

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Prognosztikai faktorok és a kezelés során fellépő mellékhatásokat befolyásoló tényezők vizsgálata gyermekkori akut limfoid leukémiában és oszteoszarkómában



Dr. Kovács Gábor

Semmelweis Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika

Budapest

2017

Tartalom

Rövidítésjegyzék	3
I. Bevezetés.....	7
II. Irodalmi összefoglalás.....	9
II/1. Prognosztikai faktorok.....	9
II/2. Farmakokinetika, toxicitás	14
II/3. Farmakogenetika	32
III. Célkitűzések	48
IV. Betegek, módszerek	50
IV/1. Prognosztikai tényezők vizsgálata	50
IV/2. A HD-MTX toxicitása és farmakokinetikája gyermekkori ALL-ben és OSC-ban	54
IV/3. Farmakogenetikai vizsgálatok gyermekkori ALL-ben és OSC-ban	59
V. Eredmények.....	70
V/1. Prognosztikai tényezők	70
V/2. MTX farmakokinetikai és toxicitási vizsgálatok.....	83
V/3. Farmakogenetikai vizsgálatok.....	108
VI. Megbeszélés, következtetések.....	142
VI/1/1. Prognosztikai faktorok vizsgálata gyermekkori ALL-ben.....	142
VI/1/2. Prognosztikai faktorok vizsgálata gyermekkori OSC-ban.....	146
VI/2. Farmakokinetikai vizsgálatok	148
VI/3. Farmakogenetikai vizsgálatok.....	156
VII. Összefoglalás és eredményeink klinikai hasznosítása	183
VIII. A dolgozat legfontosabb (új) megállapításai	185
IX. Köszönetnyilvánítás	188
X. Irodalomjegyzék	190

Rövidítésjegyzék

7-OH-MTX: 7-hidroxi-metotrexát
ACE: angiotenzin konvertáló enzim
ACO1: akonitáz 1
ACTL6A: aktin-szerű fehérje 6A
AF: aktiváló funkció
AICAR: 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid
AL: akut leukémia
ALC: abszolút limfocita szám
ALL: akut limfoid leukémia
AKR1A1: Aldo-keto reduktáz 1-es család, A1 tag
AMP: adenozin monofoszfát
AP1: transzkripció faktor
ARID: „AT-rich interaction domain”
ATP2A2: ATPase, Ca⁺⁺ transporting, „cardiac muscle, slow twitch 2”
ATP5J: ATP szintetáz „coupling factor 5”
AUC: görbe alatti terület
BCRP: „breast cancer resistance protein”
BFM: Berlin-Frankfurt-Münster német munkacsoport
BMLA: „Bayesian MultiLevel Analysis of relevance”
Ca-excr: kalcium kiválasztás
CASP: kaszpáz
CAT: kataláz
CART: „classification and regression trees”
CBR1, 3: karbonil reduktáz 1, 3
CDK5: ciklin-dependens kináz5
CDKN: ciklin-dependens kináz inhibitor
CFTR: „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
COSS: „cooperative osteosarcoma study group”
CUL1: cullin1
CYBA: citokróm B alfalác
CYP: citokróm P
CTC: „common toxicity criteria”
DBD: DNS-kötő szakasz
DHF: dihidrofolát
DHFR: dihidrofolát reduktáz

DOX: doxorubicin
DPYD: dihidropirimidin dehidrogenáz
ECHO: szív ultrahang
ECLIA: Elektrokemilumineszcens Immunoassay
EF: ejekciós frakció
EFS: eseménymentes túlélés
ELISA: enzimhez-kötött ellenanyaggal végzett mérés
FasL: fas ligand
FeK: frakcionált kálium ürítés
FeNa: frakcionált nátrium ürítés
FFP: friss fagyasztott plazma
FMO2: flavin-tartalmú monooxygenáz 2
FPGS: folil-poliglutamát-szintetáz
FS: roströvidülés
fvs: fehérvérsejt
GCR: glukokortikoid receptor
GFR: glomeruláris filtrációs ráta
GGH: gamma-glutamil hidroláz
GGT: gamma-glutamil transzferáz
GLMM: általános lineáris kevert modell
GPT: glutamát-piruvát transzamináz
GRE: glukokortikoid válaszoló elem
GSSG: glutation-diszulfát
GWAS: „genome wide association studies”
GzLMM: generalizált lineáris kevert modell
Hb: hemoglobin
HD: nagy-dózisú
HL: Hodgkin-lymphoma
HNMT: hisztamin N-metiltranszferáz
HPLC: nagy-nyomású folyadék kromatográfia
HR: nagy rizikó
HSCT: hematopoetikus őssejttranszplantáció
IgA: immunglobulin A
IgG: immunglobulin G
IgM: immunglobulin M
IMP: dinátrium-5'-inozin-monofoszfát
IQR: interkvartilis tartomány

LBD: ligand-kötő szakasz
LDH: laktát dehidrogenáz
LinEF: lineáris ejekciós frakció
LR: alacsony rizikó
LVEDd: bal kamra átmérő diastolében
LVEDs: bal kamra átmérő systolében
LVFS: bal kamra rost rövidülés
LVPWd: bal kamra falvastagság diastolében
LVPWs: bal kamra falvastagság systolében
MAU: mikroalbuminuria
MBL: mannóz-kötő lektin
MDR: „multi drug” rezisztencia
MR: közepes rizikó
miR: mikro RNS
MRD: minimális maradék betegség
MRP1: „multidrug resistance-associated protein 1”
MSH: DNS mismatch repair fehérje
MTHFD1: metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz 1
MTHFR: metilén-tetrahidrofolát reduktáz
MTS: metionin szintetáz
MTSR: metionin szintetáz reduktáz
MTX: metotrexát
NBD: nukleotidkötő domén
NCI: „National Cancer Institute”
NCF4: „neutrophil cytosolic factor 4”
NDUFS: NADPH dehidrogenáz (ubikinon) vasszulfát protein
NFkB: transzkripció kofaktor
NHL: non-Hodgkin limfóma
NOS2: nitritoxid-szintáz 2
NQO1: NAD(P)H dehidrogenáz kinon1
NR1I2: nukleáris receptor család 1, I. csoport, 2. tag
NTD: N-terminális domén
OS: általános túlélés
OSC: oszteoszarkóma
PCR: polimeráz láncreakció
PG: poliglutamát
PXR: pregnán-X-receptor

RAC2: RAS-hoz kapcsolódó botulin toxin szubsztrát 2
RARG: retinsav receptor gamma
Rbl: retinoblasztoma
REV1: DNS repair fehérje
RF: „random forest”
RFC: redukált folát karrier
RFLP: restrikciós fragment-hossz polimorfizmus
ROS: reaktív oxigén gyökök
RT-PCR: valós idejű (kvantitatív) PCR
RYR2: rianodin receptor 2
Sebi: szérumbilirubin
SHMT1: szerin-hidroximetiltranszferáz 1
Seöföh: szérumbilirubin
SLC: „solute carrier” transzporter
SLCO: „solute carrier organic anion” transzporter
SOD: szuperoxid diszmutáz
SPG: örökletes spasztikus paraplégia gén
SR: standard (kis) rizikó
TcR: T-sejt receptor
THF: tetrahidrofolát
thrc: trombocita
TKI: tirozin-kináz inhibitor
TMD: transzmembrán domén
TPL: transzplantáció
TPR: tubuláris foszfor reabszorpció
TYMS: timidilát szintáz
UGT1A6: UDP-glukuronoziltranszferáz 1 család, A6 polipeptid
VCR: vinkrisztin
vvt: vörösvértest
XDH: xantin dehidrogenáz

I. Bevezetés

A gyermekkori malignitások túlélése ma már több mint 70 %, a haematológiai malignitásokban pedig 80-90 %. Ugyanakkor a mai intenzív kemoterápiás protolloknak számos mellékhatása lehet, ami érintheti a gyógyultak szinte minden szervét. A kezelés alatt jelentkező mellékhatások jelentősen befolyásolják a gyermek általános állapotát és kezelhetőségét, valamint akár életveszélyes állapotok kialakulásához vezethetnek. Ugyanakkor e kezeléseknek tartós szervkárosító hatásai is lehetnek. Egyre több tanulmány foglalkozik a hosszú távú túlélők szívét, veséjét, máját, idegrendszerét, tüdejét, endokrin és anyagcsere háztartását érintő késői mellékhatásokkal. Természetesen ezek a potenciális mellékhatások érzékenyen befolyásolhatják az életminőséget, a társadalomba való visszailleszkedést. Az elmúlt évtizedben az új kemoterápiás protollok kidolgozásánál kiemelt szempont lett a protokoll toxicitása. Ma már nem csak a túlélési eredmények javítása, hanem a mellékhatások elkerülése és az életminőség is kiemelt szempontok. Az ún. szupportív terápia nagyot fejlődött az elmúlt években. A daganatellenes kezelések mellékhatásainak kivédésére, csökkentésére ma már korszerű készítmények sora áll rendelkezésünkre.

A daganatos betegségek gyógyításának, túlélésének további javítására több út áll előttünk. Részben új, daganatspecifikus gyógyszerek, kezelési módok kifejlesztése, mint pl. a monoklonális ellenanyagok, specifikus immunterápiák ill. célzott kezelések. A fejlődés másik lehetséges útja a kezelés **individualizálása** azáltal, hogy megkülönböztetjük azokat a betegeket, akik jobban tolerálják a nagy dózisú kemoterápiát azoktól, akiknél a szokványos adagok mellett is gyakrabban fordulnak elő toxikus tünetek.

A terápiás protollok egyénre szabásához szükséges az individuális toxicitási profilok meghatározása. A jelenlegi kutatások a gyermekgyógyászatban használatos különböző citosztatikus szerek farmakokinetikájának jobb megismerésével ill. a hatásmechanizmusban szerepet játszó gének polimorfizmusainak vizsgálatával (farmakogenetika) próbálják a terápiás protollokat hatékonyabbá tenni, és az egyénre szabott terápia lehetőségeit megteremteni.

További lehetőség még in vitro gyógyszerérzékenységi tesztekkel meghatározni az illető daganattípus kemoterápiás érzékenységét, ill. rezisztenciáját.

A gyógyszerek szervezeten belüli sorsa, lebomlása, metabolizmusa, kiürülése, vagyis a farmakokinetika és a gyógyszerek szervekre, szervezetre kifejtett hatása, a farmakodinámia

alapvetően meghatározza a gyógyszeres kezelések eredményességét. Citosztatikus kezelések esetén különösen fontos a farmakokinetikai adatok ismerete, hiszen súlyosan toxikus szerekről van szó. A kemoterápiás protokollok összeállításánál alapvető szempont a túlélési eredmények javítása mellett a kevésbé toxikus kombinációk alkalmazása, a késői (és a korai) mellékhatások kivédése. A rendelkezésre álló szupportív szerek egyre szélesebb körű alkalmazása és a genetikai, ill. farmakológiai ismereteink gyarapodása segít a toxikus hatások kivédésében. Az egyes betegek kezelése során alkalmazott gyógyszerek farmakokinetikai paramétereit számos olyan genetikai variáció megváltoztatja, amelyek a gyógyszer metabolizmusában, transzportjában szerepet játszanak.

A farmakogenetika tudománya vizsgálja a különböző gyógyszerek hatásmechanizmusában szerepet játszó genetikai eltérések hatását a gyógyszerek metabolizmusára, hatékonyságára és mellékhatásaira.

Manapság már a molekuláris genetikai eljárások rohamos fejlődésével egyre több információt kaphatunk, egyre olcsóbban és egyre egyszerűbben. Lehetőségünk és egyre több adatunk van arra, hogy az egyén speciális, gyógyszermetabolizmust befolyásoló rendszereit leírjuk, mutációk és génpolimorfizmusok elemzésével meghatározzuk, hogy ki, milyen gyógyszert, hogyan fog tolerálni, ill. kinél milyen gyógyszer lesz különösen hatékony.

Elsősorban azon génpolimorfizmusok meghatározására törekszünk, melyek előrejelezhetik a korai és késői szövődmények előfordulását. Ezen polimorfizmusok ismeretében a maximális tolerálható dózis pontosabb becslésével el lehetne kerülni az életveszélyes akut mellékhatásokat, valamint a kemoterápia esetleges késői szövődményeit. Másrésztől meghatározhatók lennének azon betegcsoportok, amelyek a kemoterápiát jobban tolerálják, nagyobb dózisokat elviselnek és így a terápiájuk intenzifikálásával a túlélési esélyeik növelhetők.

Saját vizsgálatainkban a tudományos eredmények klinikai hasznosíthatóságára helyeztük a hangsúlyt. Új, klinikailag fontos prognosztikai faktorokat kerestünk gyermekkori akut limfoid leukémiában (ALL) és oszteosarkómában (OSC). Új módszereket próbáltunk bevezetni a toxicitások kivédésére és kezelésére. Farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálatainkkal pedig új információkat kerestünk a különböző kemoterápiás szerek toxicitására és azok megelőzésére, kezelésére vonatkozólag. Mindezzel individualizált, kevésbé toxikus, ugyanakkor hatékony kezelési módokhoz, protokoll változtatásokhoz szolgáltatunk új adatokat, hogy a daganatos gyermekek gyógyulása mind tökéletesebb legyen és minél többen válhassanak a felnőtt társadalom teljes jogú tagjává.

II. Irodalmi összefoglalás

II/1. Prognosztikai faktorok

II/1/1. ALL

A gyermekkori leukémiák kb. 80-85 %-a ALL. Az incidenciája 30-35/1.000.000 gyermek. Leginkább a 2-5 éves korcsoportban fordul elő, a fiú-lány arány: 1,3:1. Magyarországon évente kb. 260-300 új gyermekkori rosszindulatú daganatos megbetegedés fordul elő, és ezen betegségek kb. 25-30 %-a leukémia. Hazánkban tehát évente 60-70 új leukémiás betegséggel számolhatunk.

A leukemogenezis valószínűleg több lépéses folyamat, amelynek során az érintett hematopoetikus progenitor sejt több szinten károsodik. A leukemogen tényezők között tartjuk számon a *genetikai prediszpozíciót* és az egyedet illetően szüleit ért bizonyos *környezeti ártalmakat* (Vitagliano *et al.*, 2013; Szycho *et al.*, 2014). A genetikai ártalom pl. a cellularis onkogének expresszióját, transzkripció faktorok működését változtathatja meg (Mullighan, 2013). Bizonyos kromoszóma deléciók szindrómák a tumor szuppresszor gének lehetséges szerepére hívják fel a figyelmet. Ismertek olyan genetikai eltérések, betegségek, melyekben a daganatok, különösen a leukémia kialakulásának az esélye nagy (Down-szindróma (21+), ataxia teleangiectasia (11q), Wiskott-Aldrich szindróma, Chediak-Higashi szindróma, veleszületett immundefektusok, Wiedemann-Beckwith szindróma, Bloom szindróma (15q), Fanconi anemia (9q)).

A külső hatások között pl. az irradiáció, korábbi citosztatikus kezelés (epipodophyllotoxin, alkiláló szerek), bizonyos kémiai anyagok (benzén) vagy egyes vírusfertőzések (EBV) szerepét feltételezik (Wakeford, 2013) (Boothe *et al.*, 2014) (Eden, 2010), ((Pyatt *et al.*, 2010) (McNally *et al.*, 2006) (Lehtinen *et al.*, 1998).

A gyermekkori ALL klasszikus prognosztikai faktorai a következők: életkor, kezdeti fvs.szám, immunfenotípus, a kezelésre adott válasz (perifériás blasztszám a 8. napon, csontvelői blasztszám a 15. és 29-33. napon), genetikai eltérések, lép-, májnagyság, meningeális érintettség.

Életkor

Legjobb a túlélés 2-6 éves korban (német, BFM munkacsoport) (Moricke *et al.*, 2010) (Conter *et al.*, 2010a) ill. a 2-9 éves korcsoportban (az angolszász besorolás szerint) (Pui *et al.*, 2004). A csecsemők ill. az 1 év alattiak túlélése rosszabb (Mann *et al.*, 2010) (van der Linden *et al.*, 2009). A kor előre haladtával megint romlik a túlélés, az adolescensek (>14 év) ill. fiatal felnőttek esélyei rosszabbak (Moricke *et al.*, 2008).

Kezdeti fvs.szám

A legkedvezőbb a túlélés <20 G/l fvs.számnál (BFM besorolás), de a <50 G/l kezdeti fvs.szám esetén is jobb a prognózis (amerikai, brit besorolás) (Pui 2004, Stanulla 2007). A >100 G/l feletti kezdeti fvs. szám egyértelműen rosszabb prognózissal jár, ami a nagyobb kezdeti tumortömegnek tulajdonítható (Vaitkeviciene *et al.*, 2011).

Máj-, lép nagyság

Néhány évtizeddel ezelőtt a kezdeti rizikó besorolás egyik összetevője a máj és a lép cm-ben kifejezett nagysága volt (szintén a kezdeti tumortömeggel összefüggésben): a kifejezettebb hepato-, splenomegalia rosszabb túléléssel és intenzívebb kezeléssel járt (Asselin *et al.*, 2013). Az újabb besorolások már ezt a prognosztikai faktort nem használják (gyenge és bizonytalan tényező).

Meningeális érintettség

A betegség kezdetén a központi idegrendszeri leukémiás érintettség (blasztsejtek a liquorban, meningeális v. retinális beszűrődés) rontja a betegség gyógyulási esélyét (Asselin *et al.*, 2013). Az elmúlt években az intratekális gyógyszeradagolás intenzifikálásával és bizonyos esetekben a központi idegrendszer (kis adagú) besugárzásával lehetett csökkenteni a betegség központi idegrendszeri kiújulásának esélyét és javítani a túlélési eredményeket (Vagace *et al.*, 2012) (Richards *et al.*, 2013).

Immunfenotípus

A pre-B-sejtes betegségek prognózisa a legjobb, valamivel rosszabb a T-sejtes folyamatoké (Schrappe *et al.*, 2012), bár a korszerű protokollokkal ez az eltérés már nem szignifikáns (Patrick *et al.*, 2014) (Vora *et al.*, 2014). Magyarországon a T-sejtes betegségek túlélése még szignifikánsan kissé rosszabb, mint a B-sejteseké.

Kezelésre adott válasz, reziduális betegség (MRD)

Mind a mai napig az egyik legfontosabb prognosztikai marker a kezdeti prednisolon kezelésre adott válasz: a perifériás blasztok abszolút száma a 8. napon (Felice *et al.*, 2001) (Schrappe *et al.*, 2000). A legtöbb nemzetközi protokollban fontos prognosztikai markerként szerepel a 8. napi **szteroid válasz**.

Ezen túlmenően a fejlett országok terápiás protokolljai különböző MRD vizsgálati stratégiát alkalmaznak a betegek rizikóbecslésére. Az áramlási citometriás és PCR MRD vizsgálat prognosztikus szerepe evidenciának számít (Gaipa *et al.*, 2013) (Campana, 2012).

Ma már egyértelműen megállapítható, hogy a **flow citometriával** végzett MRD eredménye a kezelés kezdeti szakában (15., 29-33. nap) egyértelmű összefüggést mutat a prognózissal (Lauten *et al.*, 2012) (Neale *et al.*, 2004). Főleg a 15. napi flow-MRD vizsgálatok mutattak szignifikáns összefüggést a túléléssel (Dworzak *et al.*, 2010) (Lauten *et al.*, 2012) (Gaipa *et al.*, 2013). A jelenleg Mo-on folyó legújabb ALL (BFM ALL-IC 2009) tanulmány is a 15. napi flow-MRD eredményét az egyik fontos prognosztikai és a kezelést befolyásoló stratifikációs faktornak tekinti.

Számtalan más tanulmány is vizsgálta a molekuláris genetikai módszerekkel meghatározott **PCR-MRD** jelentőségét (Conter *et al.*, 2010b) (Faham *et al.*, 2012) (Ebinger *et al.*, 2010). Ezen vizsgálat során az IgH és TcR génátrendeződést lehet kimutatni egyénre specifikusan a beteg blaszt sejtjeiben RT-PCR-rel, ami nagyon pontos módszere az MRD meghatározásának (érzékenység 10^{-4} – 10^{-5}). Szintén a nemzetközi BFM munkacsoport tanulmányában egyértelmű összefüggés volt kimutatható a 33. és 78. napon mért MRD értékek és a túlélés között (EFS 92 % vs 50 % az SR és HR betegek esetén) (Conter *et al.*, 2010) (Schrappe *et al.*, 2011). Más munkacsoportok is hasonló eredményre jutottak (Stow *et al.*, 2010) (Ebinger *et al.*, 2010), így ma már kijelenthetjük, hogy az MRD meghatározása igen fontos a rizikócsoportha sorolás szempontjából (T- és B-sejtes ALL-ben egyaránt). Több európai ország protokolljában (brit, német, olasz, holland stb.) a PCR-alapú MRD eredménye az egyik legfontosabb prognosztikai faktor és meghatározza a kezelés intenzitását is.

Ma már génexpressziós vizsgálatokat is végeznek, biztató eredménnyel, a prognózis és a kezelés meghatározására (Conter *et al.*, 2010b) (Stow *et al.*, 2010; Mullighan, 2011) (Coustan-Smith *et al.*, 2011) (Kang *et al.*, 2010).

Genetikai eltérések

A prognózis szempontjából a daganatsejtek genetikai eltérései alapvető jelentőségűek.

Vannak klasszikus genetikai elváltozások, melyek rossz prognózissal bírnak: bcr-abl, 11q23, t(4;11), hipodiploiditás (<44 kromoszóma) (Takeuchi *et al.*, 2003) (Stanulla *et al.*, 2007).

Ezen esetekben HR terápia és esetleg csontvelő TPL is szóbajön. Másrésztől ismerünk olyan citogenetikai eltéréseket is, melyek jobb prognózissal bírnak: pl. hiperdiploiditás (>50 kromoszóma szám), t(12;21) (Braoudaki *et al.*, 2012).

Ezen túlmenően a molekuláris diagnosztika segítségével más rossz prognosztikai értékkel bíró génátrendeződések (IKAROS/IKZF1 deletions, JAK mutációk, iAmp21 stb.) is kimutathatóak (Conter *et al.*, 2010b) (Moorman, 2012). Teljes genom analízissel további genetikai prognosztikai tényezők írhatók majd le a jövőben (Forero-Castro *et al.*, 2016).

Új prognosztikai faktorok

Az utóbbi években a csontvelő regenerációs képességét és a normális csontvelő működés helyreállítását vizsgálta több munkacsoport is, a túléléssel ill. a prognózissal összefüggésben. Szignifikáns összefüggéseket találtak az indukciós terápia során különböző időpontokban (15, 29. nap) mért abszolút limfocita szám (ALC) és a betegek OS-e ill. EFS-e között (De Angulo *et al.*, 2008) (Hatzipantelis *et al.*, 2014) (Rabin *et al.*, 2012). Egyesek 350 sejt/ μ l ALC alkalmazása esetén találtak szignifikáns különbséget a túlélésben, mások magasabb ALC cut-off értéket határoztak meg (1000 vagy 1500 sejt/ μ l határértékek felett jobb túlélés) (Rabin *et al.*, 2012) (Anoceto Martinez *et al.*, 2012) (Shen *et al.*, 2013).

II/1/2. OSC

Az oszteosarkóma viszonylag ritka gyermekekben, incidenciája 0-14 éves kor között 3-4/1.000.000 fő/év (Ottaviani *et al.*, 2009), míg adolescensekben, fiatal felnőttekben 6-10/1.000.000/év. Valamivel több a fiú beteg, mint a leány (Bielack *et al.*, 2008).

Az OSC **etiopatogeneziséről** viszonylag keveset tudunk. A daganat általában sporadikus megjelenésű, nem mutat családi halmozódást (Marina *et al.*, 2004). A kiváltó okok között szerepelhetnek: sugárártalom, kémiai anyagok (pl. beryllium oxid) és egyes vírusok (pl. FBJ vírus) (Fuchs *et al.*, 2002).

Az oszteosarkómára egyértelműen specifikus transzlokációt vagy genetikai abnormalitást eddig nem azonosítottak, ugyanakkor a daganatok kb. 2/3-ában citogenetikai rendellenességek kimutathatók (1., 6., 9., 10., 13., és 17. kromoszóma eltérései) (Tang *et al.*, 2008) (Poos *et al.*, 2015). A tumorsuppresszor géneket érintő molekuláris hibák szerepet játszhatnak a sarkómák kialakulásában. A retinoblasztóma (*Rb1*) vagy a *p53* gén örökletes hibáját hordozó betegekben nagyobb az OSC kialakulásának veszélye (Deshpande *et al.*, 2006) (Perry *et al.*, 2014) (Miller *et al.*, 1996).

Ezen kívül, egy örökletes csontbetegségben, a Paget kórban kb. 1%-ban alakul ki OSC (Mirabello *et al.*, 2009) (Tang *et al.*, 2008).

