J Hum Genet.* 2009; 54(10):564-71. doi: 10.1038/jhg.2009.79.
77. Lyman GH, Dale DC, Tomita D, Whittaker S, Crawford J. A retrospective evaluation of chemotherapy dose intensity and supportive care for early-stage breast cancer in a curative setting. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 139(3):863-72. doi: 10.1007/s10549-013-2582-2.
78. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, Wickerham DL, Yothers G, Soran A, Wolmark N. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16):3686-96.
79. Mansi JL, Yellowlees A, Lipscombe J, Earl HM, Cameron DA, Coleman RE, Perren T, Gallagher CJ, Quigley M, Crown J, Jones AL, Highley M, Leonard RC, Evans TR. Five-year outcome for women randomised in a phase III trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide with doxorubicin and docetaxel as primary medical therapy in early breast cancer: an Anglo-Celtic Cooperative Oncology Group study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 122(3):787-94. doi: 10.1007/s10549-010-0989-6.
80. Margolin S, Bengtsson NO, Carlsson L, Edlund P, Hellström M, Karlsson P, Lidbrink E, Linderholm B, Lindman H, Malmström P, Pettersson Sköld D, Söderberg M, Villman K, Bergh J; Scandinavian Breast Group Study SBG 2004-1. A randomised feasibility/phase II study (SBG 2004-1) with dose-dense/tailored epirubicin, cyclophosphamide (EC) followed by docetaxel (T) or fixed dose-dense EC/T versus T, doxorubicin and C (TAC) in node-positive breast cancer. *Acta Oncol.* 2011; 50(1):35-41. doi: 10.3109/0284186X.2010.535847.
81. Marsh S, McLeod H L. Pharmacogenetics and oncology treatment for breast cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2007; 8(2): 119-27. doi: 10.1517/14656566.8.2.119.
82. Martín M, Lluch A, Seguí MA, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, Rodríguez-Lescure A, Grosse R, Calvo L, Fernandez-Chacón C, Roset M, Antón A, Isla D, del Prado

- PM, Iglesias L, Zaluski J, Arcusa A, López-Vega JM, Muñoz M, Mel JR. Toxicity and health-related quality of life in breast cancer patients receiving adjuvant docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide (TAC) or 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (FAC): impact of adding primary prophylactic granulocyte-colony stimulating factor to the TAC regimen. *Ann Oncol*. 2006 Aug; 17(8):1205-12. doi: 10.1093/annonc/mdl135.
83. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, Camps C, Carrato A, Casado A, Candel MT, Albanell J, Aranda J, Munarriz B, Campbell J, Diaz-Rubio E; GEICAM Group (Spanish Breast Cancer Research Group), Spain. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol*. 2003; 14(6):833-42.
 84. Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev*. 1999; 25(4):237-47. doi: 10.1053/ctrv.1999.0128.
 85. Miller KD1, Soule SE, Calley C, Emerson RE, Hutchins GD, Kopecky K, Badve S, Storniolo A, Goulet R, Sledge GW Jr. Randomized phase II trial of the anti-angiogenic potential of doxorubicin and docetaxel; primary chemotherapy as Biomarker Discovery Laboratory. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 89(2):187-97. doi: 10.1007/s10549-004-2044-y.
 86. Mir O, Alexandre J, Tran A, Durand JP, Pons G, Treluyer JM, Goldwasser F. Relationship between GSTP1 Ile(105)Val polymorphism and docetaxel-induced peripheral neuropathy: clinical evidence of a role of oxidative stress in taxane toxicity. *Ann Oncol*. 2009; 20(4): 736-40. doi: 10.1093/annonc/mdn698.
 87. Moreb JS, Gabr A, Vartikar GR, Gowda S, Zucali JR, Mohuczy D. Retinoic acid down-regulates aldehyde dehydrogenase and increases cytotoxicity of 4-hydroperoxycyclophosphamide and acetaldehyde. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 312(1):339-45.
 88. Muss HB, Berry DA, Cirincione CT, Theodoulou M, Mauer AM, Kornblith AB, Partridge AH, Dressler LG, Cohen HJ, Becker HP, Kartcheske PA, Wheeler JD, Perez EA, Wolff AC, Gralow JR, Burstein HJ, Mahmood AA, Magrinat G, Parker BA, Hart RD, Grenier D, Norton L, Hudis CA, Winer EP; CALGB Investigators. Adjuvant chemotherapy in older women with early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360(20):2055-65. doi: 10.1056/NEJMoa0810266.
 89. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 NCI, NIH, NIH Publication No. 09-5410, DHHS, 2010.
 90. Nowak AK, Wilcken NR, Stockler MR, Hamilton A, Ghersi D. Systematic review of taxane-containing versus non-taxane-containing regimens for adjuvant and neoadjuvant treatment of early breast cancer. *Lancet Oncol*. 2004; 5(6):372-80. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01494-9.
 91. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol*. 2018; 9: 245. doi: 10.3389/fphar.2018.00245.
 92. O'Donnell PH, Dolan ME. Cancer pharmacoethnicity: ethnic differences in susceptibility to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(15):4806-14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0344.

93. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, et al, and Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012; 379(9814):432-44. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61625-5.
94. Pinto N, Ludeman SM, Dolan ME. Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(12):1897-903. doi: 10.2217/pgs.09.134.
95. Prieto-Callejero B, Rivera F, Fagundo-Rivera J, Romero A, Romero-Martín M, Gómez-Salgado J, Ruiz-Frutos C. Relationship between chemotherapy-induced adverse reactions and health-related quality of life in patients with breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(33):e21695. doi: 10.1097/MD.00000000000021695. PMID: 32872042; PMCID: PMC7437745.
96. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014; 10(4):853-8. doi: 10.4103/0973-1482.139267.
97. Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, Fillion A, Bittencourt H, Silva W Jr, Vilela G, Zanette DL, Ferry C, Larghero J, Devergie A, Ribaud P, Skvortsova Y, Tamouza R, Gluckman E, Socie G, Zago MA. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia*. 2009; 23(3):545-56. doi: 10.1038/leu.2008.323.
98. Rollinson S, Allan JM, Law GR, Roddam PL, Smith MT, Skibola C, Smith AG, Forrest MS, Sibley K, Higuchi R, Germer S, Morgan GJ. High-throughput association testing on DNA pools to identify genetic variants that confer susceptibility to acute myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13(5):795-800.
99. Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos*. 1999; 27(6):655-66.
100. Salsman JM, Grunberg SM, Beaumont JL, Rogers M, Paul D, Clayman ML, Cella D. Communicating about chemotherapy-induced nausea and vomiting: a comparison of patient and provider perspectives. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012; 10(2): 149-57. doi: 10.6004/jnccn.2012.0018.
101. Schärfe CP, Tremmel R, Schwab M, Kohlbacher O, Marks DS. Genetic variation in human drug-related genes. *Genome Med*. 2017; 9(1): 117. doi: 10.1186/s13073-017-0502-5.
102. Sharma A, Pandey A, Sharma S, Chatterjee I, Mehrotra R, Sehgal A, Sharma JK. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations. *Meta Gene*. 2014; 2:134-42. doi: 10.1016/j.mgene.2013.12.003.
103. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 270(1):414-23.

104. Sissung TM, Mross K, Steinberg SM, Behringer D, Figg WD, Sparreboom A, Mielke S. Association of ABCB1 genotypes with paclitaxel-mediated peripheral neuropathy and neutropenia. *Eur J Cancer*. 2006; 42:2893–6. doi: 10.1016/j.ejca.2006.06.017.
105. Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW Jr, Wood WC, Davidson NE. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(16):1663-71. doi: 10.1056/NEJMoa0707056.
106. Sugishita M, Imai T, Kikumori T, Mitsuma A, Shimokata T, Shibata T, Morita S, Inada-Inoue M, Sawaki M, Hasegawa Y, Ando Y. Pharmacogenetic association between GSTP1 genetic polymorphism and febrile neutropenia in Japanese patients with early breast cancer. *Breast Cancer*. 2016; 23(2):195-201. doi: 10.1007/s12282-014-0547-x.
107. Tabchy A, Valero V, Vidaurre T, Lluch A, Gomez H, Martin M, Qi Y, Barajas-Figueroa LJ, Souchon E, Coutant C, Doimi FD, Ibrahim NK, Gong Y, Hortobagyi GN, Hess KR, Symmans WF, Pusztai L. Evaluation of a 30-gene paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy response predictor in a multicenter randomized trial in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(21):5351-61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1265.
108. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65(2):157-70. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
109. Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(24):8027-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0993.
110. Tecza K, Pamula-Pilat J, Lanuszewska J, Butkiewicz D, Grzybowska E. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2018; 9(10): 9114-36. doi: 10.18632/oncotarget.24148.
111. Thorn C, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(7):440–6. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
112. Tran A, Bournerias F, Le Beller C, Mir O, Rey E, Pons G, Delahousse M, Tréluyer JM. Serious haematological toxicity of cyclophosphamide in relation to CYP2B6, GSTA1 and GSTP1 polymorphisms. *Br J Clin Pharmacol*. 2008; 65(2):279-80. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03020.x.
113. Tran A, Jullien V, Alexandre J, Rey E, Rabillon F, Girre V, Dieras V, Pons G, Goldwasser F, Tréluyer JM. Pharmacogenetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1, and GST polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 79(6):570–80. doi: 10.1016/j.clpt.2006.02.003.
114. Tsai SM, Lin CY, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY, Hou MF. Side effects after docetaxel treatment in Taiwanese breast cancer patients with CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 gene polymorphisms. *Clin Chim Acta*. 2009; 404(2):160-5. doi: 10.1016/j.cca.2009.03.038.
115. Tsuji D, Ikeda M, Yamamoto K, Nakamori H, Kim YI, Kawasaki Y, Otake A, Yokoi M, Inoue K, Hirai K, Nakamichi H, Tokou U, Shiokawa M, Itoh K. Drug-related genetic polymorphisms affecting severe chemotherapy-induced