A legújabb adatok egy foszforilált glikoprotein, az *oszteopontin* lehetséges patogenetikai szerepét vetették fel (Li *et al.*, 2015).

A daganat első sorban a csöves csontok metafízisében (femur, tibia, humerus) alakul ki, de előfordulhat bármelyik egyéb csontunkban is.

A betegség **prognosztikai faktorai** a következők: kezdeti tumor méret, a neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz, kiindulási hely, kezdeti alkalikus foszfatáz szint, p-glikoprotein expresszió, metasztázis jelenléte a betegség kezdetén, a sebészeti radikalitás lehetősége (Bielack *et al.*, 2002) (Bacci *et al.*, 2006a) (Bramer *et al.*, 2009).

Amennyiben a neoadjuváns kezelésre (HD-MTX, adriablasztin, ifoszfamid, ciszplatin) adott **szövettani válasz** jó, vagyis a radikális műtét során a túlélő daganatsejtek aránya 10 % alatt van, akkor a prognózis és a túlélés jó (Bramer *et al.*, 2009) (Bielack *et al.*, 2002).

Nagy (>200 ml) daganatok esetén a túlélés rosszabb, ami valószínűleg összefügg azzal is, hogy ezen daganatok radikális eltávolítása nehéz (lágyrész érintettség) (Bacci *et al.*, 2006).

A törzs csontjaiból kiinduló daganatok kezelhetősége és így túlélése rosszabb, mint a végtagi primer tumorok esetén (Bielack *et al.*, 2002).

Több irodalmi adat utal arra, hogy a kifejezetten emelkedett szérum **alkalikus foszfatáz** szint arányos a betegség kiterjedésével és rosszabb prognózist jelent (Ehrhart *et al.*, 1998) (Bacci *et al.*, 1993) (Khoury *et al.*, 2014).

A p-glikoproteint, mint az MDR egyik fő molekuláját és patomechanikai faktorát szintén összefüggésbe hozták az OSC túlélésével. Magas p-glikoprotein expresszió esetén a túlélés lényegesen kedvezőtlenebb (Chan *et al.*, 1997) (Hornicek *et al.*, 2000) (Li *et al.*, 2016).

Újabban a 6-os kromoszóma hosszú karján azonosítottak potenciálisan prognosztikai faktorként szereplő géneket) (Poos *et al.*, 2015). Ezen kívül más biomarkerek és gének is felfedezésre kerültek (CDK5, CUL1, ACTL6A), melyek szerepet játszhatnak a sejtproliferációban és a prognózisban (Bao *et al.*, 2017) Cheng2016, Sun2017). A mikroRNS profilban bekövetkező változások szintén összefüggésbe hozhatók a betegség progressziójával és kimenetelével (pl. miR-17) (Kim *et al.*, 2017) (Li *et al.*, 2016).

A diagnózis időpontjában a betegek 20%-ában már távoli **áttét** mutatható ki (elsősorban a tüdőben, a csontokban, ritkábban a nyirokcsomókban vagy egyéb szervekben) (Bielack *et al.*, 2008) (Rozeman *et al.*, 2006). A diagnóziskor már áttétes, vagy a recidívált esetek prognózisa rossz. A tüdő áttétek sztandard kezelése a metasztázisok sebészi eltávolítása. Radikális

tüdőműtéttel az áttétes betegek túlélése 5 év után 35-40 %, 10 év után 25-30 % (Briccoli *et al.*, 2005).

A primer tumor radikális eltávolítása talán a legfontosabb prognosztikai faktor (Bielack *et al.*, 2008), (Marulanda *et al.*, 2008). Ha nem sikerült a tumor komplett rezekciója, az jelentősen megnöveli a **lokális recidíva** veszélyét, és rontja a prognózist. Ezen betegek esetében nagyobb az esélye a metasztázis kialakulásának is, és a prognózis rossz. Izolált lokális relapszus esetén valamivel jobb a prognózis (30 % körül), mint ha metasztázis is van (túlélés 10-15 % körül) (Grimer *et al.*, 2005).

A **radikális műtét** lehet amputáció vagy végtagmegtartó műtét. Amputációra már ritkán kerül sor. A legtöbb esetben a végtag különböző műtéti technikákkal megmenthető: allograft beültetés, tumor endoprotézis, növekedési protézis, vegyes allograft protézis vagy arthrodézis.

II/2. Farmakokinetika, toxicitás

Csak azon citosztatikumok jellemzőit mutatjuk be részletesebben, amelyeket a dolgozatban vizsgáltunk.

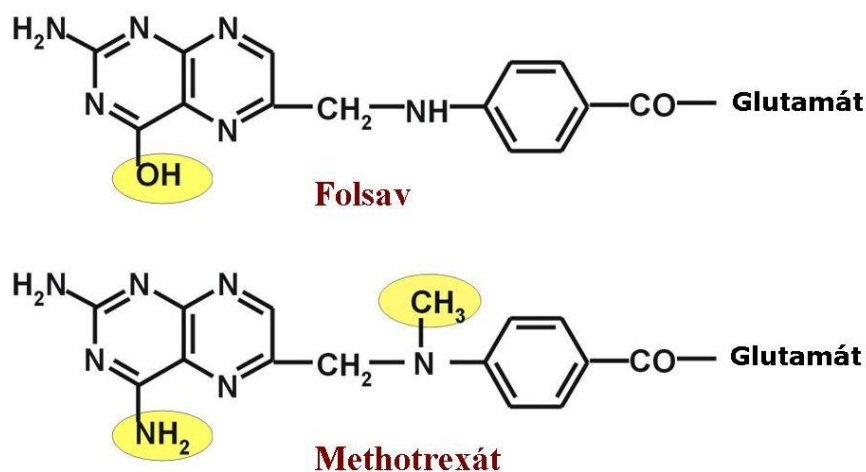
II/2/1. MTX

Hatásmechanizmus

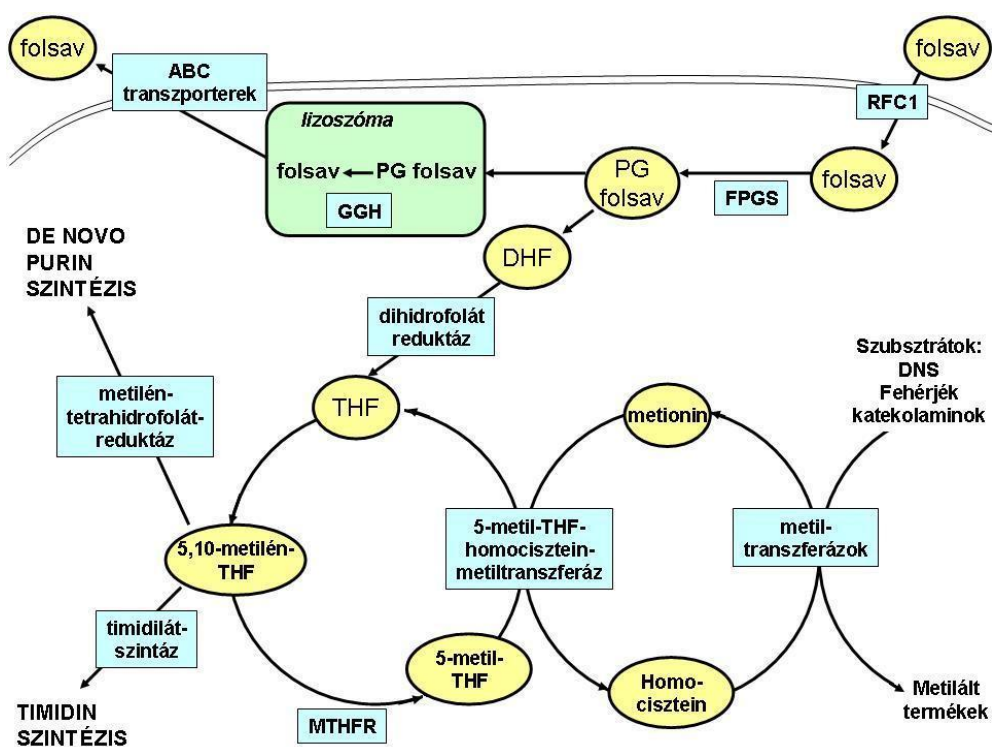
A MTX pteridinből, p-amino-benzoészavból és L-glutaminsavból felépülő folsavszármazék: 4-amino-4-dezoxi-10-metilpteroilglutaminsav. Molekulaszerkezete a folsavétól abban különbözik, hogy a folsavban a pteridin gyűrűn az aminocsoport helyén oxocsoport van, és nincs metilcsoport a 10-es nitrogénatomon (1. ábra).

A MTX, mint folsav antagonist, a sejtek DNS szintézisét gátolja, mégpedig a timidin kialakulásához szükséges folsav-ciklus enzimeit, a dihidro-folát reduktázt és a timidilát szintetázt gátolja. A folátok a szerin és metionin nukleotid prekursorok szintézisében vesznek részt. A MTX gátolja a nukleotidok és így a DNS szintézisét.

A sejtbe a MTX is, a folsavhoz hasonlóan, a redukált folát karrier molekulán (RFC1), folátreceptoron (anionos transzporter) át jut be (2. ábra). Az RFC mennyisége, aktivitása szorosan összefügg az antifolátok hatékonyságával (Matherly *et al.*, 2007).



1. ábra: A MTX és a folsav kémiai szerkezete



2. ábra: A folsav útja a sejtben

RFC1: redukált folát karrier, FPGS: folilpoliglutamát-szintetáz, GGH: gamma-glutamil-hidroláz, PG: poliglutamát, DHF: dihidrofolát, THF: tetrahydrofolát, MTHFR: metilén-tetrahydrofolát reduktáz.
(Hegyi M, PhD doktori értekezés, 2013)

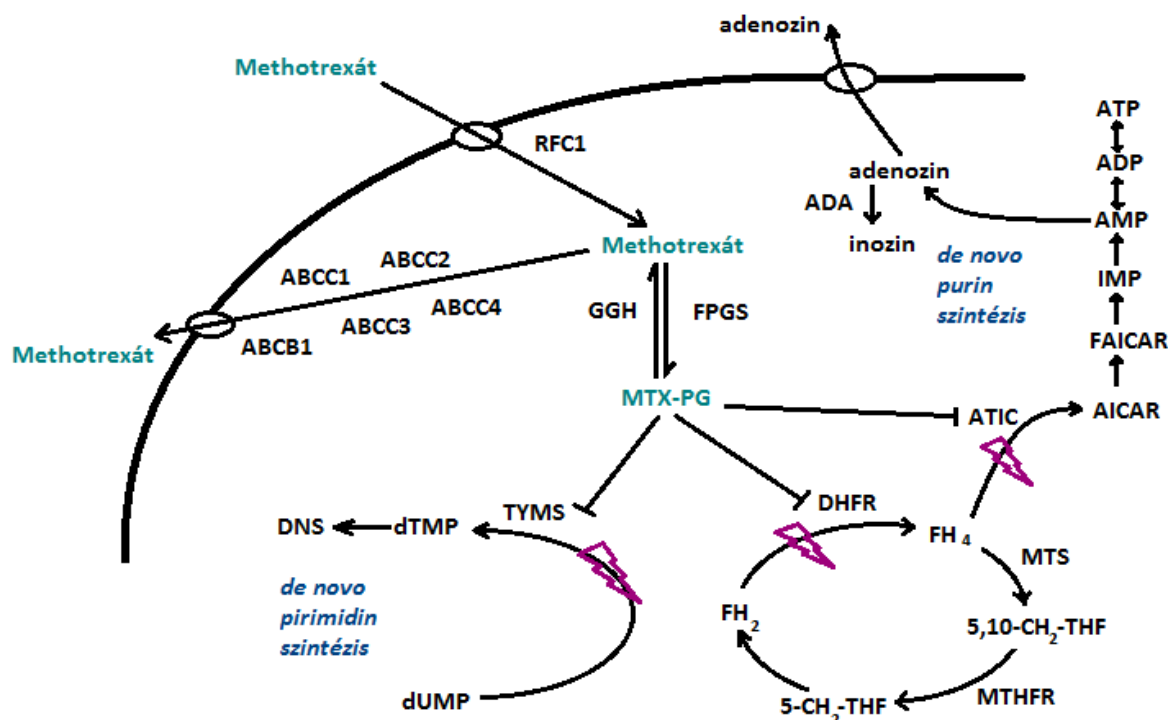
Ezt követően a folilpoliglutamát-szintetáz (FPGS) enzim révén poliglutamináció (2-7 glutamát csoporttal) következik, és a molekula bekerül, a folsav-analógokhoz hasonlóan, a folsavciklusba (2., 3. ábra). Normál esetben a poliglutamált folsav több lépésben

tetrahidrofoláttá (THF), majd 5,10-metilén-tetrahidrofoláttá (5,10-metilén-THF) alakul. Ez a timidilát-szintáz esszenciális kofaktora. A timidilát-szintáz deoxiuridin monofoszfátból (dUMP) timidin-monofoszfátot (TMP) képez. A THF és az 5,10-metilén-THF egyaránt 10-formil-tetrahidrofoláttá alakul, mely a purin szintézis két enzimének esszenciális kofaktora. Ugyanakkor a MTHFR enzim létrehozza a fő élettani folsav származékot, az 5-metil-tetrahidrofolátot (5-metil-THF), melyet a sejten belül a metionin szintáz enzim THF-tá alakít, miközben metioninból homociszteint képez. A poliglutamált folsav származékok a lizoszómába kerülnek, ahol a gamma-glutamil-hidroláz (GGH) monoglutamát formává hidrolizálja és a szabad tetrahidrofolát ABC transzporterekén keresztül kikerül a sejtől. A MTX útja is hasonló a sejtekben (3. ábra). A poliglutamált MTX (MTX-PG) kötődik a dihidrofolát-reduktázhoz, ezzel gátolva a THF képzését és a timidilát bioszintézist. Ezen kívül, mivel a THF a biológiailag aktív folát kofaktorok, például a homocisztein-metionin átalakuláshoz szükséges 5-metil-tetrahidrofolát képzésében is fontos szerepet játszik, a MTX-PG gátolja a metionin képzést is. A MTX-PG gátolja továbbá a timidilát-szintázt is, mely a deoxiuridilátot deoxitimidiláttá alakítja a pirimidin bázisok szintézise során (és így gátlódik a timidin kialakulása). Ezen túlmenően a MTX, az intracelluláris folsavraktár módosításával, a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) aktivitását is befolyásolja (Ranganathan *et al.*, 2006).

A MTX-nak gyulladás gátló hatása is van, mégpedig a purin bioszintézis befolyásolása révén. A MTX-PG (és a felhalmozódó egyéb dihidrofolát poliglutamátok), gátolják az 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (AICAR)-transzformiláz enzimet, így intracelluláris AICAR akkumulációt okoznak. Az AICAR és metabolitjai emelkedett intracelluláris adenzin szintet eredményeznek, ami egy erős gyulladás gátló vegyület (Ranganathan *et al.*, 2006).

A MTX-PG lebontása végül is a lizoszómában történik, ahol a GGH enzim sorban lehasítja a glutamát csoportokat. A szabad MTX kijutása a sejtől az ATB-binding cassette család ABCC1-5 és ABCG2 transzporterein keresztül történik (Hider *et al.*, 2007).

A MTX-ot az orvostudomány számos indikációban alkalmazza. A különböző daganatos betegségek (ALL, NHL, oszteosarkóma, koriokarcinóma, medulloblasztóma, fej-nyaki daganatok, emlő karcinóma stb.) mellett különböző autoimmun és egyéb gyulladásos betegségek (reumatoid arthritis, Wegener-granulomatosis, dermatomiozitis, pszoriasis, szarkoidózis, gyulladásos bélbetegségek) kezelésében is használatos.



3. ábra: A MTX hatásmechanizmusa és útja a sejtekben (rövidítések l. előző ábra)
(Gulácsi Á, rektori pályázat, 2012)

Metabolizmus és farmakokinetika

A MTX 25-30 mg/m² dóziséig jól, 80mg/m² dózis felett már viszonylag rosszul szívódik fel a vékonybélből, így a nagyobb dózisoknál iv. adagolás javasolt.

A MTX metabolizmusa során az aldehyd-oxidáz révén főként 7-OH-MTX-tá alakul és a vesén ill. a májon (epén) keresztül ürül. A metabolit, 7-OH-MTX molekulák kevésbé vízdékok, a vesetubulusokban kicsapódhatnak és akut veseelégtelenséget hozhatnak létre (Widemann *et al.*, 2006) Ennek elkerülésére intenzív alkalizálást és hidrálást kell alkalmazni.

Az enterohepatikus körforgás során a bélben lévő baktériumok karboxipeptidázai is metabolizálják a MTX-ot. A 2,4-diamino-10-metilpteroilsav (DAMPA) inaktív, kis mennyiségben képződő metabolit. A vizelettel ürülő vegyületek között kevesebb, mint 5%-ban jelenik meg.

Intravénás adást követően a kezdeti eloszlási térfogat 0,18 l/kg (a testsúly 18%-a), mely később a szervezet vízterének megfelelően 0,4-0,8 l/kg-ra (a testsúly 40-80%-a) emelkedik. Biológiai hasznosulása átlagosan 60% (Le Guellec *et al.*, 2010).

Intravénás adás után a MTX ürülése a plazmából trifázisos. A kezdeti, disztribúciós fázis során, a féléletidő $0,75 \pm 0,11$ óra (Zhang *et al.*, 2010). A második féléletidő 2-4 óra, ez a celluláris eliminációs fázis, melyért a sejtől nehezen kikerülő poliglutamát forma felelős és a sebességét főként a vesén keresztül történő kiürülés határozza meg.

A terminális fázis HD-MTX kezelések esetén kb. 30-48 óra elteltével figyelhető meg, amikor a szérum MTX koncentráció eléri a $0,1 \text{ mmol/l}$ -t, ekkor a féléletidő $t_{1/2\gamma} = 10,4 \pm 18$ óra. Ez a fázis akkor kezdődik, amikor a plazma antifolát koncentrációja $0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ alá csökken, mely a beadást követően hagyományos dózis esetén 6-24 óra, nagy dózis esetén 30-48 óra múlva történik meg. A harmadik fázist valószínűleg a MTX enterohepatikus körforgása okozza. A csontvelő- és a gastrointestinális toxicitás nagy részéért a terminális féléletidőt tartják felelősnek.

Ép vesefunkció esetén a plazmából történő clearance 110 ml/min , ennek 95 %-a a vesén keresztüli kiválasztás. Intravénás adagolást követően 6 órán belül a MTX dózis kb. 40 %-a, 24 órán belül 90 %-a, 30 órán belül pedig kb 95 %-a változatlan formában ürül a vizelettel (Zhang *et al.*, 2010). Alacsony plazmakoncentrációknál a vesében tubuláris reabszorpció is történik. Magasabb koncentrációknál a renális clearance viszonylag állandó, és magasabb, mint az inulin clearance, vagyis a MTX nemcsak glomerulárisan filtrálódik, hanem aktívan szekretálódik is a proximális vesetubulusokban. Csökkent vesefunkció és tubuláris szekrécióval ürülő gyenge savakkal történő párhuzamos adagolás jelentősen megnövelheti a MTX szérumszinteket. Intravénás adást követően a széklettel ürül a dózis 1-2 %-a (biliáris exkréció révén). Per os adagolásnál a széklettel ürülő MTX mennyisége függ a dózistól és a vékonybél abszorpciós kapacitásától (Bleyer, 1978).

A cerebrospinális folyadékba, az intrapleurális és az intraperitoneális térbe a MTX diffúzió csak lassan, passzív transzporttal következik be. Amennyiben ezen folyadékterek megnövekednek (ascites, pleurális folyadékgyülem) harmadik kompartmenként lassítják a kiürülést és meghosszabbítják a MTX jelenlétét a szervezetben (Bleyer 1978). A vér-agy-gát jórészt megakadályozza a szisztémásan beadott MTX bejutását a központi idegrendszerbe (KIR). Egyensúlyi állapotban a liquor-plazma arány kb. 2-5 %.

A vérben a MTX körülbelül 50-80 %-a plazmafehérjéhez, főként albuminhoz kötődik. A fennmaradó rész szabad formában található meg. A szabad extracelluláris MTX koncentrációt befolyásolja a plazmafehérjéhez kötődés mértéke, ezáltal pedig hatással van a MTX sejtekbe való bejutására és a vesén keresztül történő kiválasztására is (Bleyer, 1978).

Toxicitás

A MTX **toxikus** mellékhatásai közül a következők emelendők ki: hepatotoxicitás, nefrotoxicitás, csontvelő depresszió, mukozitis, idegrendszeri tünetek, pulmonális toxicitás. A csontvelő és nyálkahártya károsítás az esetek zömében csak átmeneti, az encefalopátia ritka jelenség és krónikus károsodást ritkán okoz, de a máj- és vesekárosodás viszonylag gyakran előfordul és késői következményekhez is vezethet.

Hepatotoxicitás

A MTX kezelés után akut és krónikus májkárosodás is előfordulhat. HD-MTX infúzió után a dózistól és az infúzió hosszától függően 30-70 %-ban figyelhető meg akut májenzimszint-emelkedés (GOT, GPT) és/vagy hiperbilirubinémia (Longo-Sorbello *et al.*, 2001) (van Outryve *et al.*, 2002). Az akut toxicitás általában átmeneti, és különösebb klinikai tünetek nélkül 1-2 héten belül normalizálódik (Schmiegelow *et al.*, 1990). A súlyosságot egyéb májtoxikus gyógyszerek egyidejű alkalmazása, szepsis, meglévő májbetegség, műtétek, altatás is befolyásolhatja. A hosszú ideig adott kisebb dózisok (pl. autoimmun betegségek esetén) krónikus májléziót, fibrózist, akár májcirrózist okozhatnak (5-10 %) (Bleyer, 1978). A májkárosodás megelőzése érdekében fontos a zsírszegény, májkímélő diéta. Kialakult toxicitásban antioxidáns vegyületeket adhatunk, melyek gátolják a lipid peroxidációt (silibinin, silimarin, N-acetil-cisztein). A hiperammónia csökkentésére, az urea-ciklus serkentésére glutarzin, L-ornitin-L-aszpartát alkalmazandó.

Nefrotoxicitás

A MTX két karboxilcsoportot tartalmazó gyenge sav, a szervezetben ionizált alakban fordul elő, és fiziológiai pH-értéken nem lipidoldékony. Ha a vizelet pH emelkedik (7 körülire vagy afölé), akkor a MTX és metabolitjainak (pl. 7-OH-MTX) oldhatósága sokszorosára nő. Emelkedett szérumszint és vizelet MTX koncentrációk mellett (HD-MTX kezelések) a vegyület és főleg bomlásterméke a 7-OH-MTX kicsapódhat a vesében, és vesekárosodást okozhat akut tubuláris nekrosis formájában (főleg rövid idejű és nagy-dózisú MTX infúziók esetén). Ugyanakkor az intenzív hidráció és vizelet alkalizálása jelentősen csökkentheti a károsító hatást, így napjainkban a súlyos vesetoxicitás előfordulása csak kb. 1 % (Widemann *et al.*, 2004) (Widemann *et al.*, 2006).

A MTX elhúzódó és káros toxikus hatásait, HD-MTX kezelések során a szérumszintek monitorizálásával lehet követni és teljesen redukált folsav (folinsav, Ca-leucovorin) adásával felfüggeszteni. A HD-MTX protokollokban kötelezően szerepel a folinsav rendszeres adása, általában a kezelést követő 24-42. órában elkezdve és mindaddig folytatva, amíg a szérumszint nem csökken.

MTX szint nem csökken $0,25 \mu\text{mol/l}$ alá. Ez általában a 48-54. órában megtörténik, de elhúzódó ürülés gyakran előfordul, így a MTX szérumszintek mérése szintén kötelező a szérumszint lecsökkenéséig ($<0,25 \mu\text{mol/l}$ alá). A legjobb módszer a MTX szérumszint mérésére a HPLC, de manapság egyszerűen, olcsón és megbízhatóan mérhetjük a szinteket ELISA-val is. Amennyiben a szérumszint toxikus értékeket ér el, ill. a kiürülés elhúzódó, akkor kifejezettebb toxicitásra lehet számítani. Ekkor a leukovorin „rescue” emelt adagban folytatandó, és forszírozott diurézist (furoszemiddel) kell bevezetni.

Mielosuppresszió

A HD-MTX kezelés leukovorin rescue-val általában csak enyhe csontvelő-toxicitást okoz, trombopénia és/vagy leukopénia alakulhat ki. Mindhárom sejtvonal érintettsége (anémiával) ritka és általában 1 hét-10 nap után alakul ki (Saravana *et al.*, 2003) (Yoon *et al.*, 2001). Transzfúzióra, vagy granulocita kolóniasztimuláló faktor (G-CSF) alkalmazására ritkán kerül sor (10-30 %) (Levensen *et al.*, 2015).

Az infúzió idejének csökkentésével (4-6 órára 24 óra helyett) a mielotoxicitás és a súlyos mukositis előfordulása csökkenthető. Ugyanakkor vannak klinikai adatok arra vonatkozólag, főleg nagy rizikójú agresszív NHL-ban, hogy a terápiás hatékonyság is csökken (Woessmann *et al.*, 2005). Ezért a legtöbb hematológiai protokollban megmaradt a hosszabb, 24-36 órás MTX infúzió, míg szolid tumorokban (emlő, OSC) a rövidebb infúziók is hatékonyak és kevésbé toxikusak (Gianni *et al.*, 2008) (Lin *et al.*, 2009).

Neurotoxicitás

A MTX-okozta központi idegrendszeri károsodás akut formában 3-15 %-ban fordul elő. Tünetei közé tartozhat a fejfájás, zavartság, hányinger, hányás, a viselkedés megváltozása, dezorientáció, de súlyosabb esetben görcsök, parézisek, bénulások, sőt tudatvesztés, kóma is előfordulhatnak. Elsősorban vaszkuláris eredetet feltételezünk, ill. átmeneti fehérállomány léziók alakulhatnak ki. A patomechanizmusról, prevencióról, kezeléssel viszonylag keveset tudunk, de az emelkedettebb szérumszintek vagy az elhúzódó MTX-kiválasztás nem növelik a neurotoxicitás gyakoriságát (Shuper *et al.*, 2002) (Rubnitz *et al.*, 1998). A tünetek pár perc vagy óra alatt fejlődnek ki, majd progrediálhatnak vagy visszafejlődhetnek.

A diagnosztikában a képalkotó eljárások során fehérállomány léziók mutathatók ki első sorban diffúzió-súlyozott MRI (diffusion-weighted imaging, DWI) technikával (Bhojwani *et al.*, 2014) (Inaba *et al.*, 2008). A kialakult károsodás kezelésére fokozott hidrált és

agynyomás csökkentést (mannizol), a leukovorin dózis emelését, fenitoint, gabapentint és iv. aminofillint alkalmazunk. A tünetek spontán visszafejlődésére is lehet számítani.

A MTX által okozott krónikus agykárosodás leggyakrabban nekrotizáló, demielinizációs leukoenkefalopátiaként lép fel. Enyhe formában, rendszeresen végzett képalkotó eljárásokkal 10-30 %-ra becsülik, de sokszor irreverzibilis progresszív neurológiai tünetekkel jár (demencia, dizartria, ataxia, görcs, akár tudatvesztés). Az enyhébb fehérállomány léziók viszont általában nem járnak súlyos tünetekkel és reverzibilisek is lehetnek (mentális/iskolai teljesítmény romlása, figyelemzavar, magatartászavar). Hajlamosító tényezők a megelőző koponya-besugárzás, az intratekális MTX-adás és a nagyobb kumulatív MTX-dózis, de a pontos patomechanizmus ismeretlen (Bhojwani *et al.*, 2014).

Gasztrointesztinalis toxicitás

Általában néhány nappal a HD-MTX kezelések után gasztrointesztinalis mukozitis jelenhet meg. A szájból kiindulva a nyelőcsővön át az egész béltraktusra kiterjedő nyálkahártya léziók, fájdalommal, lázzal, hányással, hasmenéssel, disztrófiával, és erős fájdalommal járnak (Lima *et al.*, 2014b) (Tsukada *et al.*, 2013). A súlyos (Grade III, IV) mukozitis kb. 5-10 %-ban fordul elő, de vannak olyan intenzív kemoterápiás protokollok, ahol lényegesen nagyobb arányban kell vele számolni. Down kóros betegek különösen érzékenyek a súlyos, akár életveszélyes mukozitisre (Buitenkamp *et al.*, 2010).

Tüneti terápiája fájdalom- és lázcsillapításból, fertőtlenítő öblítésekkel áll, esetlegesen antibiotikus, antimikotikus vagy antivirális kezeléssel kiegészítve.

A maradandó gasztrointesztinális toxicitás ritka, esetleg enyhe felszívódási zavar előfordulhat.

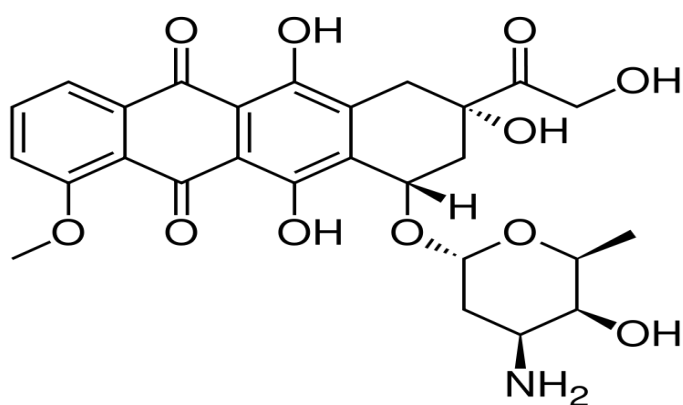
Pulmonális és egyéb toxicitás

Akut mellékhatásként a pleura, a tüdő, és esetleg egyéb epitéliumok (vagina, húgyhólyag) gyulladása is előfordulhat. A MTX által kiváltott allergiás immunreakciók érinthetik a bőrt (eritéma, urtikaria), a szemet (konjunktivitis), valamint a tüdőt. Krónikusan tüdőfibrózis, bronchitis, légúti hiperreaktivitás alakulhat ki (5-10 %-ban) (Imokawa *et al.*, 2000). A leggyakoribb tüdőelváltozás az interstitialis pneumonitis (Cannon, 1997). A betegség prognózisa viszonylag jó, de ritkán légzési elégtelenség is kialakulhat.

II./2./2. Antraciklinek

Hatásmechanizmus

Az antraciklinek közül a doxorubicin és daunorubicin természetes vegyületek, citotoxikus antibiotikumok, melyeket a *Streptomyces peuceticus* baktérium törzsből izoláltak. Kémiai szerkezetükre a tetraciklusos gyűrű jellemző, melyhez aminocukor és alkil oldallánc csatlakozik (4. ábra).

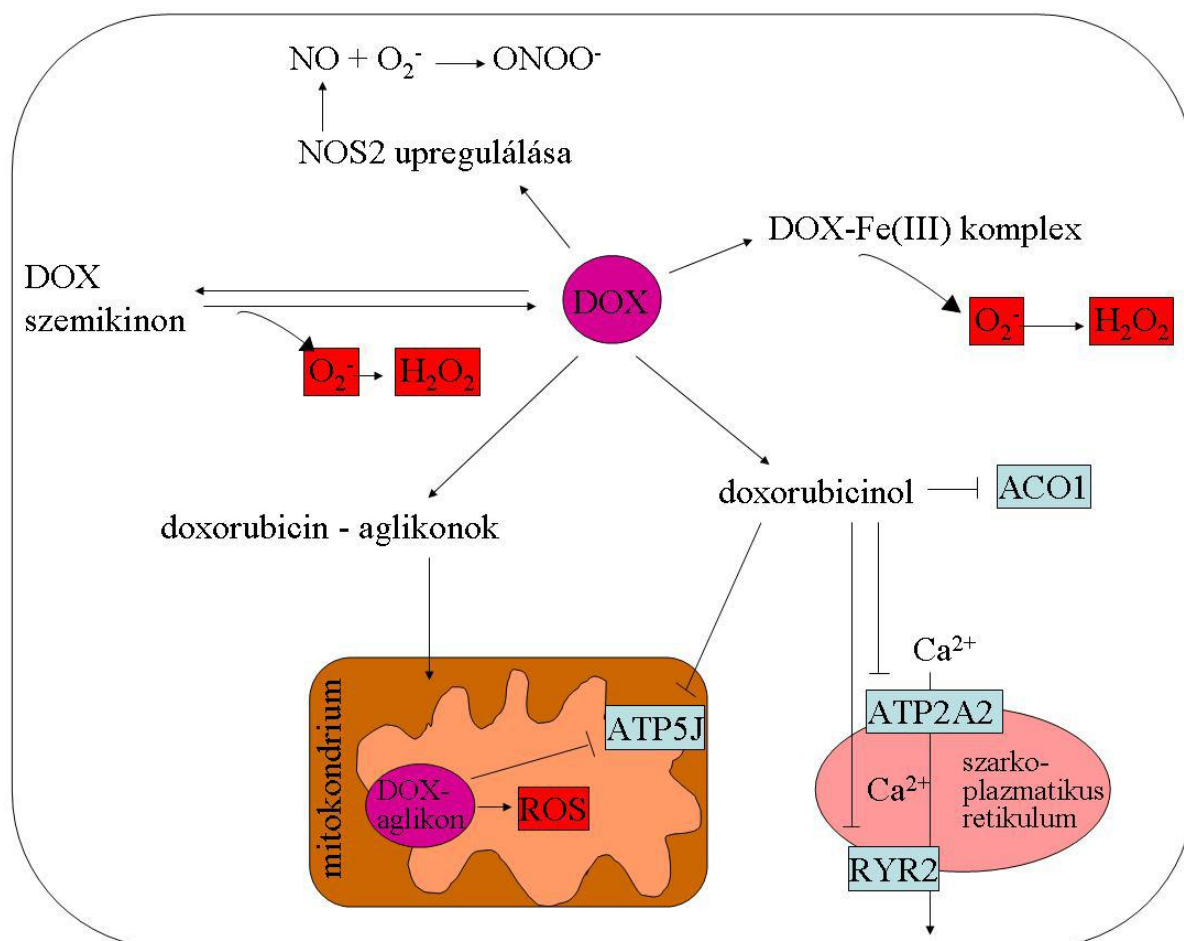


4. ábra: A doxorubicin képlete

(Daunorubicin esetén a jobb felső $-OH$ csoport helyén egy $-H$ van.)

Felhasználási területük igen széles: a hematológiai betegségek (leukémiák, limfómák) mellett a legkülönbélebb karcinómák és szarkómák (emlő, lágyrész szarkómák, fej-, nyaki daganatok, csonttumorok stb.) kezelésében használjuk (Menna *et al.*, 2007) (Mordente *et al.*, 2009).

Az antraciklinek hatásmechanizmusának egyik tényezője a reaktív oxigén gyökök képzése, ami többféle úton lehetséges. Egyrészt enzimatis úton szemikínonok képződnek, ami aztán szuperoxid-anion és hidrogén-peroxid keletkezéséhez vezet (5. ábra).



5. ábra: Az antraciklinek hatásmechanizmusa (Félné Semsei Á. PhD értekezés, 2013)

Az antraciklinek a ferritinből szuperoxid-anion hatására felszabaduló vas ionokkal is kölcsönhatásba lépnek és a kialakult komplexek katalizálják a reaktív oxigén gyökök (hidrogén-peroxid, szuperoxid-anion) képződését (Lipshultz *et al.*, 2008) (Menna *et al.*, 2007) (Mordente *et al.*, 2009) (Yan *et al.*, 2009). Az antraciklinek ezen kívül gátolják a mitokondriumban a légzési láncot (antraciklin-aglikonok kialakulása révén). A doxorubicin a nitrogén-oxid termelést is fokozza (a nitrogénmonoxid szintetáz (NOS2) up-regulálása révén), és ez reaktív nitrogén gyökök, pl.: peroxi-nitrit ($ONOO^-$) képződéséhez vezethet.

A tumorelles hatás szempontjából talán a legfontosabb, hogy az antraciklinek a DNS kettős spiráljába interkalálódnak, így gátolják a DNS-szintézist. Továbbá gátolják a topoizomeráz II-t, és így apoptózist indukálnak.

Toxicitás

A vegyületcsoport fő toxicitása, a sokszor igen súlyos, kardiotoxicitás.

Emellett csontvelő károsodás, alopecia, mukozitis és enyhe vesetoxicitás fordulhat elő.

A *kardiomiopátia* akut és krónikus formában nyilvánulhat meg. A szívizomsejteket károsító hatás patofiziológiája még nem teljesen ismert, de valószínű, hogy az alapvegyület és a metabolitjai is kardiotoxikusak (Mordente *et al.*, 2009) Youssef (Youssef *et al.*, 2005).

Az alkohol származékok akkumulálódnak a szívizomban, így a késői kardiotoxicitás kialakulásában játszhatnak szerepet. Ezek a szekunder alkoholok az eredeti vegyületnél hatékonyabban gátolják a mitokondriális ATP szintézist végző ATP szintázt (ATP5J), a szarkoplazmatikus retikulum Ca-pumpáját (ATP2A2) és Ca²⁺- csatornáját (RYR2). Továbbá a doxorubicinol gátolja az akonitázt (ACO1) is, ami a vas-homeosztázisban fontos (Menna *et al.*, 2007). Mindezek a folyamatok hozzájárulnak az antraciklinek okozta DNS, foszfolipid, tiol-tartalmú fehérjék károsításához, lipid-peroxidációhoz és a tiol-tartalmú fehérjék szintjének a csökkenéséhez (Lipshultz *et al.*, 2008). A nagy kardiotoxicitásuk ellenére az antraciklin-alkohol vegyületek nem ennyire hatékonyak a tumorsejtek elleni védelemben. A topoizomerázt kevésbé gátolják, és a sejthalált kevésbé indukálják (Yan *et al.*, 2009).

A feltételezések szerint a gyorsan osztódó sejtek ezen ártalmas hatásokat könnyebben ki tudják védeni, míg a szinte egyáltalán nem osztódó szívizom sejtek nagyon érzékenyek ezen károsító hatásra (Lipshultz2008) [11]. A másik fő tényező, amiért a szív különösen érzékeny az antraciklinekkel szemben, hogy a különböző oxidatív károsodásokkal szemben a fő védelmet jelentő glutation redox ciklus csak nagyon alacsony aktivitással működik a szívizom sejtekben (Li *et al.*, 2007). A szívizomsejtek fogékonyabbak továbbá az antraciklinek károsító hatására a kardiolipin magasabb szintje és fokozott metabolikus aktivitása miatt is.

Az akut kardiotoxicitás (kezelés alatt vagy közvetlenül utána) átmeneti szívritmuszavarokat (tachikardia, atrioventrikuláris- és szár-blokk) és aspecifikus, enyhe EKG változásokat okoz (Wojtacki *et al.*, 2000) (Iarussi *et al.*, 2005), melyek általában reverzibilisek.

A késői kardiotoxicitás a kezelés befejezése után min. 1 évvel, de akár évtizedekkel (!) később is jelentkezhet. A fő megjelenési forma a kongesztív kardiomiopátia, mely folyamatos progressziót mutat (miokardiocita vesztés, miokardiális fibrózis). A szubklinikus elváltozások incidenciája 15-30 % (antraciklin dózistól és egyéb rizikófaktoroktól függően), míg az orvosi beavatkozást igénylő, súlyos kardiomiopátia előfordulási gyakorisága 1-4 %. Első sorban a bal kamra működése csökken, fala elvékonyodik, a végszisztolés nyomás megnő és a szív kitágul, valamint pangásos szívelégtelenség alakulhat ki. Szívultrahang során

csökkent bal kamrai lineáris ejekciós frakció, csökkent végdiasztolés hátsófal vastagság, kisebb tömeg és kontraktilitás, illetve megnövekedett bal kamrai afterload figyelhető meg. A toxicitás kialakulásának fő rizikófaktorai az antraciklin kumulatív dózisa. Gyermekkorban már a 300 mg/m^2 feletti dózisok esetén számolni kell – akár súlyos – kardiotoxicitással. Felnőtt korban ez az érték kb. 500 mg/m^2 , vagyis a gyermekek, a fiatal szervezet sokkal érzékenyebb az antraciklinek szívkárosító hatására. Egyéb rizikófaktorok: a női nem, fekete rassz, genetikai faktorok (l. később), egyéb kardiovaszkuláris problémák, cukorbetegség, sugárkezelés, egyéb kardiotoxikus gyógyszerek adása (Lipshultz *et al.*, 2008) (Brouwer *et al.*, 2007).

Az antraciklinnel kezelt betegeknek a kardiotoxicitás megelőzéséhez a szívfunkció folyamatos ellenőrzése szükséges (ECHO). Ezen túlmenően a szérumban troponin szint mérése ill. a szérumban ANP, BNP meghatározása segít a rizikó becslésben és a követésben (Wojtacki *et al.*, 2000). A toxicitás megelőzésében fontos még az infúzió hosszának megválasztása. Egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a hosszabb (akár 24-48 órás) infúziók a kardiotoxicitás jelentős csökkenésével járnak, míg a tumorelles hatás és a túlélés nem csökken. Mindez aláhúzza a farmakokinetikai paraméterek jelentőségét a mindennapi klinikai gyakorlatban! A toxicitás csökkentésének további módja a liposzomális antraciklinek használata. Az előzetes eredmények biztatóak, és egyre több kemoterápiás protokollban használjuk őket (Creutzig *et al.*, 2013) (Quarello *et al.*, 2012).

Nagyon hatékony és biztató szívvédő gyógyszer volt a dexrazoxán, ami egy vaskötő-kelát, mely megköti a szabad és a kötött vasat is, így csökkenti az antraciklin-vas komplexek kialakulását és ezáltal a reaktív oxigén gyökök keletkezését. Számos biztató klinikai adat jelent meg hatásosságáról gyermekekben is (Lipshultz *et al.*, 2008) (Anderson, 2005) 2005, Barry (Barry *et al.*, 2008) (van Dalen *et al.*, 2011). Magyarországon is alkalmaztuk 1996 és 2010 között, eredményesen. Saját klinikai adatainkkal is alátámasztottuk a hatékonyságát. Ugyanakkor a hosszú távú követések során súlyos mellékhatásokat írtak le (MDS, leukémia), ami miatt a gyermekgyógyászati alkalmazását korlátozták.

A már kialakult szívelégtelenség kezelésére ACE-gátlókat, vízhajtókat, Ca-csatorna-blokkolókat, béta-adrenoceptor antagonistákat (bétablokkolókat) adunk. Ezzel együtt az esetek egy része fatális (1-4 %).

II/2/3. Glukokortikoidok

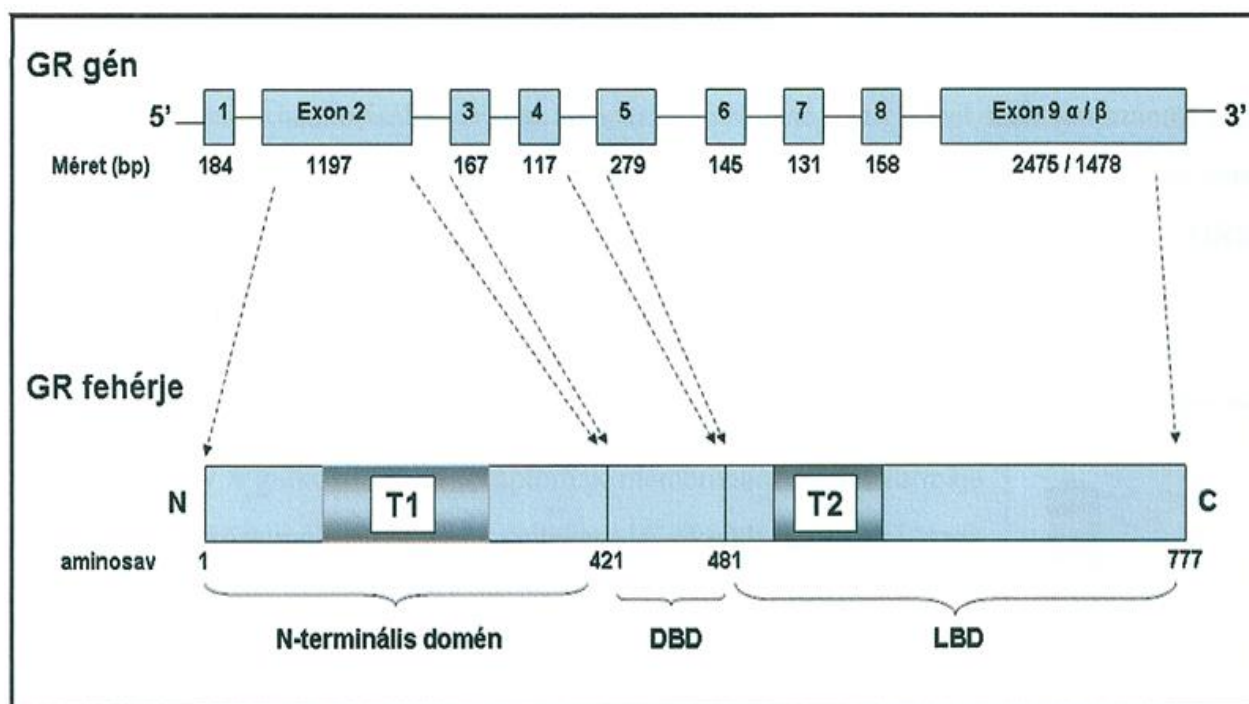
Hatásmechanizmus

A glukokortikoidoknak elsődleges hatásai az antiinflammatorikus, antiproliferatív, proapoptotikus és antiangiogenetikus hatások. Ezen túlmenően hatással vannak a cukor- és zsír-anyagcserére, a metabolikus folyamatokra, az immunrendszerre, az embrionális fejlődésre, az idegrendszer működésére, a reprodukzív funkciókra, az izmok és a csontok anyagcseréjére. Hatásuk jó részét a glukokortikoid receptoron (GCR) keresztül fejtik ki (Oakley *et al.*, 2011).

Az orvostudomány széles területein kerülnek alkalmazásra: gyulladásos betegségek, autoimmun kórképek, malignus (leukémia, limfóma) betegségek, allergiás eredetű megbetegedések. ALL-ben a blasztok apoptózisát indukálják (caspáz-9 és citokrómC aktiválódás), vagy közvetlenül a GRE-n keresztül vagy az NF-kappa-béta és AP1 szignáltranszdukciós utak gátlása révén (Kofler, 2000).

A klasszikus glukokortikoid hatás során (genomiális mechanizmus), a szteroid molekulák diffúzióval átjutnak a sejthártyán, a sejtplazmában kapcsolódnak receptoraikhoz (GCR), majd bejutnak a sejtmagba, ott bekötődnek a DNS specifikus részeihez (GRE) és megváltoztatják egyes gének transzkripcióját.

A GCR a nukleáris hormon receptor szupercsalád tagja. Három fő részből tevődik össze: DNS-kötő szakasz (DBD), ligand-kötő szakasz (karboxi végen) (LBD) és egy nem homológ, változó méretű N-terminális domén (NTD) (7. ábra). Az NTD nagy transzkripciós aktivitással (AF1) rendelkezik, amely a különböző koregulátorok és transzkripciós faktorok rendszerét szabályozza, hangolja össze. A DBD-szakasz egy nagyon konzervatív régió, melyen két cinkujjas rész található, melyekkel kötődni tud a GRE-hez. Az LBD hidrofób tulajdonságú, képes megkötni a glukokortikoidokat, valamint tartalmaz egy másik nagy transzkripciós aktivitással rendelkező domént (AF2) is. Az AF2 a ligandkötéstől függően különböző kofaktorokat szabályoz (Kadmiel *et al.*, 2013).