- neutropenia in breast cancer patients: A hospital-based observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(44):e5151. doi: 10.1097/MD.00000000000005151.
116. Tulsyan S, Chaturvedi P, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, Mittal B. Pharmacogenetic influence of GST polymorphisms on anthracycline-based chemotherapy responses and toxicity in breast cancer patients: a multi-analytical approach. *Mol Diagn Ther*. 2013; 17(6):371-9. doi: 10.1007/s40291-013-0045-4.
117. Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmgenomics Pers Med*. 2016; 9:47-58. doi: 10.2147/PGPM.S86672.
118. Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmgenomics Pers Med*. 2016; 9: 47-58. doi: 10.2147/PGPM.S86672.
119. Turner N, Biganzoli L, Di Leo A. Continued value of adjuvant anthracyclines as treatment for early breast cancer. *Lancet Oncol*. 2015; 16(7):e362-9. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00079-0.
120. Udler M, Maia AT, Cebrian A, Brown C, Greenberg D, Shah M, Caldas C, Dunning A, Easton D, Ponder B, Pharoah P. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(21):3015-23. doi: 10.1200/JCO.2006.10.0099.
121. von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M; German Breast Group. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(8):552-62. doi: 10.1093/jnci/djn089.
122. von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Kaufmann M. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*. 2005; 23(12):2676-85.
123. Vriens BE, Aarts MJ, de Vries B, van Gastel SM, Wals J, Smilde TJ, van Warmerdam LJ, de Boer M, van Spronsen DJ, Borm GF, Tjan-Heijnen VC; Breast Cancer Trialists' Group of the Netherlands (BOOG). Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. *Eur J Cancer*. 2013; 49(15):3102-10. doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.012.
124. Vulsteke C, Lambrechts D, Dieudonné A, Hatse S, Brouwers B, van Brussel T, et al. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-)adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). *Ann Oncol*. 2013; 24(6):1513-25. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdt008>.
125. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadeé W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C> T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(10):693-704. doi: 10.1097/01.fpc.0000178311.02878.83.

126. Wang J, Wang T, Yin GY, Yang L, Wang ZG, Bu XB. Glutathione S-transferase polymorphisms influence chemotherapy response and treatment outcome in breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015; 14(3):11126-32. doi: 10.4238/2015.September.22.6.
127. Weigelt B, Reis-Filho JS, Swanton C. Genomic analyses to select patients for adjuvant chemotherapy: trials and tribulations. *Ann Oncol.* 2012; 23 Suppl 10:x211-8. doi: 10.1093/annonc/mds323.
128. Westbrook K, Stearns V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. *Pharmacol Ther.* 2013; 139(1):1-11. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.03.001.
129. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92(4):414-7. doi: 10.1038/clpt.2012.96.
130. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet.* 2015; 54(7):709-35. doi: 10.1007/s40262-015-0267-1.
131. Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, Lyss AP, Osborne CK, Abeloff M, Hortobagyi GN, Hayes DF, Ambrosone CB. Gene polymorphisms in cyclophosphamide metabolism pathway, treatment-related toxicity, and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(24):6169-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0281.
132. Yao S, Sucheston LE, Zhao H, Barlow WE, Zirpoli G, Liu S, Moore HC, Thomas Budd G, Hershman DL, Davis W, Ciupak GL, Stewart JA, Isaacs C, Hobday TJ, Salim M, Hortobagyi GN, Gralow JR, Livingston RB, Albain KS, Hayes DF, Ambrosone CB. Germline genetic variants in ABCB1, ABCC1 and ALDH1A1, and risk of hematological and gastrointestinal toxicities in a SWOG Phase III trial S0221 for breast cancer. *Pharmacogenomics J.* 2014; 14(3):241-7. doi: 10.1038/tj.2013.32.
133. Zárate R, González-Santiago S, de la Haba J, Bandres E, Morales R, Salgado J, Gómez A, Aranda E, García-Foncillas J. GSTP1 and MTHFR polymorphisms are related with toxicity in breast cancer adjuvant anthracycline-based treatment. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(5):481-6.
134. Zhang BL, Sun T, Zhang BN, Zheng S, Lü N, Xu BH, Wang X, Chen GJ, Yu DK, Lin DX. Polymorphisms of GSTP1 is associated with differences of chemotherapy response and toxicity in breast cancer. *Chin Med J (Engl).* 2011; 124(2):199-204.
135. Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, Chuen Li S, Zhou S, Duan W, Zhu YZ. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev.* 2005; 37(4):611-703.
136. Zhang J, Tian Q, Zhou S-H. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Current Drug Therapy.* 2006; (1)1:55-84. doi: 10.2174/157488506775268515.
137. Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M, Duan W, Chan E, Zhou SF. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 62(4):457-72.