7. ábra: A glukokortikoid receptor gén és fehérje szerkezete

(Dr. Majnik Zsuzsanna Doktori értekezés 2006)

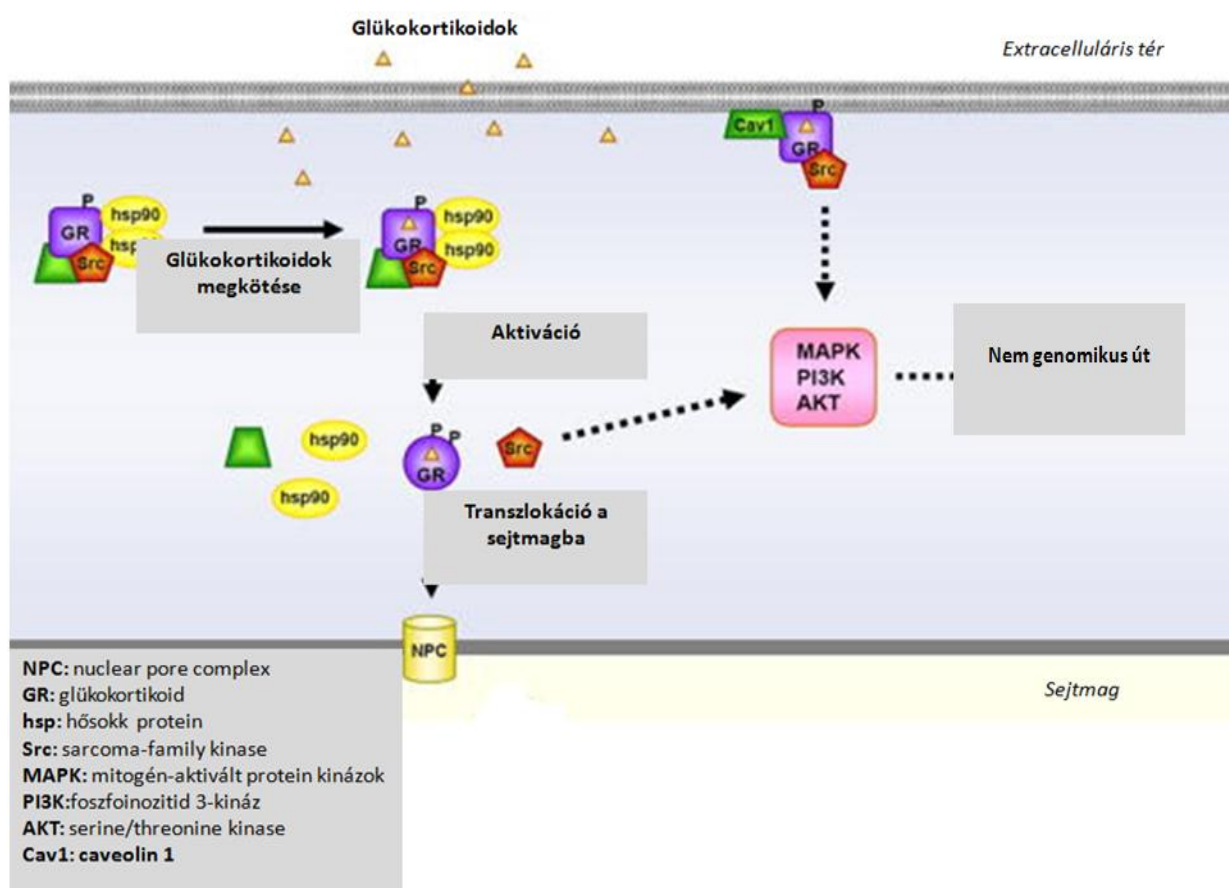
Ligand nélkül a GCR inaktív állapotban a citoplazmában található egy hőszokk-fehérjéket is tartalmazó komplex részeként (Grad *et al.*, 2007). A ligandként szolgáló kortizol bekötődése után a receptor konformáció változást szenved, leválik a hőszokk-proteinekről, homodimerizálódik más aktivált GCR-ral, majd a sejtmag pórusain keresztül a magba vándorol, ahol a DNS GRE helyeihez vagy más transzkripciós faktoraihoz kötődik és befolyásolja azok működését, megváltoztatva a gén-expressziót. A gátló hatását a GCR monomer formában fejt ki, és nem a hagyományos GRE-khez kötődik, hanem ún. negatív GRE-hez (Oakley *et al.*, 2013). A glukokortikoidok különböző szövetekben kifejtett különböző hatásainak jórészt az a magyarázata, hogy más GRE helyek vannak szabadon a különböző sejtekben és ezek aktiválódásához különböző mennyiségű glukokortikoid-GCR komplexre van szükség.

Ma már bizonyítottnak tűnik, hogy a glukokortikoidoknak vannak nem-genomiális hatásai is, melyek gyorsan alakulnak ki, és főleg a stressz helyzetekre adott akut válaszban játszanak szerepet. A pontos hatásmechanizmusok (receptorok, másodlagos hírvivők) nem teljesen tisztázottak (Losel *et al.*, 2003) (Tasker *et al.*, 2006) (Groeneweg *et al.*, 2012).

A leginkább feltételezett szignáltranszdukciós utakban a foszfoinozítid 3-kináz, a szerin/treonin kináz (AKT) és mitogén-aktivált protein kinázok (MAP-kinázok) szerepelnek (8. ábra).

A GCR komplex része a citoszolban a sarcoma(Src)-kináz is. A glukokortikoid-GCR kapcsolódás során az Src-kináz is leválik a komplexről és aktiválja az előbb felsorolt kinázokat. Ezek foszforiláció révén aktiválják az annexin 1 molekulát, ami végül gátolni fogja a sejtplazmában a foszfolipáz A2-t, minek eredményeképpen bénul a gyulladásos mediátorok, így pl. az arachidonsavak szintézise (Solito *et al.*, 2003).

A GCR-nek membránhoz kötött formája is van, mely a gap junction-öket szabályozza és az src-MAP-kináz úton keresztül a neurális progenitor sejtek proliferációját serkenti (Oakley *et al.*, 2013).



8. ábra A glukokortikoid hatás nem genomikus útjai a sejten belül

(Dr. Majnik Zsuzsanna Doktori értekezés 2006)

Toxicitás

A glukokortikoidok fokozzák a májban a glikogén felhalmozódását, valamint a glukoneogenezist (Opherk *et al.*, 2004), emelik a vércukor és a vér szabad zsírsav szintjét, hipertrigliceridémiát, hiperinzulinémiát okoznak (Anil *et al.*, 2014). A májban a zsírsejtek hipertrófiássá válnak, zsírmáj jön létre, ami szerepet játszik a májkárosító hatásban, a májenzimek emelkedésében (Shpilberg *et al.*, 2012) (Mueller *et al.*, 2012). Megnövelik az étvágyat, emelik a testsúlyt, de ez az emelkedés a zsírtartalom növekedésében nyilvánul meg (Cushing-szindróma). A szteroidok ugyanis katabolikus hatásúak, az izmokban fokozzák a fehérjebontást, és inzulinrezisztenciát eredményeznek (Menconi *et al.*, 2007).

A tartós glukokortikoid kezelés csonttritkulást, osteoporosist okoz, első sorban az osteoblasztok gátlása révén. A kortizon az emésztőrendszerben csökkenti a kalcium felszívódását, míg a vesében növeli a Ca-ürítését. Ezáltal csökken a kalcium mennyisége, fokozódik a csontbontás, valamint a kollagénbontás is fokozódik, míg a kollagén szintézise csökken. Gyakoribbak továbbá a csonttörések és avaszkuláris csontnekrózis is kialakulhat az esetek kb. 10-30 %-ában (Gensler, 2013) (Saag *et al.*, 2007) (Kawedia *et al.*, 2011). Gyermekekben növekedési zavart okoznak, direkt csonthatás, valamint a GH-IGF1 rendszer gátlása révén.

A szteroid kezelés egyik fő mellékhatása a gasztrointesztinális rendszerben, elsősorban a gyomorban megjelenő fekélyek, eróziók kialakulása. Alkalmazásuk során ezért savcsökkentő gyógyszerek és nyálkahártya bevonók adása javasolt.

A glukokortikoidok kifejezett immunszuppressziós és gyulladásgátló hatást fejtenek ki. Gátolják a dendritikus sejteket, az aktivált T-sejteket, befolyásolják az antigénprezentáló sejtek migrációját és apoptotikus hatásúak a limfocitákban (Cao *et al.*, 2013). Gátolják továbbá a neutrofil granulociták migrációját, a B-sejtek proliferációját és antitest termelését is (Busillo *et al.*, 2013) (Zen *et al.*, 2011). Gyakoriak a fertőzések, a lázas állapotok, a mukozitis, a gombás fertőzések.

Glukokortikoid hatásra fokozódik a nátrium- és így a víz visszatartás, valamint fokozódik a káliumürítés, hipokalémia alakul ki (Tsai *et al.*, 2004). Részben a só- és vízvisszatartás, részben a kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett előnytelen hatások (Pimenta *et al.*, 2012) miatt hipertenziót okozhatnak. Az erekben a glukokortikoidok gátolják a vazodilatátorok (prosztaciklin, nitrogén-monoxid) felszabadulását (Lee *et al.*, 2012). A miocitákban csökkentik az annexinek keletkezését (Nussinovitch *et al.*, 2010) és a miociták hipertrófiáját okozhatják (Ren *et al.*, 2012).

Az idegrendszert érintő mellékhatások közül kiemelhetők a hangulati élet zavarai, akár pszichózisig fejlődő pszichés zavarok, enkefalopátia, álmatlanság, depresszió, pszeudotumor cerebri (Gensler, 2013)2013) (Vagace *et al.*, 2012).

A további lehetséges szteroid mellékhatások között meg kell említeni a szemészeti elváltozásokat: katarakta, glaukóma; a kültakarót érintő elváltozásokat, mint bőr atrófia, elhúzódó sebgyógyulás, striák, hipertrihózis.

II/3. Farmakogenetika

A dolgozatban csak azon tényezőket mutatjuk be röviden, melyek az általunk vizsgált citosztatikumok (MTX, antraciklinek, glukokortikoidok) farmakogenetikájában játszanak szerepet, és amelyeket vizsgálni is tudtunk.

II/3/1. ABC transzporterek

Az élő szervezet általános membrán-transzporterei tartoznak ide, melyek a sejtek efflux mechanizmusaiban, vagy a sejtekbe bekerült idegen anyagok eltávolításában játszanak szerepet. Energiaigényes transzport folyamatokról van szó, működésük során ezen transzmembrán fehérjék ATP-t hidrolizálnak. Nevüket is az ATP-kötő képességükről kapták („adenosine triphosphate binding cassette”, ABC). Transzmembrán doménekből (TMD) és nukleotidkötő doménekből (NBD) állnak, összesen 7 nagy csoportba sorolhatók (A-G) (9. ábra). Az intracelluláris ATP-kötő domén aminosav sorrendje állandó (Szakacs *et al.*, 2008). Az egyes domének között intracelluláris linker régió (L) is előfordulhat (Kruh *et al.*, 2003). Szervezetünk minden szövettípusában megtalálható univerzális méregtelenítő mechanizmust jelentenek, melyek védik a szervezet integritását a xenobiotikumok ellen (Borst *et al.*, 2000), (Haimeur *et al.*, 2004).

Az onkológiában is kiemelten fontos szerepet töltenek be, hiszen a legtöbb daganatellenes szer transzportjában, sejtekből való kipumpálásában szerepet játszanak.

A malignus betegségek kezelése során kialakuló multidrog rezisztenciának (MDR) az egyik fő útját jelentik. A membránfehérjéket kódoló gének polimorfizmusai megváltoztathatják a transzporterek működését és így jelentősen tudják befolyásolni a gyógyszerek metabolizmusát és farmakokinetikáját (Kerb *et al.*, 2001).

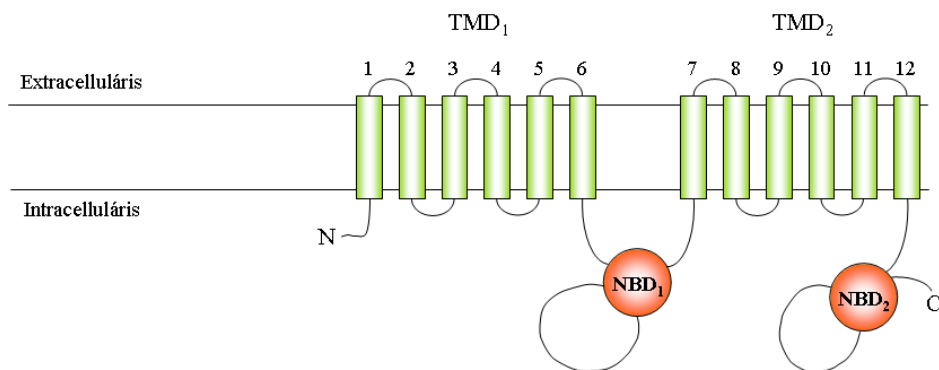
ABCB1

A 7-es kromoszóma q21-es régiójában elhelyezkedő gén által kódolt fehérje volt az első olyan ABC transzporter, melynek gyógyszer rezisztenciát okozó hatását leírták, és elnevezték MDR1-nek (Klein *et al.*, 1999) (Kerb *et al.*, 2001) (9. ábra).

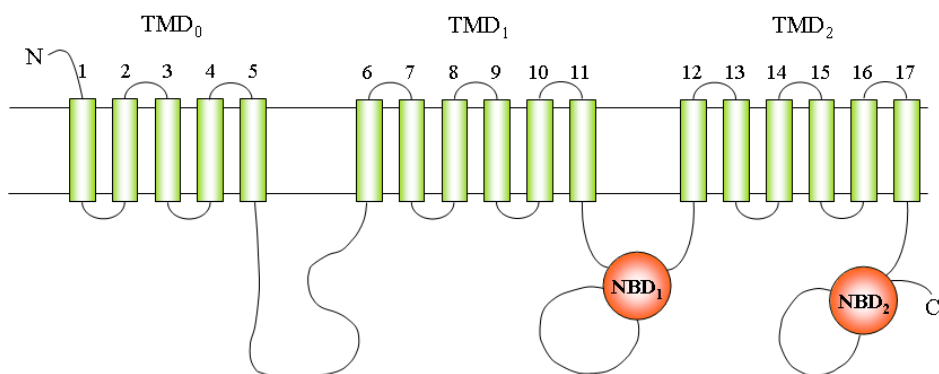
Az ABCB1 egy nagyon széles szubsztrát-spektrumú aktív transzporter, a glikoproteint 1280 aminosav építi fel, molekula súlya 170 kDa. Előfordul pl. az emésztőrendszer hámsejtjeiben, a vesékben, az agyban, a méhlepényben, a herében és a hemopoetikus őssejtekben. Védi a szervezet belső integritását és a védett kompartmenekből kiválasztja a

xenobiotikumokat (Bunting, 2002) (Zhou *et al.*, 2008). Szerepe lehet az apoptózis regulálásában, szállít lipideket, citokineket is (Hoffmann *et al.*, 2004; Jamroziak *et al.*, 2004a).

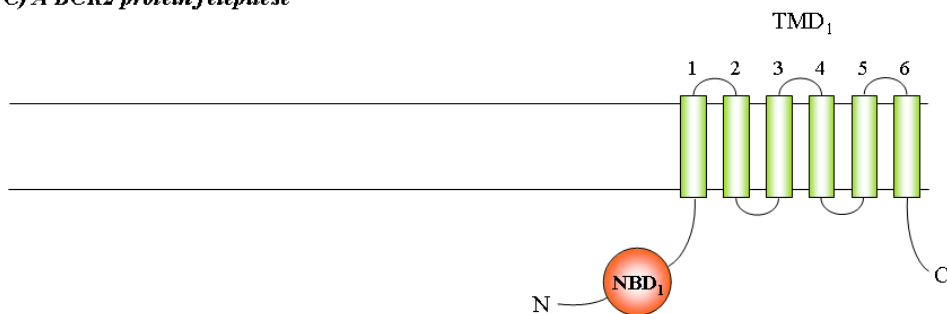
A) Az ABCB1 protein felépítése



B) Az ABCC1, 2, 3, 10 protein felépítése



C) A BCR2 protein felépítése



9. ábra: Néhány ABC transzporter szerkezete (Hegyi Márta PhD értekezés, 2013)

Nagyon sok szubsztrátja van (metabolitok, antimikrobás szerek, immunszuppresszorok, antihisztaminok, sztatinok stb) és számos daganatellenes gyógyszer metabolizmusában játszik kiemelkedő szerepet (Jamroziak *et al.*, 2004a) (Urayama *et al.*, 2007) (Leschziner *et al.*, 2007): actinomycin D, cyclosporin A, daunorubicin, doxorubicin, dexametazon, docetaxel, etopozid, imatinib, irinotecan, metotrexát, paclitaxel, vinblasztin.

Az *ABCB1* génnek több száz polimorfizmusa ismert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Néhány polimorfizmusról – köztük az általunk is vizsgált (3435T>C, 2677G>T,A és 1236C>T) polimorfizmusokról – számos közlemény jelent meg, míg a legtöbb SNP jelentőségéről nincs vagy csak kevés adat áll rendelkezésre (Zhou *et al.*, 2008). A megjelent publikációk sem mutatnak egységes képet a különböző SNP-k hatásáról. Bizonyos közlemények összefüggést találtak a 3435T allél és/vagy a vele kapcsolt 2677T, 1236T allélok következtében létrejött csökkent génexpresszió és következményes magasabb gyógyszer-expozíció között, de más tanulmányok ezen adatokat nem erősítették meg (Marzolini *et al.*, 2004) (Sakaeda, 2005). Egyes betegségek kialakulásának hajlamát (leukémia, vastagbélrák, tüdő- és vesekarcinóma kolitis ulcerosa, Parkinson kór) is összefüggésbe hozták ezen génvariánsokkal.

Az irodalom alapján úgy tűnik, hogy egyedül a 3435T>C polimorfizmus klinikai jelentőségét és hatásmechanizmusát tudjuk pontosabban megfogalmazni. Ezek szerint a 3435T allélt hordozó mRNS életideje rövidebb, mint a 3435C variánsé. Ezen kívül a kialakuló fehérje szerkezete is eltér a 3435T allél hordozása esetén, és így a transzport funkciók is változnak. Ugyanakkor a többi SNP esetén, amiknek korábban funkcionális jelentőséget tulajdonítottak (mint a 1236C>T, a 2677G>T,A vagy egyéb promóter-polimorfizmusok) nem sikerült hatáskülönbséget kimutatni.

Összefoglalva megállapítható, hogy csak a 3435T>C szinonim (az mRNS-ben nukleotidcserét okozó, de a kialakult fehérjében aminosavcseréhez nem vezető) polimorfizmusa mutat szignifikáns összefüggést a klinikai adatokkal (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

ABCC1

A 16-os kromoszóma p13.1-es régiójában található gén kódolja ezt a 1531 aminosavból álló fehérjét, melyet MRP1-nek is neveznek (Haimeur *et al.*, 2004) (Bakos *et al.*, 2007) (9. ábra). Noha ez a fehérje is megtalálható szinte minden szövetünkben, mégis elsősorban a barrier funkciójú (here, vese, tüdő, placenta, kisebb mértékben bél, agy) sejtek bazolaterális membránjában található, de előfordul intracellulárisan is (Zhou, 2008) (Haimeur *et al.*, 2004) (Bakos *et al.*, 2007). Működéséhez glutation is szükséges, szubsztrát specifitása nagy

(glukuronátok, szulfátok, glutation konjugátumok, aflatoxin, leukotriének, epesavak, szteroidok, antraciklinek, vinkrisztin). Ez a fehérje is részt vesz a toxikus anyagok elleni védekezésben, de az oxidatív stressz elleni védekezésben is (eltávolítja a sejtől a GSSG molekulákat). Összefüggésbe hozható az antraciklin rezisztenciával és a kardiotoxicitással (Deng *et al.*, 2007b) (Kruh *et al.*, 2001).

Jelenleg több mint 70 SNP-t ismerünk. Bizonyos polimorfizmusok esetén, mint pl. az általunk is vizsgált rs2426221 (exon 8, 825C>T, V275V) és rs45511401 (exon 16, 2012G>T, G671V) SNP-t hordozókban csökkent mRNS szintet találtak (Conrad *et al.*, 2001), míg mások nem találtak összefüggést az aminosavcserét okozó polimorfizmusok és az mRNS szint között (Oselin *et al.*, 2003).

Egyedül az Ala989Thr aminosavcsere okozott csökkenést az egyik szubsztrát (ösztadiol 17beta-glukuronid) transzportjában (Letourneau *et al.*, 2005). A funkcionálisnak jóslott eltérések alacsony allélfrekvenciájúak voltak (<1 %), így klinikai jelentőségük csekély (Wang *et al.*, 2006). Az *ABCC1* gén expressziójától függhet viszont az ALL prognózisa. A fokozott gén expresszió rosszabb túléléssel és nagyobb relapszus rátával volt összefüggésbe hozható (Plasschaert *et al.*, 2005).

ABCC2

Ezen fehérje felépítése nagyon hasonlít az *ABCC1*-re, 1545 aminosavból áll. A 10-es kromoszóma q24 régióján található a génje (*MRP2*) (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012) (9. ábra). Elsősorban a májsejtek apikális felszínén mutatható ki, de nagyobb mennyiségben megtalálható a proximális vesetubulusokban, a bélben, a perifériás idegekben, az epehólyag hámjában és limfocitákban (Kool *et al.*, 1997). Az *ABCC2* kifejeződik tüdő, gyomor, vese és kolorektális tumorok sejtvonalaiiban (Chen *et al.*, 2011). Sokféle szubsztrátja van: glutation, szulfátok, glukuronid, konjugált bilirubin és persze endogén metabolitok, xenobiotikumok (Nies *et al.*, 2007) (Konig *et al.*, 1999). Inhibitorai közé tartozik a probenecid, a glibenklamid, a rifampicin, az indometacin, a ciklosporin A és az azitromicin. Emelkedett *ABCC2* mRNS szintet írtak le néhány ciszplatin és doxorubicin rezisztens sejtvonalban (Haufrond, 2011). Szerepet játszik az antraciklinek, a vinkrisztin és a MTX transzportjában is (van der Schoor *et al.*, 2015) (Chen *et al.*, 2011) is.

ABCC3

A multidrug rezisztencia protein család harmadik tagja (*MRP3*), a 17q21.3 kromoszómaregióban található. Megtalálható a gyomor-, bélrendszer sejteiben, a vesében, mellékvesében, a placentán (a bazolaterális membránokon) (Kool *et al.*, 1999). Funkciója még

nem teljesen tisztázott, de biztosan szerepet játszik a szerves anionok biliáris és intesztinális kiválasztásában, valamint a toxikus epesók kiürítésében, főleg kolesztázisban (Kruh *et al.*, 2001) (Haimeur *et al.*, 2004).

Az ABCC3 többek között MTX-t is szállít, de csak a natív formát, a poliglutamált alakot már nem (vagy csak alig) (Kool *et al.*, 1999). Ezen kívül az ABCC3 folsavat és leukovorint is szállít és ily módon is befolyásolja a MTX hatását (Zeng *et al.*, 2001) (9. ábra).

ABCC10

A fehérje, melyet MRP7-nek is nevezünk 1492 aminosavból áll és génje a 6p12.3-es kromoszómarégióban található. Felépítése nagyon hasonló az ABCC1 fehérje szerkezetéhez (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012) (9. ábra), ugyanakkor aminosav összetétele a család többi tagjától eléggé különböző.

Nagy mértékben expresszálódik a vastagbélben, a bőrben és a herékben (Hopper *et al.*, 2001). A protein egy lipofil anion transzporter, mely glukuronát és glutation konjugátumokat szállít első sorban, de kölcsönhatásba léphet anionos és lipofil ligandokkal is (Chen *et al.*, 2003). Szerepe lehet a cisztás fibrózis, a hemokromatózis, az akut pankreatitisz és a policisztás vese patomechanizmusában is (CFTR betegségek) (Loukas *et al.*, 2015), valamint a Wiskott-Aldrich szindróma és a Joubert szindróma patogenezisében (WAS génhez kötött betegségek) (Buchbinder *et al.*, 2014) (Valente *et al.*, 2013).

ABCG2

Ezt a fehérjét BCRP-nek is nevezzük, mert emlőrák sejtek drogrezisztenciájával hozták először összefüggésbe (Doyle *et al.*, 1998). Génje a 4q22 kromoszómarégióban található. A transzporter egy 665 aminosavat tartalmazó glikoprotein, molekula tömege 72 kDA (9. ábra). Nagy hibrofób negatív, ill. pozitív töltésű molekulákat, többek között citosztatikumokat szállít: daunorubicin, doxorubicin, etopozid, folsav, gefetinib, imatinib, irinotecan, metotrexát, topotekan (Haimeur *et al.*, 2004) (Sarkadi *et al.*, 2004) (Huang, 2007).

Az ABCG2 leginkább a gastrointestinalis traktusban és a placentában fordul elő (sok más szövettípus mellett) (Sarkadi *et al.*, 2004). Funkciója még nem teljesen tisztázott, a bélben és az epében hozzájárul a xenobiotikumok elleni védekezéshez, hozzájárulhat az endogén szteroidok és glukuronidok hepatobiliáris exkréciójához. Részt vesz a vér-agy gát kialakításában, a magzat védelmében és fontos szerepe lehet a hemopoetikus őssejtek védelmében is (Doyle *et al.*, 1998) (Allen *et al.*, 2002).

A humán *ABCG2* génnek is száznál több polimorfizmusa ismert. Nem minden polimorfizmus jelentősége tisztázott, ill. vannak olyanok, melyek csak nagyon ritkán fordulnak elő (Krishnamurthy *et al.*, 2006) (Poonkuzhali *et al.*, 2008).

A legtöbbet vizsgált a 421C>A (Gln141Lys, rs2231142) polimorfizmus, mely a kaukázusi populációkban 10% körüli allélfrekvenciát mutat (Lee *et al.*, 2015). Az A allél a protein stabilitását csökkenti. Több gyógyszer hatékonyságával, farmakokinetikai eltéréseivel és mellékhatásaival hozták már összefüggésbe a génvariánst (tirozinkináz inhibitorok, szulfaszalazin, rozuvasztatin, topotekán). Másrésről daganatos betegségek túlélésében és bizonyos betegségek kialakulására való hajlamban is szerepet játszik (köszvény, vesesejtes rák, diffúz nagy B-sejtes limfóma) (Kurose *et al.*, 2012). Ugyanakkor a 421C>A variáció nem hajlamosít leukémia kialakulására (Muller *et al.*, 2008), nem mutat összefüggést a doxorubicin farmakokinetikájával (Lal *et al.*, 2008), nem függ össze a metotrexát farmakokinetikájával és hepatotoxicitásával (Imanishi *et al.*, 2007).

A ritkább 34G>A (Val12Met, rs2231137) polimorfizmus az mRNS-expresszió változásához vezet, de ennek klinikai jelentősége kétséges (Robey *et al.*, 2009).

II/3/2. A MTX hatásmechanizmusában szerepet játszó enzimek és génjeik

MTHFR

A MTHFR a DNS szintézis és a metilációs folyamatok fő katalizátora, az egyik legtöbbet vizsgált enzim. Az 5,10- metilén-tetrahidrofolát lebontását serkenti 5-metil-tetrahidrofoláttá, amely aztán kofaktora lesz a homocisztein-metionin átalakulásának. Ezt követően a metioninból S-adenozilmetionin képződik, mely a DNS és a proteinek metilálásáért felelős. Ugyanakkor az 5,10- metilén-tetrahidrofolát a de novo purin szintézisnek is fontos szubsztrátja.

Az *MTHFR* génje a 1p36.3 kromoszómarégióban található. Legtöbbet vizsgált polimorfizmusai az rs1801133 (677C>T, Ala222Val) és az rs1801131 (1298A>C, Glu429Ala) (Tsang *et al.*, 2015) (Liew *et al.*, 2015). Mindkét polimorfizmus csökkent MTHFR aktivitáshoz és megnövekedett homocisztein szintekhez vezet, különösen, ha a plasma folát koncentrációja csökkent. A 677C>T hatására az enzim termolabillá válik, míg a 1298A>C az *MTHFR* regulátor doménjére hat. Homozigóta formában ritkán fordulnak elő (<1 %), de heterozigótaként a kaukázusi populációban kb. 15 %-ban kimutathatók. Kevert heterozigótaság esetén az enzimaktivitás csökkenés kifejezett, ami hiperhomociszteinémiát és a toxicitás fokozódását okozhatja (Taub *et al.*, 2002) (Ulrich *et al.*, 2001)). Kimutatták, hogy

különösen a 677TT genotípus megnöveli a toxicitásra való hajlamot. Ugyanakkor az irodalmi adatok nem egyértelműek, más tanulmányok nem erősítették meg ezen adatokat (Seidemann *et al.*, 2006) (Costea *et al.*, 2006) (Aplenc *et al.*, 2004), (Krajinovic *et al.*, 2004a) (Seidemann *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2015). Leírták ugyanakkor a 677T-1298A haplotípus összefüggését magasabb relapszus rizikóval és az ALL progressziójával is (Krajinovic *et al.*, 2004b) (Krajinovic *et al.*, 2004a). Feltételezik, hogy a T allél, mely az olasz és a mexikói populációban különösen gyakori szelektív előnnyel járhat a magas folát tartalmú étrenden élők körében (Gueant-Rodriguez *et al.*, 2006).

DHFR

A MTX gátló hatását főleg ezen enzimen keresztül fejti ki. Az enzim génje az 5-ös kromoszómán található (q11.2-q13.2). Az enzim a dihidrofolát tetrahidrofolát átalakulást katalizálja, és így biztosítja a de novo purin és timidilát szintézishez szükséges egyszénatomos molekulákat. A gén egyes polimorfizmusai összefüggést mutattak az enzim fokozott expressziójával és a gyakoribb ALL relapszussal (Al-Shakfa *et al.*, 2009; Schmiegelow, 2009). Másrésről a DHFR enzim hiány megaloblasztos (B₁₂ vitamin hiányos) anémiát okozhat (Cario *et al.*, 2011).

SHMT1

A 17-es kromoszómán található gén által kódolt szerin-hidroximetiltranszferáz 1 (SHMT1) a szerin – glicin és tetrahidrofolát – 5,10-metilén-tetrahidrofolát átalakulást katalizálja. Az rs1979277 (1420C>T) polimorfizmusa csökkent MTX érzékenységet és fokozott ALL rizikót okozhat (de Jonge *et al.*, 2005).

MTHFD1

A metilén-tetrahidrofolát dehidrogenáz 1 enzim (MTHFD1) három különböző enzimátikus reakcióban vesz részt (metilén-tetrahidrofolát dehidrogenázként, metenil-tetrahidrofolát ciklohidrolázként és formát-tetrahidrofolát ligázként). A folyamatok során a tetrahidrofolát egyszénatomos molekulái átalakulhatnak egymásba. A reakció szubsztrátjai a metionin, a timidilát és a de novo purin szintézishez szükségesek. Génje a 14-es kromoszómán helyezkedik el (14q24). Az rs2236225 (1958G>A, 653Arg>Gln) polimorfizmus AA homozigóta formában fokozott relapszus rizikóval járhat gyermekkori ALL-ben (Krajinovic *et al.*, 2004b; Schmiegelow, 2009). Mások kimutatták, hogy az A allél szignifikánsan csökkenti a hepatotoxicitást (Erculj *et al.*, 2012).

TYMS

A timidilát szintáz (TYMS) enzim a dezoxiuridin-monofoszfát (dUMP) metilációját végzi dezoxitimidin-monofoszfát-tá (dTMP). A reakció kofaktora az 5,10-metilén-THF. A dTMP fontos a DNS replikációjához és a repair mechanizmusokhoz. A gén a 18-as kromoszómán található (p11.32). A *TYMS* expresszió szabályozásában a *TYMS* gén promoter enhancer régiójában található 28-bázispár hosszúságú szekvencia kettős (2R) vagy hármas (3R) tandem ismétlődése fontos szerepet játszik. A 3R polimorfizmus a TYMS szint emelkedését okozza, amely a MTX kezelés toxicitásának csökkenéséhez (Faganel Kotnik *et al.*, 2011), vagy MTX rezisztenciához vezethet.

MTS, MTSR

A metionin szintetáz (MTS, vagy másnéven homocisztein metiltranszferáz) a homocisztein – metionin átalakulást katalizálja. A reakcióhoz 5-metil-THF-ra és metil-kobalaminra van szükség. A metionin szintetáz reduktáz (MTSR) az MTS aktiválásáért és a metilkobalamin kínálat fenntartásáért felelős. Az *MTS* gén az 1-es (q43), az *MTSR* gén az 5-ös (p15.31) kromoszómán helyezkedik el. Az *MTS* rs1805087 (2756A>G) polimorfizmusa alacsony enzimaktivitáshoz vezet, de az SNP és a MTX toxicitás közötti összefüggés egyelőre ismeretlen. Az *MTSR* gén 66A>G polimorfizmusa kapcsolatban állhat a MTX toxicitással (Faganel Kotnik *et al.*, 2011).

γ -glutamil-hidroláz (GGH)

Az enzim a folát és antifolát poliglutamátok láncvégi vagy utolsó előtti γ -glutamil csoportját hidrolizálja, és ezáltal lehetővé válik a MTX eltávolítása a sejtből (Galivan *et al.*, 2000). A gén a 8-as kromoszómán helyezkedik el (q12.23-q13.1). Főleg a máj és a vese lizoszómáiban található, de előfordul a vérben, a placentában, a vastagbélben és az agyban is (Li2002) (Li *et al.*, 2002). A tumorsejtek emelkedett GGH enzimszintje az antifolátokkal szembeni rezisztenciához vezet. Számos polimorfizmusa ismert. Ezek közül a leginkább vizsgált -401C>T (rs3758149) és -124T>C promoter polimorfizmusok fokozzák a promoter aktivitását és így a GGH fehérje expresszióját. A megnövekedett GGH-szint a MTX-poliglutamát csökkent akkumulációjához és MTX rezisztenciához vezethet (Chave *et al.*, 2003; Schmiegelow, 2009). Más oldalról, a gén 452C>T (rs11545078) polimorfizmusa, az enzim csökkent működésén keresztül, az MTX-PG intracelluláris felhalmozódásához és fokozott daganatellenes hatáshoz és fokozott toxicitáshoz vezethet.

FPGS

A folil-poliglutamát szintáz (FPGS) a GGH-val ellentétes hatást fejt ki. Az enzim az MTX-PG kialakulását katalizálja, működése során egy 2-7 glutaminsavból álló láncot kapcsol a MTX molekulához. Ha csökken az FPGS enzim aktivitása, akkor kevesebb poliglutamált MTX lesz a sejtben és a citotoxikus hatás csökken, vagy a sejtek akár rezisztenssé is válhatnak MTX-szal szemben (főleg ha egyidejűleg a GGH aktivitás emelkedett) (Assaraf, 2007).

Az *FPGS* gén a 9-es kromoszómán helyezkedik el (q34.1). Az FPGS aktivitás különbözhet ALL-es betegekben a leukémia altípusai szerint (Panetta *et al.*, 2010). Az *FPGS* gén több funkcionális polimorfizmusát azonosították már, de mindeddig nem sikerült egyértelmű összefüggést kimutatni az SNP-k és a MTX hatásai között (Owen *et al.*, 2013).

RFC1 (SLC19A1)

A redukált folát karrier (RFC1), a „solute carrier family” tagja (SLC19A1), a sejtek fő folsavszállító transzportere. Az RFC1 az 5-metil-tetrahidrofolát (5-MTHF) és a tiamin-monofoszfát kétirányú transzportját teszi lehetővé és szerepe van a MTX sejtbe történő felvételében és így az antifolátok hatékonyságában is. Génje a 21q22.2-22.3 kromoszómarégióban helyezkedik el, és sokféle szövetünkben megtalálható.

A folátok, hidrophil molekulák lévén, diffúzió útján nem tudnak átmenni a biológiai membránokon. A membrántranszportban számos mechanizmus játszik szerepet: folát receptorok, szerves anion transzporterek, proton-folát transzporter, de a legjelentősebb az RFC-1 (Matherly *et al.*, 2007), mely kétirányú anioncserélő mechanizmussal működik, és nem igényel ATP-t.

A kódoló gén leggyakrabban vizsgált nem szinonim polimorfizmusa, az rs1051266 (80G>A, Arg27His), melynek következtében a molekula folát affinitása nő (Krajinovic *et al.*, 2004a). Az SLC19A1AA genotípus esetén több MTX kerül a sejtbe, mely jobb terápiás választ, de több toxicitást eredményez (Laverdiere *et al.*, 2002) (Yee *et al.*, 2010). Az SNP túlélésre gyakorolt hatásáról megoszlanak az irodalmi adatok (Gregers *et al.*, 2010) (Yee *et al.*, 2010).

NR1I2 (SXR)

A *NR1I2* (vagy régebbi nevén *SXR*: Szteroid és Xenobiotik Receptor) gén a sejtmag receptorok csoportjába tartozik. A 3-as (q12-q13.3) kromoszómán helyezkedik el, és egy 434 aminosavból álló fehérjét kódol. A sejtmag receptor szupercsalád tagjai transzkripciósfaktorok, egy ligand kötő domain és egy DNS kötő domain jellemző rájuk. Az *SXR* által kódolt fehérje, transzkripciósfaktor, mely a citokróm P450 fehérjét kódoló *CYP3A4* gént

szabályozza A folyamatot számos anyag aktiválja, pl. a dexametazon. Kötődik továbbá az *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC3* promoter régiójához is, és így részt vesz a transzportfolyamatok és a gyógyszer rezisztencia kialakításában (Lehmann *et al.*, 1998), (Zhang *et al.*, 2001), (Whirl-Carrillo *et al.*, 2012).

SLC-család (SLCO, SLCA)

Az *SLCO1B1* egy organikus aniontranszporter, mely főleg a májban és a bélben található (Trevino *et al.*, 2009a). A MTX májba történő felvétele az *SLCO1B1* és *SLCO1B3* transzporterekén keresztül történik. Ezen kívül a bilirubin és egyes gyógyszerek (sztatinok, angiotenzin-konvertáló enzim inhibitorok, rifampicin) transzportjában is szerepet játszik. Az *SLCO1B1* gén polimorfizmusai szerepet játszhatnak a HD-MTX kezelést követő farmakokinetikai eltérésekben (Trevino *et al.*, 2009a). A leggyakrabban vizsgált nem szinonim SNP-je, az rs4149056 (521T>C, Ala174Val) a transzporter funkció és a MTX clearance csökkenésével jár (Niemi *et al.*, 2011). A gén más polimorfizmusai (rs11045879, rs4149081) is összefüggést mutattak a MTX clearance-szel valamint a kezelést követő gasztrointesztinális toxicitással (Trevino *et al.*, 2009a; Lopez-Lopez *et al.*, 2011; Lopez-Lopez *et al.*, 2013).

A MTX a vesében szintén organikus aniontranszporterekén keresztül jut be (*SLC22A6*, *SLC22A8*). A fehérjéket kódoló gének egymáshoz kapcsoltnak a 11-es kromoszómán (11q12.3) található (Rizwan *et al.*, 2007). Vannak irodalmi adatok arra vonatkozólag, hogy az *SLC22A6/SLC22A8* géneket érintő haplotípus eltérések esetleg összefüggést mutathatnak a MTX clearance-szel (Lopez-Lopez *et al.*, 2013).

ARID5B

A gén egy transzkripciós fehérjét kódol, mely – más DNS-kötő fehérjékhez hasonlóan - az „AT-rich interaction domain”(ARID) családnak a tagja. A gén a 10-es kromoszómán található (q21.2). Az *ARID5B* gén szerepet játszik az adipogenezisben, a máj fejlődésében, de a sejtnövekedésben és a B-limfocita progenitorok differenciálódásában is (Trevino *et al.*, 2009b). Kimutatták, hogy az *ARID5B* gén bizonyos SNP-i összefüggést mutattak a megnövekedett intracelluláris MTX-PG koncentrációval és a B-sejtes hiperdiploid ALL (jobb prognózis) kialakulásával (Trevino *et al.*, 2009b; Healy *et al.*, 2010). Elképzelhető, hogy a leukémia kialakulása és a terápiára adott válasz összefüggenek egymással (Xu *et al.*, 2012), ill. a leukémia kialakulásában potenciálisan szerepet játszó infekciók és a gén egy polimorfizmusa között találtak összefüggést (Rudant *et al.*, 2015). Ugyanakkor az *ARID5B*

gén MTX farmakokinetikával vagy toxicitással kapcsolatos összefüggéseire nem találtunk irodalmi adatot.

II/3/3. Antraciklinek

Genetikai polimorfizmusok az antraciklin okozta kardiotoxicitásban

Az irodalmi adatok alapján az antraciklinek kardiotoxicitásában megnyilvánuló egyéni különbségek hátterében a többek között következő géncsoportok állhatnak: a szabadgyök-képzésben részt vevő gének (pl. *NQO1*), az antraciklin-transzportját végző ABC-transzporterek (*ABCC1*, *ABCC2*), az antraciklint metabolizáló gének (*CBR1*, *CBR3*, *AKR1A1*) (Deng *et al.*, 2007a) (Mordente *et al.*, 2009) (Blanco *et al.*, 2008).

Szabadgyök képzésben résztvevő gének (*NQO1*, *CAT*, *SOD*)

Az antraciklinek szívkárosító hatásában az oxidatív stressznek nagy jelentősége van. Mindazonáltal nagyon kevés adatunk van a szabadgyök képzésben résztvevő gének és a kardiotoxicitás kapcsolatáról. A *NQO1* gén a NAD(P)H dehidrogenáz család egyik enzimét a citoplazmatikus 2-elektronreduktázt kódolja. A kialakult szabadgyököket a glutation peroxidáz, a kataláz és a SOD1 (*SOD1*) közömbösíti. Ezen túlmenően a DOX-szemikininok is szerepet játszanak a kardiotoxicitásban (Vasquez-Vivar *et al.*, 1997).

A NADPH-citokróm P450 reduktáz segítségével alakul át a doxorubicin DOX-7-deoxiglikonná, ebben a folyamatban a xantin-oxidáz és az *NQO1* vesznek részt (Gutierrez *et al.*, 1983).

A kataláz és a szuperoxid-dizmutáz 1 overexpressziója egérben védelmet nyújt az antraciklin indukálta szívkárosító hatással szemben (Mukhopadhyay *et al.*, 2009). A *CAT* gén -259G>A SNP-je és a vérnyomás szabályozása között találtak asszociációt (Mansego *et al.*, 2011).

Továbbá a glutation S transzferáz gének overexpressziója egyes sejtvonalakban az antraciklin kisebb károsító hatásaival állt összefüggésben (Deng *et al.*, 2007b).

ABC transzporterek és kardiotoxicitás

A szívben több ABC-transzporter is expresszálódik: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCG2* (Couture *et al.*, 2006) (Solbach *et al.*, 2006). ABC-transzporter gátlókkal a kardiotoxicitás fokozható (Couture *et al.*, 2006).

Egy tanulmányban a doxorubicin szintet emelkedett találták azon betegekben, akik legalább egy *ABCB1* 1236T allélt hordoztak (Lal *et al.*, 2008). Az *ABCB1* 1236-2677-3435 pozíciókban homozigóta, CC-GG-CC genotípusú betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt a doxorubicin szint és fokozott a doxorubicin clearance, mint a CT-GT-CT, ill. TT-TT-TT genotípusokat hordozó betegekben. Az *ABCG2* 421C>A polimorfizmus és doxorubicin szint között ugyanakkor nem találtak összefüggést. Mások azt találták (NHL betegekben), hogy az NAD(P)H oxidáz multienzim komplex p40phox alegységét kódoló *NCF4*, az ugyanennek az enzimkomplexnek a p22phox alegységét kódoló *CYBA* és *RAC2* gének egy-egy polimorfizmusa a krónikus antraciklin-indukálta szívkárosodás megjelenésével függték össze. Az *ABCC1* és az *ABCC2* gének egyes polimorfizmusai összefüggést mutattak a csökkent szívfunkcióval. Az akut kardiotoxicitást az *ABCC1* Gly671Val SNP (rs45511401) és az *ABCC2* gén V1188QC1515Y haplotípusa befolyásolta (Wojnowski *et al.*, 2005).

Karbonil reduktázok (CBR1, CBR3)

A humán karbonil-reduktáz 1 (CBR1) egy citoszolikus fázis I enzim, mely NADPH felhasználásával a vegyületek kételektronos redukálását végzi. A génnek két leginkább vizsgált polimorfizmusa a Val88Ile (rs1143663) és a Pro131Ser (rs41557318).

Az Ile88 és Ser131 aminosavakat tartalmazó CBR1 fehérjével rendelkező betegekben kevesebb alkohol-metabolit keletkezik és több szabad gyök képződhet (Gonzalez-Covarrubias *et al.*, 2007) (Bains *et al.*, 2009).

A *CBR1* gén befolyásolhatja a doxorubicin clearance-ét is (Lal *et al.*, 2008). A *CBR3* gén Val244Met (rs1056892) polimorfizmusa megváltoztatja a protein katalitikus aktivitását, a valin tartalmú fehérje esetén több alkohol-metabolit képződik. A homozigóta Val244 betegek esetében a súlyos szívprobléma kialakulásának esélye lényegesen nagyobb (Blanco *et al.*, 2008). A doxorubicin clearance-re az *NR1I2* gén (másnéven PXR: pregnane-X-receptor) is hatást gyakorolhat, mely indukálja a *CYP3A4*, *CYP3A5* és az *ABCB1* expresszióját (Sandanaraj *et al.*, 2008).

AKR1A1

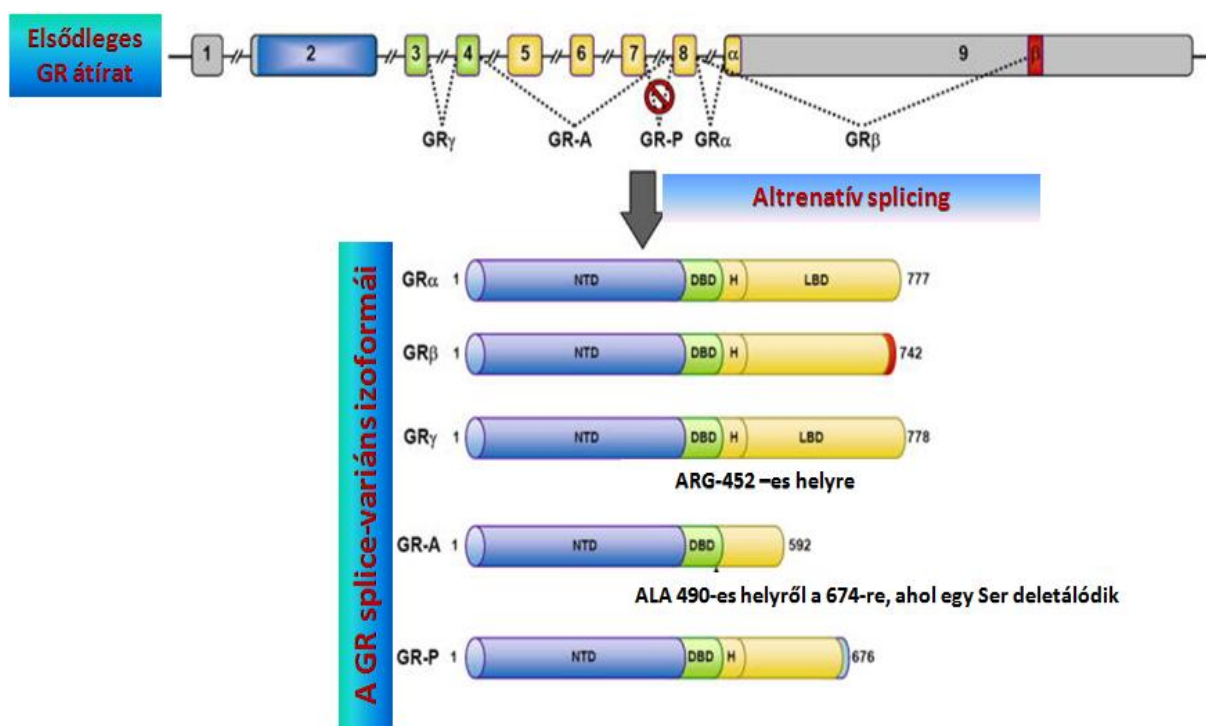
Az *AKR1A1* gén két aminosavcserét okozó polimorfizmusa az Asn52Ser és a Glu55Asp. Az aszparaginsav, ill. szerin tartalmú fehérjéknek kb. 50%-kal kisebb a katalitikus hatékonysága, mint a vad-típusú fehérjéknek. A kisebb aktivitású fehérjék csak az antraciklinek alkoholszármazékai ellen nyújtanak védelmet (Bains *et al.*, 2008).

II./3/4 Glukokortikoid receptor polimorfizmusok

A GCR izoformái és a gén polimorfizmusai

A GCR gén (NR3C1) az 5q31 kromoszóma szakaszon található, 150kB terjedelmű és 9 exonból áll. A 3' végen lévő 9. exonnak 2 formája ismeretes, melyek alapján a GCR 2 fő **izoformáját** különböztetjük meg (GR α és GR β) (E132). A GR β inkább gátló hatást fejt ki a GR α kötődésére, és így felelős lehet a glukokortikoid-rezisztencia kialakulásában (Webster *et al.*, 2001) (Lewis-Tuffin *et al.*, 2006).

További izoforma a GR γ , mely beköt a GRE-hez, de a glukokortikoid mediálta transzkripció folyamatokat gátolja, és így szintén glukokortikoid rezisztenciához vezethet (Beger2003) (E136). A GR-A és GR-P az LBD-t kódoló régió alternatív splicingjából keletkeznek és szintén csökkent glukokortikoid érzékenységhez vezetnek (Oakley *et al.*, 2013) (10. ábra).

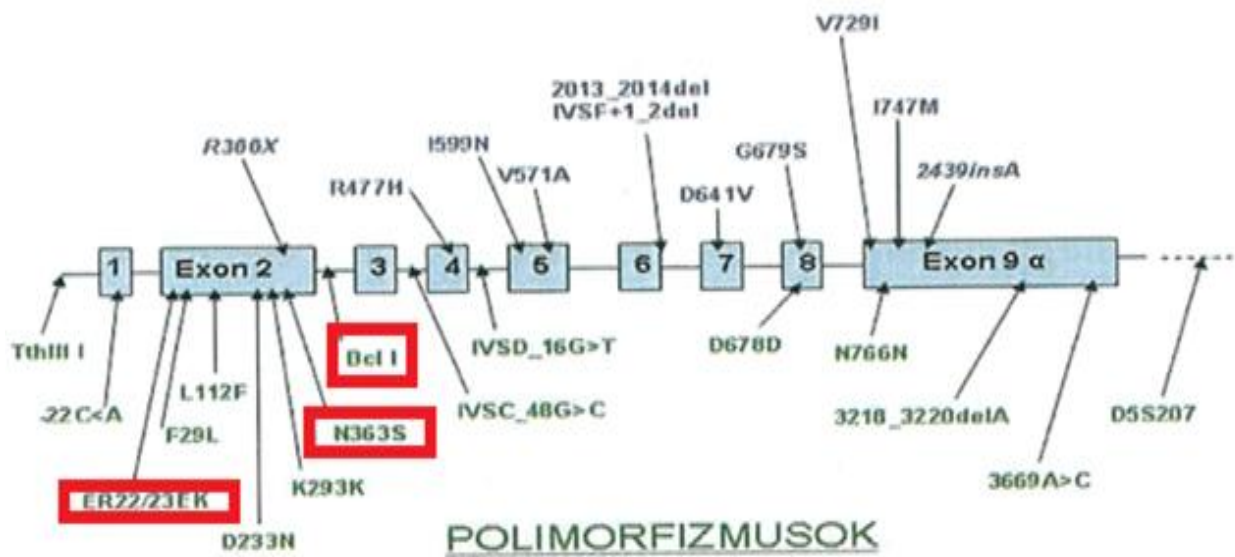


10. ábra: A GCR splice variánsai

(Dr. Eipel Olivér PhD értekezés) (2016)

A GCR génben napjainkig több ezer polimorfizmust írtak le (Koper *et al.*, 2014). Ezen polimorfizmusok jó része intronban vagy az át nem íródó 3'UTR régióban található. A minor allél-frekvencia az esetek döntő többségében 1% alatti. A polimorfizmusok jó része nem eredményez működésbeli különbséget, míg másoknál a transzkriptum mennyisége vagy a GCR érzékenysége változik meg.

A GCR gén kódoló régiójának három leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az N363S, az ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusok (11. ábra).



11. ábra: Az általunk is vizsgált SNP-k lokalizációja a GCR génen belül

(Dr. Majnik Zsuzsanna Doktori értekezés 2006)

N363S

Az N363S (1220A>G) variáns esetében a nukleotid csere a 2. exonban, a 363-as kodonban történik (adenin cserélődik guaninra), ami egy aminosav cserét (aszparagin/szerin) okoz. Ez a változás fokozott glukokortikoid érzékenységgel jár (Jewell *et al.*, 2007). A polimorfizmus gyakorisága 3,2%-14,3% (Russcher *et al.*, 2005). A 363S hordozók magasabb BMI indexszel rendelkeznek, hajlamosabbak az elhízásra, cukorbetegségekre és magas vérnyomásra (különösen a BCL1 polimorfizmussal kombinálva) (Cercato *et al.*, 2009) (Cellini *et al.*, 2010) (Di Blasio *et al.*, 2003) (Roussel *et al.*, 2003). A 363S hordozás esetén gyakrabban fordul elő a koszorúerek megbetegedése, hiperkoleszterinémia, hipetrigliceridémia, és kedvezőtlenebb összkoleszterin-HDL arány (Lin *et al.*, 2003a). Mások nem találtak összefüggést az N363S

polimorfizmus és az emelkedett BMI (Echwald *et al.*, 2001) vagy a magasvérnyomás és a cukorbetegség kialakulása között (Lin *et al.*, 2003b). Az idegrendszeri hatások tekintetében is ellentmondásosak az adatok. Van olyan tanulmány, melyben a hordozók körében nagyobb arányban figyeltek meg depresszióra való hajlamot (van Rossum *et al.*, 2004) míg más adatok ezt nem tudták kimutatni (Szczepankiewicz *et al.*, 2011).

ER22/23EK

Az ER22/23EK (198G>A és 200G>A) variáns két nukleotid cserével jár szintén a 2-es exonban, a 22-es és a 23-as kodonban, melyek aminosav cserét eredményeznek (glutaminsav argininre és glutaminsav lizinre). Az ER22/23EK polimorfizmus gyakorisága a kaukázusi populációban 3,6-8,9% között figyelhető meg (van Rossum *et al.*, 2004) (Wust *et al.*, 2004). Ez az SNP csökkent glukokortikoid érzékenységet és kedvezőbb metabolikus hatásokat eredményez (van Rossum *et al.*, 2004). Dexametazon szuppressziós teszt során a normálshoz képest kisebb mértékű kortizol szint csökkenés mérhető. Ezen polimorfizmus esetén a glukokortikoid receptor transzaktivációs kapacitása csökken (Russcher *et al.*, 2005). A hordozókban javul a HDL/LDL koleszterin arány, valamint csökken az összkoleszterin szint és nő az inzulin érzékenység (Koeijvoets *et al.*, 2006). Familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedők esetén például kisebb a szív koszorúér betegség rizikója a polimorfizmus megléte esetén. Az ER22/23EK polimorfizmus kedvezőbb antropomorfiái paraméterekkel járhat, vannak olyan adatok, melyek szerint férfiakban nagyobb testmagasságot és nagyobb izomerőt mértek a variáns allél hordozása esetén (Kuningas *et al.*, 2006). Ha a glukokortikoidok pszichogén hatásait tekintjük, akkor ezen polimorfizmus hordozása esetén inkább kevesebb demenciát és fehérállomány léziót írtak le, ill. a kognitív funkciók jobbnak mutatkoztak a nem hordozókkal szemben (van Rossum *et al.*, 2008). Más vizsgálatok több major depressziós állapotot találtak a hordozókban (Brouwer *et al.*, 2006).

BCL1

A BCL1 polimorfizmus a 2. és 3. exonok között elhelyezkedő intron B-ben egy citozinguánin nukleotid cserét okoz. Ez a nukleotid csere megszünteti a Bcl I restrikciós enzim felismerési helyét (Srivastava *et al.*, 2011). A polimorfizmus az irodalmi adatok alapján talán szintén megnöveli a glukokortikoidok iránti érzékenységet (van Rossum *et al.*, 2003). A polimorfizmus gyakorisága a kaukázusi populációban 25,7-49,2% -ra tehető, a homozigóta GG genotípus is viszonylag gyakori (Russcher *et al.*, 2005). Az N363S polimorfizmushoz

hasonlóan, a BCL1 polimorfizmusnál is nagyobb mértékben csökken a vér kortizol szintje a dexametazon szuppressziós teszt folyamán (Manenschijn *et al.*, 2009).

Fiatal egyéneknél megnövekedett BMI értékeket, kifejezettebb abdominális elhízást és magasabb inzulin szinteket írtak le a polimorfizmust hordozókban (Rosmond *et al.*, 2000) (Tremblay *et al.*, 2003), mások viszont hasonló összefüggést nem találtak (Kuningas *et al.*, 2006) (Clement *et al.*, 1996). Érdekes megfigyelés, hogy a BCL1 G alléljának és a 363S együttes hordozása összefüggésbe hozható a szérumban a koleszterin szinttel (Di Blasio *et al.*, 2003), viszont ha egyedül vizsgálták a polimorfizmusok hatását, akkor nem találtak összefüggést a szérumban a zsírszintekkel vagy HbA1c-vel (Kuningas *et al.*, 2006). Az idegrendszeri hatások tekintetében a GG homozigótákban nagyobb az esélye a különböző depressziós szindrómák kialakulásának (Krishnamurthy *et al.*, 2008) (Bachmann *et al.*, 2005).

III. Célkitűzések

Új prognosztikai faktorokat kerestünk gyermekkori ALL-ben és OSC-ban, melyekkel pontosabban megbecsülhetők a kezelési eredmények és a túlélés.

Különböző HD-MTX kezelések toxicitását és farmakokinetikáját vizsgáltuk, összefüggéseket keresve a szérumszintek és a kezelések eredményessége és toxicitása között.

Farmakogenetikai vizsgálatokat is végeztünk gyermekkori ALL-ben és OSC-ban, azzal a céllal, hogy kapcsolatokat találjunk a különböző kemoterápiás szerek által okozott toxicitások és a potenciálisan ezek hátterében szerepet játszható gének polimorfizmusai valamint bizonyos genetikai eltérések és a kezelések eredményessége között.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Prognosztikai tényezők vizsgálata gyermekkori akut limfoid leukémiában és oszteosarkómában

a, Gyermekkori ALL-ben a 8., 15. és 33. terápiás napon mért abszolút (normál) limfocitaszám ill. az indukciós kezelések hossza mutat-e összefüggést a kezelés eredményességével, a túléléssel és a hagyományos, korszerű MRD meghatározási módszerekkel (morfológia, flow citometria, PCR)?

b, Milyenek a túlélési eredmények és mik a prognosztikai markerek oszteosarkómában a magyarországi betegekben (retrospektív adatgyűjtés alapján)? Mutatnak-e összefüggést a különböző prognosztikai markerek, úgymint a betegség kiterjedése, az életkor, a nem, a műtét típusa, a lokalizáció, illetve a diagnózis ideje a kezelés eredményességével?

2. A MTX farmakokinetikája és toxicitása gyermekkori malignitásokban

a, Milyen mértékű a HD-MTX kezelések vesekárosító hatása különböző hidrálni protokollok mellett?

b, Milyen szérumszintek (OSC és ALL esetén) és likvorszintek (ALL-ben) érhetők el különböző adagú és típusú HD-MTX kezelések mellett a magyar betegpopulációban?

c, Milyen összefüggések tárhatók fel a különböző dózisú HD-MTX kezelések toxicitása és a szérumszintek között gyermekkori ALL-ben és OSC-ban?

d, Vannak-e farmakokinetikai vagy toxicitási különbségek ugyanazon beteg ismételt HD-MTX kezelése során?

e, Milyen összefüggések találhatók a MTX gyógyszerszintek és a túlélés között OSC-ban?

3. Farmakogenetikai vizsgálatok gyermekkori akut limfoid leukémiában (ALL) és oszteoszarkómában (OSC)

- a, Van-e kapcsolat az antraciklinek kardiotoxicitásában potenciálisan szerepet játszó *ABCC1* gén polimorfizmusai és a kardiotoxicitás között?
- b, Létezik-e asszociáció különböző membrántranszporter gének (*ABCB1*, *ABCG2*) egyes polimorfizmusai és az intenzív kemoterápiás kezelés alatti akut szövődmények (fertőzések, súlyos neutropénia, encefalopátia) között ALL-ben?
- c, Hogyan befolyásolják az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusai a túlélést ALL-ben?
- d, Van-e összefüggés bizonyos glukokortikoid receptor génpolimorfizmusok (N363S, ER22/23EK, BCL1) és a szteroidok által okozott akut mellékhatások között ALL-ben.
- e, Milyen összefüggések létezhetnek a fent említett GCR polimorfizmusok és a túlélés között?
- f, Van-e kapcsolat a MTX metabolizmusában szerepet játszó gének (metabolikus enzimek, membrántranszporterek) egyes polimorfizmusainak a gyógyszerszintekre és a toxicitásra ALL-ben?
- g, Van-e asszociáció OSC-ban a MTX metabolizmusában szerepet játszó gének bizonyos polimorfizmusainak a MTX farmakokinetikai paramétereivel és toxicitásával?

IV. Betegek, módszerek

IV/1. Prognosztikai tényezők vizsgálata

IV/1/1. Prognosztikai tényezők vizsgálata gyermekkori ALL-ben

A 2002. december és 2011. június közötti időszakban összesen 133 gyermeket kezeltünk a Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekgyógyászati Klinikáján ALL IC BFM 2002 protokoll szerint (47 lány, 85 fiú). A gyermekek átlagos életkora a diagnóziskor $6,8 \pm 4,3$ év volt (medián 4,8 év, 1,1-16,7 év).

Immunfenotípus szerint leggyakrabban a B-limfocita sejtvonal (109 beteg, 82 %), ritkábban a T-limfocita sejtvonal volt érintett (23 beteg, 17,3 %), egy esetben pedig bifenotípusos ALL-t (0,7 %) diagnosztizáltunk.

A rizikócsoporthatározás (I. tábl.) a BFM munkacsoport ajánlása alapján történt: 45 gyermek került az SR (34,1 %), 60 az MR (45,4 %) és 27 (20,5 %) a HR csoportba.

Vizsgáltuk a szteroid kezelésre adott választ (perifériás blaszt szám a 8. napon).

Kiszámoltuk az indukciós kezelés hosszát, hogy értékelni tudjuk a terápiás csúszások hatását a kezelés eredményességére.

Lehetséges új prognosztikai markerként elemeztük a perifériás vérben az abszolút limfocitaszámot (ALC) a 8., 15. és 33. napon.

Meghatároztuk a csontvelőben a 15. és 33. napon a terápiás választ három különféle MRD módszerrel is: fénymikroszkópos morfológia, flow citometria és PCR.

A *morfológiát* May-Grünwald-Giemsa festés után fénymikroszkóp segítségével értékeltük ki. A 15. napi minták vizsgálatakor az 5 %-nál kevesebb leukémiás sejtet mutatók az M1, vagyis a jó prognózisú csoportba kerültek. Az 5 % és 25 % közötti blasztszámmal jellemzett betegeket a közepes rizikójú, M2-es csoportba soroltuk. Végül a rossz prognózisúak (M3) a >25 %-os tumoros sejtarányt mutatók lettek. A 33. napon csak jó (< 5 %; M1) és rossz ($\geq$ 5 %; M2, M3) prognózist különítettünk el.

A *flow citometriás* mérések a daganatos sejt felszínén található antigének specifikus monoklonális ellenanyagokkal végzett kimutatásán alapultak FACS-Calibur típusú flow-citometeren. Jó terápiás válasznak a 15. napon (a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően) a 0,1 % alatti blaszt számot tekintettük. A közepes rizikójú csoportba a 0,1-10 % közötti, míg a HR csoportba a 10 % feletti blasztarányt mutatókat soroltuk.

A 33. napon jó terápiás válasznak tekintettük a 0,1 % alatti, közepes válasznak a 0,1-1 % közötti, míg rossz válasznak az 1 % fölötti blaszt számot.

A flow citometriás méréseket dr. Barna Gábor végezte a Semmelweis Egyetem I. Kórbonctani Intézetében.

Kis rizikójú (SR) csoport:

- a kezelés 8. napján a perifériás vérben <1000 blaszt/ μ l
- $1 \text{ év} \leq \text{életkor} < 6 \text{ év}$
- kezdeti fehérvérsejtszám $< 20.000/\mu$ l
- a kezelés 15. napján M1-s vagy M2-s csontvelő (<25 % blaszt)
- a kezelés 33. napján M1-s csontvelő (<5 % blaszt)

Közepes rizikójú (MR) csoport:

- a kezelés 8. napján a perifériás vérben <1000 blaszt/ μ l
- életkor: $<1 \text{ év}$ vagy $\geq 6 \text{ év}$ és/vagy kezdeti fehérvérsejtszám $\geq 20.000/\mu$ l
- a kezelés 15. napján M1-s vagy M2-s csontvelő morfológia
- a kezelés 33. napján M1-s csontvelő

vagy

- SR csoport kritériumai
 - a kezelés 15. napján M3-s csontvelő
- és
- a kezelés 33. napján M1-s csontvelő

Nagy rizikójú (HR) csoport:

- MR csoport kritériumai és a kezelés 15. napján M3-s csontvelő (>25 % blaszt)
- vagy a kezelés 8. napján perifériás vérben ≥ 1000 blaszt/ μ l
- vagy a kezelés 33. napján M2-s vagy M3-s csontvelő (>5 % blaszt)
- vagy egyes fúziós gének jelenléte: t(9;22) BCR/ABL vagy t(4;11) MLL/AF4

1. táblázat: A BFM munkacsoport rizikó besorolási kritériumai gyermekkori ALL-ben

A csontvelő minták PCR vizsgálatát szintén az I. Sz. Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézetben, 7300 Real Time PCR System típusú gépen végeztük klasszikus módszerrel Taq-polimeráz-zal. A PCR során B-sejtes ALL esetén az IgM nehézlánc átrendeződést, T-sejtes

ALL fenotípus esetén pedig a TcR génátrendeződést vizsgáltuk. Az eredmények kiértékelése kvalitatív módon történt.

MRD pozitívnak tekintettük a beteget, ha a 33. napon a flow cytometriával $>0,1$ % blasztot találtunk, vagy ha a PCR-MRD pozitívnak bizonyult.

A PCR vizsgálatokat Dr. Tímár Botond és Dr. Bödör Csaba végezték.

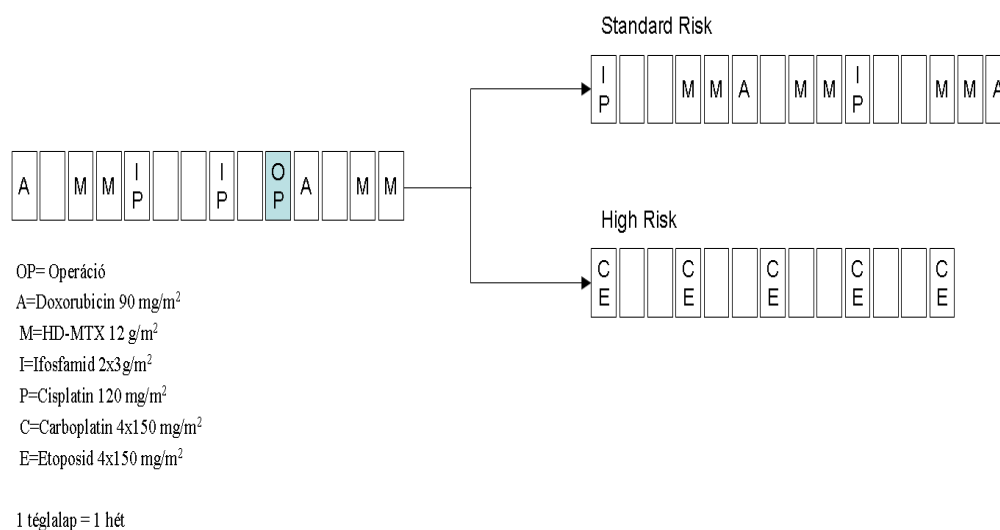
IV/1/2. Prognosztikai faktorok vizsgálata gyermekkori OSC-ban

Ebben a munkában az 1987 és 2006 között, a II.sz. Gyermekklinikán oszteosarkómával kezelt 122 beteg adatait elemeztük (átlagéletkor $13,8 \pm 3,6$ év). A betegek adatai a 2. táblázatban láthatók

Szempont	Csoportok	Betegek száma
Összesen		122
Metastasis	Nincs metasztázis	95
	Korai metasztázis	15
	Késői metasztázis	12
Műtét típusa	Biopszia	6
	Amputáció	30
	Végtagmegtartó	82
Diagnózis ideje	1988-1995	58
	1996-2006	64
Lokalizáció	Törzs	9
	Felső végtag	16
	Alsó végtag	97
Nem	Fiú	65
	Lány	57
Szövettani altípus	Oszteoblasztos	62
	Kondroblasztos	16
	Fibroblasztos	15
	Egyéb	29
Neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz	Rossz válasz	38
	Kedvező válasz	44
	Ismeretlen	40
Életkor	≤ 14 éves	58
	> 14 éves	64

2. táblázat: A vizsgált OSC betegek adatai

A betegek kezelése a COSS-86 illetve COSS-96 protokollok sztandard ága szerint történt, amely neoadjuváns és adjuváns kemoterápiát, valamint radikális műtétet foglal magába (Fuchs1998) (12. ábra).



12. ábra: Az OSC betegek kezelésére alkalmazott COSS protokoll

Vizsgáltuk az általános (OS) és eseménymentes (EFS) túlélést, valamint a retrospektív adatfeldolgozás során elemeztük az adatokat a betegség kiterjedése, az életkor, a nem, a szövettan, a műtét típusa, a lokalizáció alapján, illetve a diagnózis ideje szerint.

Prognosztikai összefüggéseket kerestünk a különböző betegcsoportokban.

A protokoll rizikóbesorolási kritériumai a 3. táblázatban láthatóak.

Rizikócsoporthatározás	
Alacsony rizikójú csoport	a tumor térfogata ≤ 70 ml, a szövettani választól függetlenül, vagy
	a tumor térfogata 70-150 ml és I-II.fokú szövettani válasz
Standard rizikójú csoport	a tumor térfogata 70-150 ml és III-IV.fokú szövettani válasz, vagy
	a tumor térfogata ≥ 150 ml és I-IV.fokú szövettani válasz
Magas rizikójú csoport	a tumor térfogata ≥ 150 ml és V-VI.fokú szövettani válasz
A neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz osztályozása	
I.	nincs túlélő daganatsejt
II.	elszórta található egy-egy daganatsejt vagy daganatsejtcsoport, melynek mérete 0,5 cm alatt van
III.	a túlélő daganatsejtek aránya 10% alatt van
IV.	a túlélő daganatsejtek aránya 10-50% között van
V.	a túlélő daganatsejtek aránya 50% felett van
VI.	hatástalan kemoterápia

3. táblázat: Rizikó meghatározás a COSS protokollok alapján OSC-s betegekben

IV/2. A HD-MTX toxicitása és farmakokinetikája gyermekkori ALL-ben és OSC-ban

IV/2/1. Betegek, kezelés – vesetoxicitási vizsgálat

Először egy 4 éves periódusban (1989-1992) összesen 39 beteg 97 MTX kezelésénél elemeztük a **vesefunkciókat**. Az első 2 évben 24 beteg (10 fiú és 14 lány, átlagéletkor $14,2 \pm 4,1$ év) 52 MTX kezelése során kevésbé intenzív hidrációt és alkalizációt alkalmaztunk: előhidrációt csak akkor végeztünk, ha a vizelet fajsúlya 1010 felett volt, ill. a kezelés utáni hidrációsban csak akkor alkalmaztunk vénás bikarbonátot, ha a vizelet pH 7 alá csökkent. Ebben a csoportban 10 oszteosarkómás, 9 ALL-s és 5 non-Hodgkin lymphomás (NHL) gyermek volt.

A második két évben minden beteg (11 fiú, 4 lány, átlagéletkor: $11,4 \pm 4,6$ év, összesen 45 MTX kezelés) intenzív elő- és utóhidráltást kapott ($3000 \text{ ml/m}^2/\text{nap}$) és a vizelet pH-tól függetlenül folyamatos iv. bikarbonát kezelésben részesült ($120 \text{ mMol/m}^2/\text{nap}$). Ebbe a csoportba 7 OSC és 8 ALL beteg került.

A MTX adagja OSC esetében $12 \text{ g/m}^2/6$ óra, míg ALL és NHL esetében $5 \text{ g/m}^2/24$ óra volt. Minden beteg a szérumszint MTX lecsökkenéséig a szokásos Ca-leukovorin védelmet kapta (15 mg/m^2 6 óránként). OSC esetén a leukovorin kezelés a MTX indulásának 30. órájától, míg ALL esetén a 42. órától történt mindaddig, amíg a szérumszint nem került $0,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$ alá.

IV/2/2. Betegek, kezelés - ALL

A HD-MTX farmakokinetikai paramétereit összesen 153 ALL-s (1998-2010) beteg összesen 583 HD-MTX kezelése során elemeztük.

Az ALL-BFM 1995-ös és ALLIC 2002-es protokoll standard ága alapján 5 g/m^2 dózisú MTX kezelésre 65 gyermeknél (41 fiú és 24 lány) összesen 241 esetben került sor. A gyermekek átlagéletkora 7,2 év volt ($0,5-17,9$ év). A protokollnak megfelelően, a terápia konszolidációs fázisában 2 hetente, összesen 4 alkalommal kaptak intratekális (8-12 mg életkornak megfelelően) és HD-MTX-ot 24 órás, folyamatos infúzióban. A hidráltási protokoll a következő volt: előhidráltás: $1500 \text{ ml/m}^2/12$ óra (500 ml-ben: 0,45% NaCl –5% glukóz + 40 ml 4,2% NaHCO_3 + 10 ml 7,4% KCl), ezt követte 48-72 órán keresztül az utóhidráltás: $3000 \text{ ml/m}^2/24$ óra 0,45% NaCl –5% glukóz + $120 \text{ ml/m}^2/\text{nap}$ 4,2% NaHCO_3 + 60 ml 7,4% KCl 7,4%). A MTX hatásának felfüggesztésére Ca-leukovorint (folinsav) használtunk (l. előbb).

Az ALLIC 2002-es protokoll kísérleti ágán 2 g/m^2 -es MTX kezelést 88 beteg kapott (50 fiú, 38 leány, átlagéletkoruk 6,1 év ($1,0-16,7$)) összesen 342 alkalommal.

A gyermekeket tovább csoportosítottuk életkoruk alapján. Külön megvizsgáltuk az 1-6 év közötti (kedvező prognózisú) betegek farmakokinetikai és toxicitási paramétereit (az 5 g/m^2 csoportban összesen 130 HD-MTX kezelés, míg a 2 g/m^2 csoportban 230 MTX ciklus).

Továbbá külön megvizsgáltuk az adollescensek (>14 év, kedvezőtlenebb prognózis) értékeit (27 kezelési ciklus 5 g/m^2 MTX-nál és 23 kezelési ciklus 2 g/m^2 adagnál).

IV/2/3. Betegek, kezelés - OSC

Az OSC-s csoportban összesen 98 beteget tudtunk vizsgálni (összesen 929 MTX blokk), ezek fő jellemzői az 4. táblázatban találhatóak (a többi 24 betegről nem álltak rendelkezésre megfelelő adatok). A betegek átlagéletkora $13,7 \pm 3,6$ év volt, és a betegek $12 \text{ g/m}^2/4-6$ óra

adagban kapták a MTX-ot. A statisztikai elemzésből kizártuk továbbá azokat a blokkokat, melyek esetében előzetes toxicitás miatt dózisredukció történt (129 blokk), illetve azokat, melyek esetében az infúzió hossza 6 óra helyett 4 óra volt (95 blokk). Így a 98 beteg 765 MTX blokkja (ún. szabályos blokk) képezte farmakokinetikai elemzésünk homogén adatbázisát.

Betegek száma	Összesen	98
Nem	Fiú	49
	Lány	49
MTX blokkok száma	Összes MTX blokk	929
	MTX blokkok száma betegenként (medián)	9,0
	Szabályos MTX blokk Beteg 81	765
	Szabályos MTX blokkok száma betegenként (medián))	10,0
Életkor	Életkor átlaga (év)	13,6±2,4
	14 év alatti	46
	14 év feletti	52
Rizikócsoporth	Alacsony és közepes rizikó	69
	Magas rizikó	25
	Nem ismert a rizikócsoporth	4
Szövetvettani válasz	Rossh (>50 % túlélő daganatsejt)	14
	Mérsékelt (10-50% túlélő daganatsejt)	15
	Jó (<10% túlélő daganatsejt)	39
	Nem ismert a szövetvettani válasz	30

4. táblázat: A farmakokinetikai elemzésbe bevont OSC-s betegek adatai

IV/2/4 Módszerek

IV/2/4/1. Vesetoxicitási vizsgálat

Vizsgáltuk a kezelés előtt, alatt és után a szérum elektrolit, vese- és májfunkciós értékeket ill. MTX szinteket és 24 órás vizeletgyűjtések alapján számoltuk ki a különböző vesefunkciós paramétereket (kreatinin clearance (C kreat), tubuláris foszfát reabszorpció (TPR), Ca ürítés (Ca excr.), frakcionált Na ürítés (FeNa), frakcionált K ürítés (FeK), fehérjeürítés (U feh) és vizelet Ca/kreatinin hányados (U Ca/kreat)).

A MTX szintmérések ebben az időszakban HPLC módszerrel történtek.

IV/2/4/2-3.. MTX farmakokinetikai vizsgálatok ALL-ben és OSC-ben

Szérum és likvor MTX mérések

A szérum MTX-szinteket a 6. (csak OSC esetén), 24., 36. és 48. órában (ill. a MTX kiürüléséig) határoztuk meg nagy-nyomású folyadék kromatografiával (HPLC) (2006 előtti mérések), ill. enzim-immunoassay (EIA) módszerrel (2006 után). Szintén ezen módszerrel mértük a likvor MTX szinteket a HD-MTX kezelés 24. órájában (ALL) és a MTX szintekkel párhuzamosan, a betegek egy részében meghatároztuk a bomlástermék, a 7-OH-MTX szérumszintjeit is HPLC-vel (ALL-ben, 2006 előtt).

OSC esetén blokkonként kiszámoltuk, hogy a 24, illetve a 48 órás szérum MTX szint hány százaléka a 6 órákor mért csúcskoncentrációnak, ezzel jellemezve a gyógyszerszintek egymáshoz való viszonyát, vagyis a MTX ürülést (24h%, 48h%).

Meghatároztuk a görbe alatti területet (trapezoid módszerrel), mert ez a paraméter az extracelluláris koncentrációtól és az expozíciós időtől egyaránt függ. A koncentráció – idő görbét a 6, 24, 36, 48 MTX-szintek alapján határoztuk meg, és az elemzésbe a 0 és a 48 óra közötti intervallum görbe alatti területét használtuk (AUC_{0-48}).

Tekintettel arra, hogy OSC betegek esetén rendelkezésünkre állt elegendő mérés (min. 4 szérumszint betegenként), így az ő esetükben ki tudtuk számolni a betegek MTX clearance-ét is: a tényleges MTX dózist ($12 \text{ g/m}^2 \times \text{testfelület}$) elosztottuk a 24órás görbe alatti területtel. Meghatároztuk az első (24-36 óra) és második 36-66 óra) eliminációs fázis felezési idejét ($T_{1/2 \alpha}$ és $T_{1/2 \beta}$). Meghatároztuk továbbá a dózisintenzitást is (átlagos heti MTX dózis): a kezelés során kapott összes MTX dózist elosztottuk az első és utolsó blokk között eltelt hetek

számával. Azon betegeket vettük bele ebbe az elemzésbe, akik legalább 8 blokkot kaptak (OSC esetén).

ALL betegek esetén csak a 24, 36, 48 órás szérumszinteket elemeztük, ill. – az előzőekben ismertetett módon – meghatároztuk az AUC-t.

A MTX metabolizmusát a lebomlási termék 7-OH-MTX és a MTX szintek hányadosával jellemeztük (szérumszintek és AUC esetén is, bizonyos ALL betegeknél).

A betegek az iv. HD-MTX kezelés mellett, a központi idegrendszeri hatás fokozására intratekálisan is kapnak MTX-ot (ALL esetén). Az intratekális gyógyszer beadása a HD-MTX infúzió 24. órájában történt, így a gyógyszerbeadás előtt levett 24 órás likvor MTX szinteket is meghatároztuk (ALL-ben) és viszonyítottuk az értékeket a szérumszintekhez.

Klinikai és laboratóriumi adatok

ALL-s betegeknél a kezelés előtt és után (-1. nap - 1 hét) követtük a máj- és vesefunkciós értékeket, a szérumszinteket és a vérkép változásait és az esetleges toxikus tüneteket, mellékhatásokat. Regisztráltuk a súlyos hematológiai toxicitást (a 80 g/l alatti hemoglobin koncentrációt, az 1,0 G/l alatti fehérvérsejtszámot, 50 G/l alatti trombocitaszámot), és a máj illetve vesefunkciós paramétereket (a 100 $\mu\text{mol/l}$ feletti szérumszintet kreatinin koncentrációt, a 200 U/l feletti szérumszintet GPT értékeket, 50 $\mu\text{mol/l}$ feletti szérumszintet bilirubin szintet és a 60 g/l alatti szérumszintet fehérjekoncentrációt).

Összefüggéseket kerestünk a farmakokinetikai paraméterek és a toxicitási tünetek, valamint a túlélés (csak OSC-ben) között. ALL-ben a betegcsoport inhomogenitása, a különböző kezelési protokollok és a kezelések intenzitásában fellépő különbségek miatt a túlélést nem tudtuk vizsgálni.

OSC-ben az ALL-es betegekhez hasonlóan regisztráltuk a mellékhatásokat.

A toxicitás kategorizálása az Európai Daganatkutatási- és kezelési Szervezet (EORTC) által meghatározott toxicitási kritériumrendszer (CTC 3.0 verzió) alapján történt (5. tábl.).

		Toxicitási fokozat				
		0	1	2	3	4
Csontvelő	Hb (g/l)	>120	100-120	80-100	65-80	<65
	fehérvérsejt ($10^9/l$)	4,0 – 10,0	3,0 – 4,0	2,0 – 3,0	1,0 – 2,0	< 1
	granulocita ($10^9/l$)	> 2,0	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	0,5 – 1,0	< 0,5
	thrc (G/l)	>150	75-150	50-75	25-50	<25
Máj	GPT (U/l)	<40	40 - 100	100 - 200	200 - 800	> 800
	GGT (U/l)	<40	40 - 100	100 - 200	200 - 800	> 800
	Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<17	17 - 26	26 - 51	51 - 170	> 170
Vese	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	< 100	100 - 150	150 - 300	300 - 600	> 600

5. táblázat Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC) 3.0 verzió egyes toxicitási paraméterei

Tekintettel arra, hogy más gyakoriságú és súlyosságú toxicitásokkal kellett számolnunk OSC esetén, így itt más kategorizálást használtunk: májtoxicitásnak GPT esetében a III-IV. fokú, GGT és bilirubin esetében a II-IV. fokú, csontvelő-toxicitásnak (fehérvérsejt, trombocita) a III-IV. fokú, míg vesetoxicitásnak az I-IV. fokú toxicitás előfordulását definiáltuk.

IV/3. Farmakogenetikai vizsgálatok gyermekkori ALL-ben és OSC-ban

Tekintettel arra, hogy a vizsgálatokat az elmúlt 20 évben, különböző betegpopulációkon és különböző módszerekkel és lehetőségekkel tudtuk csak vizsgálni, így a vizsgált kérdéskörökben a betegszám, időnként a kezelési protokoll, vagy a rendelkezésre álló módszer különböző volt. Ennek megfelelően külön, részletesen mutatjuk be, hogy a célkitűzésekben megfogalmazott kérdések megválaszolására milyen betegszámok, kezelési periódusok és módszerek álltak rendelkezésre.

IV/3/1. Az antraciklinek kardiotoxicitását befolyásoló *ABCC1* polimorfizmusok hatása ALL-ben

Betegek, kezelések, klinikai adatok

1990 és 2002 között antraciklinnel kezelt 235 ALL betegről tudtunk DNS-t izolálni (6 gyermek hemato-onkológiai központból). A betegek adatai a 6. tábl-ban láthatók.

A vizsgált populáció az ezen időszakra vonatkozó teljes mo-i ALL-s betegeket tekintve 70 % volt (összes kezelt beteg ebben a periódusban 337).

		klinikai adatok (%)
összes beteg		235
Nem (%)	fiú	126 (54)
	lány	109 (46)
Életkor (év)		$5,7 \pm 3,7$ (1,2-17,9)
Rizikó csoport	LR	61 (26)
	MR	155 (66)
	HR	19 (8)
Kemoterápiás protokoll	BFM 90	83 (35)
	BFM 95	152 (65)
Dexrazoxan kezelés	Nem	164 (70)
	Igen	69 (30)
Antraciklin dózis (mg/m ²)	kezelés végén	$218,4 \pm 44,1$ (n=224)
	utolsó szívUH	$236,5 \pm 81,0$ (n=179)
LVFS (%)	diagnóziskor	$39,54 \pm 6,12$ (n=116)
	kezelés végén	$39,16 \pm 6,02$ (n=167)
	utolsó szívUH	$38,58 \pm 5,18$ (n=167)
Kemoterápia hossza (év)		$2,0 \pm 0,36$ (0,8-3,3; n=192)
utolsó szívUH időpontja (év)		$6,4 \pm 2,7$ (2,4-13,7; n=168)

6. táblázat: A kardiotoxicitás irányában vizsgált betegek adatai

Szív ultrahang (ECHO) vizsgálatokat végeztünk a diagnózis idején, a kemoterápiás kezelés befejezésekor (2 év), és az utolsó követéses vizsgálat alkalmával (átlag 6,4 évvel a kezelés befejezése után). A következő paramétereket határoztuk meg az ECHO segítségével: roströvidülés („shortening fraction”, FS), bal kamra átmérő systolében (LVEDs) és diastolében (LVEDd). Összesen 7 beteg esetében relapsus következett be. Ezen betegek esetén értékeltük a relapsus előtti utolsó ECHO eredményét, és a relapsus utáni utolsó követéses vizsgálat eredményét is.

Genotipizálás

Az *ABCC1* gén potenciálisan a kardiotoxicitás szempontjából szerepet játszó (gyakoribb és valószínűleg funkcióval bíró) 12 SNP-jét próbáltuk meghatározni. Technikai okok miatt végül is csak 9 SNP-t tudtunk vizsgálni.

A DNS-t remisszióban lévő betegek perifériás vérmintáiból (n=206), vagy csontvelő mintáiból (n=19) nyertük. Azon betegek esetén, akikből már nem volt minta nyerhető a retrospektív adatfeldolgozás során, neonatalis szűrőpapírból (n=4) vagy buffy coat-ból (n=6) vontunk ki DNS-t. A kivonás QIAmpBlood DNA Maxi Kit (Qiagen) segítségével történt perifériás vér esetén. Csontvelő kenetek és limfociták esetén HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics), míg szűrőpapírok esetén Chelex 100 reagenssel (Bio-Rad Laboratories) történt. A vizsgált SNP-eket a 19. tábl-ban tüntettük fel (l. később az eredmények résznél).

Az *ABCC1* rs45511401 „single base extension” módszerrel SNaPshot Multiplex Kit és ABI 310 segítségével (Applied Biosystems), míg a többi *ABCC1* SNP-t GenomeLab SNPstream genotipizáló platformmal (Beckman Coulter) határoztuk meg (Semsei *et al.*, 2012).

IV/3/2. Genetikai tényezők hatása a kezelések immunszuppresszív mellékhatásaira

ALL-ben

Betegek, kezelések, klinikai adatok

Ebbe a tanulmányba 186 akut limfoid leukémiás gyermeket (1-18 év, medián életkor 5,0 év) tudtunk bevonni, akiket az ALL BFM 95 kemoterápiás protokollok alacsony és közepes rizikójú ága szerint kezeltek a 8 hazai gyermek hemato-onkológiai centrum valamelyikében (dg. ideje: 1995-2003). Ez a betegpopuláció az összes ezidő alatt kezelt magyar beteg 86 %-a volt. Összesen 48 beteget ki kellett zárunk a végső analízisből, mert az intenzív kemoterápia

befejezése előtt meghaltak, vagy nem volt elegendő minta, hiányoztak az adatok (elveszett kórlapok!) vagy jelentős eltérések voltak a kemoterápiás protokolloktól. Így végül **138** beteg adatait tudtuk vizsgálni (72 fiú, 66 lány), mely az összes Mo-i beteg 56 %-át jelentette.

Összegyűjtöttük az antibiotikus (intenzív vénás, széles spektrumú kezelések) ill. antimikotikus kezelési napok számát az indukció során és a reindukciós fázisban (ezekben a szakaszokban várható nagyobb frekvenciával infekciók kialakulása), valamint értékeltük az intenzív kemoterápiás kezelés hosszát (halasztások idejét). A súlyos fertőzések esetén az intravénás kezelések hosszát vizsgáltuk a betegpopuláció medián értéke mentén (>18 nap) ill. a betegcsoport felső kvadránsa (leghosszabb, legsúlyosabb kezelések, >29 nap) alapján is.

Megvizsgáltuk a súlyos GrIII/IV (fvs < 2 G/l) leukopéniás napok számát a kezelések reindukciós fázisában (a kezdeti indukciós fázisban azért nem, mert ekkor a citopéniás állapothoz a leukémiás blaszttömeg jelentősen hozzájárul, míg a Prot II/reindukció során, már csak a citosztatikus szerek csontvelő károsodása a jelentős). Összefüggéseket kerestünk az *ABCB1* és *ABCG2* membrántranszporterek egyes meghatározó SNP-i és az immun-suppresszív mellékhatások előbb említett paraméterei között.

Az adatgyűjtésben Dr. Erdélyi Dániel, Dr. Cságoly Edit, Dr. Müller Judit, Dr. Hegyi Márta, Váradi Gábor működtek közre.

Genotipizálás

A betegek többségében perifériás vérből vontuk ki a DNS-t további vizsgálatokra (n=165). A meghalt betegek esetén a korábban eltett csontvelői kenetekből (n=16) vagy a neonatalis Guthrie teszthez használt szűrőpapírból (n=5) vontunk ki DNS-t QIAmp Blood DNA Maxi kit-tel (Qiagen) vagy nagy tisztaságú PCR Template Preparation kit-tel (Roche).

Az *ABCB1* 3435C>T, 2677G>T,A és 1236C>T genotípusát miniszekvenálással, multiplex „single base extension” módszerrel (Gwee *et al.*, 2003) határoztuk meg, míg az *ABCB1* genotípusok detektálása ABI 310 Genetic Analyzer készülékkel történt.

Az *ABCG2* 34G>A és 421C>A genotípust Roche Light Cycler segítségével, olvadáspont analízissel, allél diszkriminációs rendszerrel (Szilvasi *et al.*, 2005) határoztuk meg.

A DNS kivonást Staub Krisztina és Félné Dr. Semsei Ágnes, a genotipizálást Dr. Erdélyi Dániel, Dr. Zalka Anna, Dr. Kámory Enikő, Dr. Csókay Béla, Dr. Andrikovics Hajnalka és Félné Dr. Semsei Ágnes végezte.

IV/3/3. A kezelések idegrendszeri mellékhatásait befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata ALL-ben

Betegek, kezelések, klinikai adatok

A vizsgálat harmadik fázisában 291 ALL-s gyermek adatait analizáltuk (dg. ideje: 1991-2005). 16 beteget kizártunk az értékelésből protokoll deviáció ill. hiányos dokumentáció miatt, így végül 275 gyermek (medián életkor 4,2 év, 1-18 év) adatait használtuk fel az értékelésre, mely az ezen időszak alatt Magyarországon kezelt betegek 50 %-a volt. Ezen betegek az ALL BFM 90 és az ALL BFM 95 protokoll szerint kapták a kezelést (a két protokollban csak minimális különbség volt, a 95-ösben kevesebb kis-adagú citozin arabinozid szerepelt, de ez az encefalopátiás elemzést valószínűleg nem befolyásolta).

Vizsgáltuk az intenzív kemoterápiás kezelés ideje alatt a központi idegrendszeri toxicitásokat: encefalopátia, görcs, eszméletvesztés, tudatzavar, bénulások. Elemeztük a különböző polimorfizmusok hatását külön-külön ill. csoportokban az idegrendszeri mellékhatásokra.

Genotipizálás

Meghatároztuk az előbb feltüntetett (*ABCB1* és *ABCG2*) génpolimorfizmusokat (l. előbb), a korábban említett munkatársak segítségével.

IV/3/4. *ABCB1* és *ABCG2* polimorfizmusok hatása az ALL túlélésére

Betegek, módszerek

A BFM ALL 90 és ALL 95 protokollal kezelt összesen 403 beteg esetén rendelkezünk genetikai adatokkal és klinikai (túlélés) eredményekkel. Az elemzést 2007-ben végeztük, átlagosan 6,5 év követési idő után. Az egyes genotípus csoportok a különböző prognosztikai tényezők (genetikai eltérések, nem, kor, immunfenotípus, rizikócsoportok) tekintetében nem különböztek egymástól szignifikánsan, így ezen nagyobb betegpopuláción tudtuk Kaplan-Meyer analízis segítségével vizsgálni a túlélést. A feldolgozás hibája, hogy a meghalt betegek alacsonyabb számban voltak képviselve a mintában, mert a retrospektív DNS kivonás a meghalt betegek esetében nem volt teljes (technikai okok miatt). Így a túlélés abszolút értékei jobbakké a tényleges értékeknél, de mivel a hiba mindhárom genetikai alcsoport esetén azonos valószínűséggel következett be (nem közölt adatok), így az egymáshoz viszonyított túlélési görbék értékelhetők.

IV/3/5. GCR polimorfizmusok elemzése ALL-ben

Betegek, kezelések, klinikai adatok

Ebben a vizsgálatban 346 esetben (207 fiú, 139 leány) gyűjtöttünk DNS-t ALL-s betegekből, akik diagnózisa 1989 és 2004 közé esett (életkor 1-18 év). Ők a BFM ALL 90 és 95 protokoll szerint kapták a kezelésüket az ország különböző gyermekonkológiai központjaiban. A protokollban az indukcióban 3 hetes, 60 mg/m² prednizolon kezelés szerepel, míg a reindukciós fázisban (Prot. II.) 3 hetes dexametazon kezelés van (10 mg/m²).

Összegyűjtöttük a glukokortikoidok lehetséges mellékhatásaira vonatkozó toxicitási adatokat: hiperglikémia (éhomiai vércukor >6 mmol/l, vagy étkezés utáni vércukor >8,8 mmol/l), glukóзуria, pankreatitisz (szérumban amiláz >300 U/l), májenzim emelkedés (GPT >400 E/l, gGT >400 E/l, Sebi >85 μmol/l), encefalopátia (görcs, pszihózis, tudatzavar, bñulások), szemészeti eltérések, hipertónia (életkor szerint >95 percentil), csontelváltozások (oszteoporózis, növekedési zavar, femur-fej nekrozis).

Korrelációkat kerestünk a genetikai variabilitás és a toxicitási tünetek között, valamint vizsgáltuk a 8. napi szteroid kezelésre adott választ és a túlélést is.

Genotipizálás

Allél-specifikus PCR segítségével analizáltuk a glukokortikoid receptor gén (GCR) N363S génpolimorfizmusát (Majnik *et al.*, 2006) (Liu *et al.*, 1997). A DNS-t hematológiai remisszióban vontuk ki perifériás vérből HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) segítségével. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk (elektroforézis), majd ethidium bromid-dal festettük. A leolvasás ultraviola fényben történt.

Az ER22/23EK génpolimorfizmust olvadáspont analízissel határoztuk meg (Light Cycler, Software Version 4.05).

A BCL1-et RFLP-vel határoztuk meg. A polimorfizmus detektálására hasonlóan az N363S esetéhez, itt is allél specifikus PCR módszert használtunk (Gergics *et al.*, 2006). A primerek az Invitrogen Life Technologies-tól, (Glasgow, UK) származtak. Itt is gélelektroforézissel tettük láthatóvá az eredményeket.

A genotipizálást Dr. Eipel Olivér, Dr. Németh Krisztina és Staub Krisztina végezte.

IV/3/6. MTX farmakogenetikai vizsgálatok ALL-ben

Betegek, kezelése, klinikai adatok (ALL)

Összesen 118 betegről tudtunk DNS mintát gyűjteni, így ezen betegpopuláción végeztük farmakogenetikai vizsgálatainkat (7. tábl.).

A MTX kezelések megegyeztek a korábban leírtakkal.

A toxicitás elemzéseknél a CTC kritériumok alapján a III./IV. toxicitási fokozatot vettük figyelembe (l. korábban). A kezelések utáni első hét legkiugróbb adatát használtuk az elemzéshez.

Jellemzők			Érték
Betegek száma			118
Nem (%)	Fiú		74 (62,7 %)
	Lány		44 (37,3 %)
Átlagéletkor a dg-kor			6,4 (1,1-18) év
Protokoll (%)	ALL-BFM 95		25 (21,2 %)
	ALL IC-BFM 2002		93 (78,8 %)
Rizikó csoport (%)	SR		38 (32,2 %)
	MR		60 (50,8 %)
	HR		20 (17 %)
Immunfenotípus (%)	B-ALL		95 (80,5 %)
	T-ALL		21 (17,8 %)
	bifenotípusos		2 (1,7 %)
MTX dózis (%)	5 g/m ²	betegek száma	48 (40,7 %)
		MTX kezelések száma	178 (38,4 %)
	2 g/m ²	betegek száma	70 (59,3 %)
		MTX kezelések száma	285 (61,6 %)
MTX kezelések száma összesen		463	

7. táblázat: A MTX farmakogenetikai vizsgálatokba bevont leukémiás gyermekek és MTX kezeléseik jellemzői

Genetikai analízis (ALL)

Az irodalom (GWAS) alapján 14 gént és 63 SNP-t választottunk ki, melyek kapcsolatban állhatnak az MTX metabolizmusával. Azon SNP-ket választottuk ki, melyek esetében a minor allélfrekvencia >10% volt a populációnkban. Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés miatt 4 SNP-t kizártunk (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Az SNP-k jellemzőit a 26. táblázat szemlélteti (l. később, eredmények résznél).

A DNS izolálás hematológiai remisszióban levett perifériás vérmintákból történt, retrospektív mintagyűjtéssel. Az izoláláshoz a QIAmp DNA Blood Midi Kit-et (Qiagen, Hilden, Germany) használtuk. A genotipizálás Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával a kanadai (Montréal) McGill University and Génome Québec Innovation Centre-ben történt. Csak azokat az SNP-ket elemeztük, amelyek genotipizálása legalább 90 %-ban sikeres volt.

A vizsgálatokat végezte: Dr. Csordás Katalin, Félné Dr. Semsei Ágnes és dr. Csorba Orsolya.

IV/3/7. MTX farmakogenetikai vizsgálatok OSC-ban

Betegek, kezelés, klinikai adatok (OSC)

A vizsgálatban 62 (32 fiú, 30 leány) oszteoszarkómás gyermek ((átlagéletkor $13,5 \pm 2,9$ év (5-18 év) MTX kezelését (n=571) vettük alapul (a kezelési protokoll a korábbiakban leírtak megfelelő volt). Nem kerültek be a DNS mintagyűjtés kezdete előtt exitált betegek vagy ha nem állt rendelkezésre DNS, illetve akiknek a kórházi dokumentációja (fizikai károsodás miatt) nagyon hiányos volt. Vizsgáltuk a hematológiai ill. máj- és vesetoxicitást a kezelés előtt és az azt követő 2 hétben (l. korábban).

A toxicitást az NCI CTC 2.0 verziója alapján határoztuk meg, és a III./IV. fokozatú toxicitásokat elemeztük. Kombinált toxicitási elemzést (hematológia és máj együtt) is végeztünk.

A MTX infúzió indítása után 6, 24, 36 és 48 órával mért szérumszinteket (HPLC), valamint a kezelést követő első két hét legalacsonyabb összfehérje, fehérvérsejt, granulocita és trombocita számait, legmagasabb szérumszinteket (GPT, GGT, bilirubin, és kreatinin értékeit kategorizáltuk (l. korábban, farmakokinetikai vizsgálatok).

A mintagyűjtést Dr. Hegyi Márta és Dr. Erdélyi Dániel végezte.

Genetikai analízis (OSC)

A genetikai vizsgálathoz 12 gén összesen 46 egy pontos nukleotid polimorfizmusát választottuk ki a nemzetközi irodalom alapján (mind a MTX metabolizmusában játszanak fontos szerepet). A minor allél frekvencia alsó határát 10%-nál határoztuk meg. Ezután ellenőriztük, hogy az egyes SNP-k az általunk vizsgált populáción Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak-e, illetve kapcsoltsági vizsgálatokat végeztünk a redundáns elemzések elkerülése érdekében. Így az *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC10*, *ABCG2*, *GGH*, *SLC19A1* és *SXR* gének összesen 29 polimorfizmusának hatását elemezhettük (28. tábl., l. később).

SLC19A1 80A>G polimorfizmus (rs1051266) és *GGH* -401C>T promóter-polimorfizmust perifériás vérből szeparált DNS-ből PCR-RFLP segítségével határoztuk meg.

Az *ABCC3* -211C>T (rs4793665) és *ABCC3*-211C>T mutáció vizsgálatához Real-Time PCR vizsgálatot végeztünk TaqMan módszerrel.

Az *ABCB1* polimorfizmusok, valamint az *ABCC2* (rs2273697) genotipizálása multiplex PCR-t követő multiplex miniszekvenálással, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékkel történt. Az *ABCG2* gén két polimorfizmusának vizsgálatához LightCycler PCR módszert használtunk. A régió amplifikálását célzó PCR reakciót követően olvadáspont-analízissel határoztuk meg a minták genotípusát. A többi polimorfizmus genotipizálása GenomeLab SNPstream rendszerrel (Beckman Coulter) történt.

Ezen módszerekkel történő genotipizálás Dr. Erdélyi Dániel, Félné Dr. Semsei Ágnes és Dr. Hegyi Márta munkája volt.

Etikai engedélyek

Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hozzájárult a vizsgálatokhoz és az adatgyűjtéshez (12988-52/2003-1018-EKU és 323-101/2005-1018-EKU)

IV/4. Statisztika

A statisztikai feldolgozás során legtöbbször a $p < 0,05$ értéket vettük szignifikánsnak. Farmakogenetikai vizsgálatainkban a p értéket a vizsgált SNP-k számával Bonferoni módszerével korrigáltuk. A túlélés meghatározására a Kaplan-Meier módszert használtuk. A különböző csoportok görbéinek összehasonlítása és a szignifikancia meghatározása logrank teszttel történt. Emellett Cox regressziós modelljével hazard meghatározást is végeztünk (folyamatos változóknál). A független változók és a különböző szempontok közötti kapcsolat meghatározásánál a Cox proporcionális modellt használtuk. A farmakokinetikai és laboratóriumi vizsgálatok során normál eloszlás esetén parametrikus tesztek (student t-teszt, Pearson korreláció) végeztünk. A normál eloszlás vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. Nem normál eloszlás esetén először logaritmikus transzformációt kíséreltünk meg, majd ha az eloszlás továbbra is „nem normál” maradt, akkor Wilcoxon-féle előjeles rang próbát vagy Mann-Whitney próbát alkalmaztunk. A patológiásra és nem patológiásra felosztott adatokat, a választott küszöbérték alatti és feletti értékeket chi-négyzet próba vagy Fisher-féle exakt próba segítségével ill. uni- és multivariáns logisztikus regresszióval határoztuk meg. Retrospektív vizsgálatainkban az eset-kontroll tanulmányok során legtöbbször alkalmazott esélyhányadost (odds ratio, OR) használtuk kockázat-bebecslésre. Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A haplotípusok gyakoriságának becslését a „Haploview” szoftverrel (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) végeztük. A populációk Hardy Weinberg-egyensúlyát (HWE) χ^2 -teszttel ellenőriztük (on-line program). A HWE-től való eltérést $p < 0,01$ érték esetén állapítottunk meg. A genotípus adatokat legtöbbször dichotomikus változóként kezeltük, ahol a két csoport a gyakoribb allélra homozigóta egyedek és a legalább egy variáns allélt hordozók voltak. Minden elemzésben 95%-os konfidencia intervallumot számítottunk (Wald módszerrel). A MTX farmakokinetikai és farmakogenetikai vizsgálatok elemzését ALL-ben három lépcsős statisztikai elemzéssel végeztük. Elsőként a relatív kevés mérési időpont és a nagyszámú magyarázó változó miatt az elemzéseket egy random forest elemzéssel (Strobl *et al.*, 2008) kezdtük, mellyel kiválogattuk az egyes célváltozók esetén a szóba jöhető magyarázó változókat. Következő lépésben, a random forest eredményeként kapott változókra klasszifikációs és regressziós fákat (CART) állítottunk, melynek során az egy célváltozóhoz tartozó különböző mérési időpontokban mért értékeket együttesen elemeztük. Így tovább tudtuk pontosítani a változószelekciót és a módszer segített feltárni az esetleges interakciókat is. Ezen módszerek alkalmazása lehetővé teszi kis elemszámú mintán is nagyszámú magyarázó változó tesztelését. Az RF és a CART analízis minden változó szerepét

önmagában és más változókkal interakcióban is figyelembe veszi, így kiküszöbölhető, hogy a nagyobb hatású változók elnyomják a kisebb hatásúak szerepét. Elemzésünk utolsó lépésében lineáris kevert modelleket illesztettünk a korábbi lépések során kiválogatott genetikai magyarázó változókkal, illetve a demográfiai paraméterekkel. A szérumban MTX és az SNP-k közötti összefüggés esetén általános lineáris kevert modellt (GLMM), a binomiális toxicitási változók és az SNP-k közötti különbség esetén általánosított lineáris kevert modellt (GzLMM) alkalmaztunk (Pinheiro, 2000; Bates, 2012). A modellek illeszkedését az F-értékkel (GLMM) és a likelihood arány teszttel (GzLMM) néztük.

Az OSC betegek farmakogenetikai elemzése során, a hagyományos frekventista statisztikai analízisen kívül, alkalmaztuk a Bayes-i statisztikán alapuló módszereket is. A Bayesian MultiLevel Analysis of relevance (BMLA) a Monte Carlo módszerrel kiegészítve véletlenszerűen felderíti a lehetséges kapcsolatrendszer halmazát, és így véletlen események sorozatával tudunk megoldani determinisztikus problémákat (minden egyes teljes modellben) (Baldwin *et al.*, 2012). A módszerhez a folytonos farmakokinetikai változókat diszkrét változókká alakítottuk. A gyógyszer-szintek esetében a klinikailag egyértelműen meghatározható cut-off értékeket használtuk (csúcskoncentrációt 1000 $\mu\text{mol/l}$ ill, 48h MTX plazmaszint esetében 0,4 $\mu\text{mol/l}$). Más esetekben pedig a medián, vagy percentilis értékek alapján diszkrétizáltunk. Az elemzés során a kapcsolati hálók csomópontokból (diszkrét változók) és nyílakból (élekből) állnak. A nyíl iránya mutatja, hogy melyik változó hat melyikre. Kiszámolható, hogy két változó között az egyes éleket a modellek milyen valószínűséggel támasztják alá (összeadjuk azon modellek valószínűségét, amik tartalmazzák az élt), vagyis, hogy egy él milyen erős.

A Markov Blanket Membership (MBM) elemzés során a modellek éleinek nem csak a meglétét, hanem ún. Markov-takaróbeliségét is vizsgáltuk (Han *et al.*, 2010). Az élekkel operáló, kapcsolatok felderítését célzó elemzésben nincs kitüntetett változó, minden esetben egy célváltozóhoz viszonyítva tudjuk vizsgálni a magyarázó változók relevanciáját. Így el tudjuk különíteni a célváltozót az összes többi közvetett magyarázó változótól, és meg tudjuk állapítani, hogy a különböző magyarázó változók milyen valószínűséggel elemei a célváltozó ún. Markov-takarójának. Az elemzés a Budapesti Műszaki Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén történt (Arany Ádám és Dr. Hegyi Márta).

A statisztikai analízisekhez még a következő szoftvereket, programokat használtuk: Statistica 7.0 (StatSoft Inc.), SPSS 13.0 (SPSS Inc.), BM® SPSS® Statistics 22.0, SAS 9.1 (SAS Institute). A farmakokinetikai és toxicitási paraméterek valamint az SNP-k közötti kapcsolatot az R 2.15 programmal elemeztük.

V. Eredmények

V/1. Prognosztikai tényezők

V/1/1. Prognosztikai tényezők vizsgálata gyermekkori ALL-ben

A diagnózis idején az átlagos fehérvérsejtszám 49,6 G/l (medián 9,2; 0,7-710,4 G/l) volt. A kedvezőbb prognózist jelentő 20,0 G/l alatti értéket 86 betegben (65,1 %), míg ennél magasabb fvs.számot 46 betegben (34,9 %) észleltünk.

A 8. napon jó prednizolon választ 113 betegnél (86,9 %), míg rossz választ 17 betegnél (13,1 %) találtunk (2 beteg nem volt értékelhető).

A betegcsoportban a betegek teljes túlélése (OS) 85,7 %, míg az EFS 78,9 % volt (19 haláleset, 22 relapsus).

Először megvizsgáltuk a már ismert prognosztikus faktorok kapcsolatát a túléléssel (log-rank teszt).

A diagnóziskori *életkor* alapján, a legjobb prognózisú 1 és 6 év közötti életkorú betegek esetén, mi is szignifikánsan magasabb OS (93,4 % vs 75 %, $p=0,003$) és EFS értékeket mutattunk ki (86,8 % vs 67,9 %, $p=0,009$). Érdekes megjegyezni, hogy az angolszász irodalomban használt jó életkori prognózisú betegcsoportban (1-10 év) a különbség szintén szignifikánsnak bizonyult ($p=0,002$), vagyis a 7-9 éves korosztály túlélése is jobb.

A *nemek* között nem találtunk különbséget a túlélés vonatkozásában (nem közölt adatok).

A betegség *immunfenotípusa* szerint a pre-B sejtes ALL-s betegek túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult a T-sejtes betegekhez képest (OS 89,8 vs 65,2 % $p=0,007$; EFS 83,3 % vs 56,5 %, $p=0,01$).

A *kezdeti fvs-szám* (20,0 G/l alatt vagy felett) – a nemzetközi adatokkal ellentétben – nem mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel (OS 88,4 % vs 80,4 %, $p=0,199$ és EFS 82,6 % vs 71,7 %, $p=0,131$). Érdekes ugyanakkor kiemelni, hogy az angolszász protokollokban használt 50 G/l határértéket választva a túlélési görbék különbsége részben szignifikánssá vált (OS 69,6 % vs 89,1%, $p=0,009$, míg EFS 65,2 % vs 81,7 %, $p=0,057$).

Megvizsgáltuk, vajon a *blasztsejtek* flow citometriával meghatározott százalékos értéke a kezdeti csontvelő mintában és a túlélés között lehet-e összefüggést találni. Érdekes módon, 90 % feletti kezdeti csontvelői blasztsejt arány esetén szignifikánsan romlott a betegek teljes (75 % vs 90,7 %, $p=0,011$) és eseménymentes túlélése (63,6 % vs 87,2 %, $p=0,001$).

A betegek *rizikócsoportokba* történő besorolása alapján, a rizikócsoportok és túlélés között szoros összefüggés volt megfigyelhető (OS: SR 95,6 %, MR 86,7 % HR 66,7 %; $p=0,002$ ill. EFS: SR 88,9 %, MR 85,0 % HR 48,1 %; ($p<0,001$)).

A 8. napi *prednizolon* válasz – az irodalmi adatokkal ellentétben – nem bizonyult szignifikáns prognosztikai faktornak (OS 86,7 % vs 82,4 %; $p=0,5$ ill. EFS 80,5 % vs 70,6 %; $p=0,27$).

A hagyományos MRD vizsgálatok eredményeinek összefüggéseit a túléléssel a 8. tábl. mutatja (nem minden vizsgálatot tudtunk elvégezni és kiértékelni minden időpontban).

	Vizsgálat típusa	Eredmény	n (%)	OS	p	EFS	p
15. nap	Morfológia	M1	49 (59%)	89,3%	<0,001	88,0%	<0,001
		M2	26 (31%)				
		M3	8 (10%)	50,0%		25,0%	
	FC	<0,1%	48 (37%)	89,1%	0,017	83,6%	0,003
		1-10%	62 (48%)				
		> 10%	20 (15%)	70,0%		55,0%	
	PCR	neg	19 (73%)	94,7%	0,425	94,7%	0,082
		poz	7 (27%)	85,7%		71,4%	
33. nap	Morfológia	M1	99 (96%)	89,7%	<0,001	84,5%	<0,001
		M2	2 (2%)	25,0%		0,0%	
		M3	2 (2%)				
	FC	<0,1%	99 (77%)	92,9%	0,002	86,7%	0,003
		≥ 0,1%	29 (23%)	73,3%		63,3%	
	PCR	neg	76 (87%)	93,4%	<0,001	86,8%	<0,001
		poz	11 (13%)	63,6%		45,5%	
	ProtM előtt	Morfológia	M1	121 (98%)	90,1%	<0,001	82,6%
M2			1 (0,8%)	0,0%	0,0%		
M3			1 (0,8%)				
FC		<0,1%	99 (79%)	92,9%	0,001	83,6%	0,076
		≥ 0,1%	27 (21%)	70,4%		70,4%	
PCR		neg	84 (92%)	90,5%	0,435	83,3	0,177
	poz	7 (8%)	85,7%	71,4			

8. táblázat: A különböző módon végzett MRD vizsgálatok eredményeinek összefüggései a túlélési mutatókkal ALL-ben

A klasszikus morfológiai értékelés alapján történt besorolás szignifikáns prognosztikai faktornak bizonyult minden időpontban. A flow citometriával (FC) kapott értékek alapján is minden időpontban meg lehetett határozni egy jó és egy kevésbé jó prognózisú csoportot (a 15. napon <10 %, míg a másik két időpontban <0,1 %).

A PCR-MRD eredmények még csak a betegek kis részében álltak rendelkezésre, így a kapott adatokat csak korlátozottan lehet értékelni. Minden esetre megfigyelhető volt, hogy a 33.

napon PCR-ral meghatározott MRD szignifikáns faktornak bizonyult mind az OS mind az EFS vonatkozásában.

Ezt követően egy változós Cox regressziós modellel is megvizsgáltuk a túlélés prognosztikus faktoroktól való függését (9. tábl.).

Változó	OS		EFS	
	HR (95% CI)	p-érték	HR (95% CI)	p-érték
Életkor diagnóziskor (<1 vagy ≥ 6 év)	4,13 (1,49-11,47)	0,007	2,70 (1,24-5,84)	0,012
Életkor diagnóziskor (<1 vagy ≥ 10 év)	3,84 (1,56-9,48)	0,003	3,11 (1,48-6,54)	0,003
Nem	0,84 (0,32-2,20)	0,718	0,48 (0,20-1,19)	0,111
Kezdeti fvs ($20 \times 10^3/\mu\text{L}$)	0,21 (0,73-4,40)	0,206	1,76 (0,84-3,70)	0,136
Kezdeti fvs ($50 \times 10^3/\mu\text{L}$)	3,24 (1,28-8,25)	0,014	2,18 (0,96-4,95)	0,063
Citogenetika t(9;22) v. t(4;11)	4,96 (1,44-17,10)	0,011	5,30 (1,82-15,42)	0,002
Prednizolon válasz	1,53 (0,44-5,28)	0,504	1,73 (0,65-4,56)	0,271
Rizikó csoport	2,95 (1,51-5,76)	0,002	2,81 (1,63-4,84)	<0,001
Immunfenotípus	2,76 (1,27-5,96)	0,010	2,29 (1,17-4,50)	0,016
FC-MRD 15. nap	1,76 (1,08-2,88)	0,023	1,79 (1,20-2,67)	0,004
FC-MRD 33. nap	4,49 (1,63-12,39)	0,004	3,40 (1,52-7,59)	0,003
PCR-MRD 15. nap	2,93 (0,18-46,97)	0,447	6,41 (0,58-71,08)	0,130
PCR-MRD 33. nap	8,01 (2,12-30,20)	0,002	7,48 (2,67-20,95)	<0,001
BM morfológia 15. nap	2,66 (1,45-4,87)	0,002	3,00 (1,78-5,05)	<0,001
BM morfológia 33. nap	4,10 (2,01-8,03)	<0,001	4,57 (2,47-8,44)	<0,001
ALC-0*	1,01 (0,99-1,01)	0,743	1,00 (0,99-1,01)	0,956
ALC-8*	0,99 (0,94-1,04)	0,613	0,99 (0,95-1,03)	0,542
ALC-15*	1,05 (0,77-1,43)	0,783	0,95 (0,67-1,34)	0,750
ALC-33*	1,09 (0,90-1,32)	0,365	1,15 (0,99-1,33)	0,060
ALC-33 (<350 sejt/ μL)	8,77 (3,31-23,28)	<0,001	6,61 (2,79-15,63)	<0,001
ALC-33 (<500 sejt/ μL)	4,45 (1,75-11,34)	0,002	4,42 (2,04-9,61)	<0,001
ALC-33 (<1000 sejt/ μL)	2,25 (0,91-5,54)	0,078	1,76 (0,84-3,71)	0,135
ALC-33 (<1500 sejt/ μL)	1,14 (0,46-2,84)	0,777	1,31 (0,61-2,80)	0,483
ALC-8/ALC-0 (<10%)	2,69 (0,79-9,12)	0,115	1,73 (0,55-5,45)	0,346
ALC-15/ALC-0 (<10%)	1,15 (0,29-4,45)	0,838	0,71 (0,20-2,56)	0,606
ALC-33/ALC-0 (<10%)	4,25 (1,30-13,93)	0,017	3,09 (1,12-8,52)	0,030
33. napi késés ≥ 5 nap**	4,94 (1,02-23,98)	0,047	3,09 (0,68-14,05)	0,143
64. napi késés ≥ 8 nap**	5,12 (1,27-20,66)	0,022	2,28 (0,69-7,47)	0,147

9. Táblázat. Prognosztikus faktorok vizsgálata ALL-ben Cox-féle regressziós modellel

*: folyamatos változók **: csak HR betegek esetén

A rizikóbecslésben alkalmazott változók közül az életkor (főleg >10 év), az immunfenotípus és a morfológiai MRD a túlélés erős prediktorai voltak, míg a kezdeti fvs.szám és a prednisolon válasz alacsonyabb prognosztikus értékkel bírtak. Az FC MRD értékek minden időpontban az OS szignifikáns faktorai voltak, míg az EFS-sel az FC 15. ill. 33. napi értékei mutattak kapcsolatot. A PCR-rel végzett MRD vizsgálatok közül egyedül a 33. napi érték volt a túlélés szignifikáns prediktora, és erősebb faktor, mint az FC-MRD.

A következőkben egy lehetséges új prognosztikai faktor, az *abszolút limfocita szám* (ALC) túléléssel való lehetséges összefüggését vizsgáltuk. Különböző határértékeket (350, 500, 1000, 1500/μl) alapul véve vizsgáltuk a kezelés hatását és a túlélést.

Az ALC értékek a 0., 8., 15. és 33. napon a 10. tábl-ban láthatók.

G/l	átlag	medián	tartomány	IQR (25-75%)
ALC0	20,5	4,3	0-617,7	2,1-12,7
ALC8	4,7	1,24	0-122,0	0,7-1,9
ALC15	1,24	0,9	0-11,2	0,5-1,5
ALC33	2,1	1,35	0-15,3	0,7-2,5

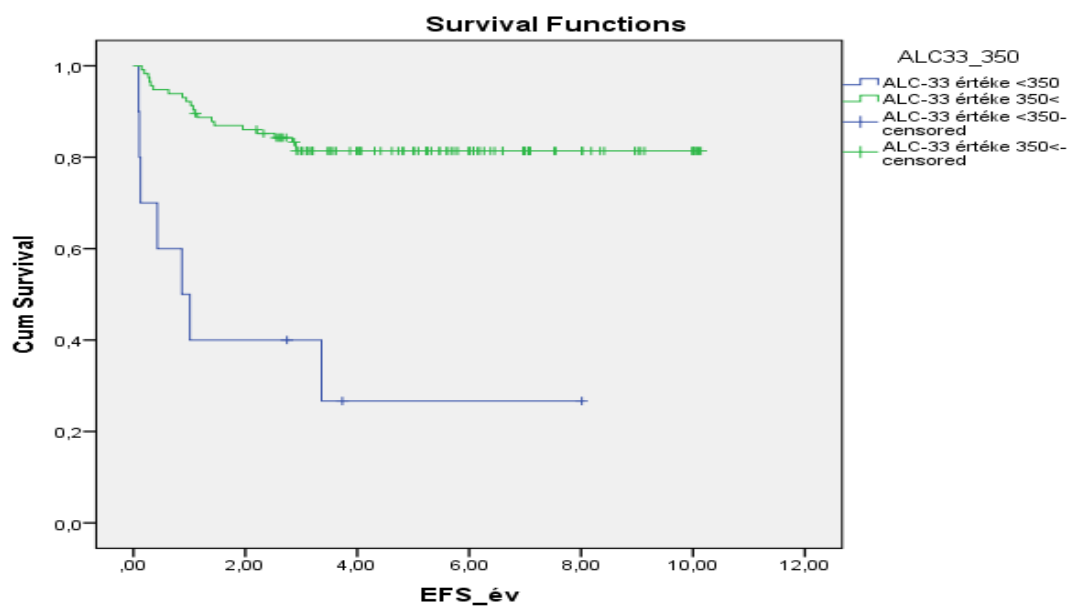
10. táblázat: Az ALC abszolút értékei (G/l) ALL betegekben a kezelés különböző szakaszaiban

A kezdeti, a 8. napi vagy a 15. napi ALC értékek és a betegek túlélése között szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni, bármelyik ALC határértéket vettük alapul (nem közölt adatok).

Ezzel szemben a 33. napon mért ALC értékek (ALC33) szignifikáns összefüggéseket mutattak a betegek túlélésével.

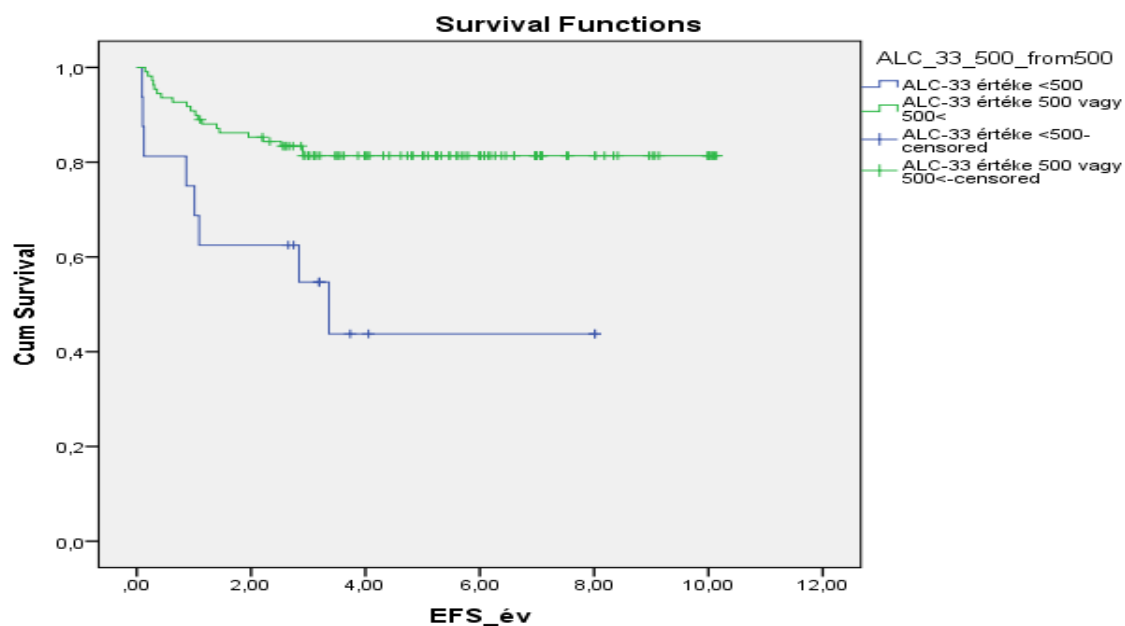
A 350 sejt/μl határértéket vizsgálva, azt találtuk, hogy 10 gyermek ALC értéke volt ennél alacsonyabb. Ezen betegek közül 7-ben történt esemény és 6-an hunytak el. Ezzel szemben a 350 sejt/μl-nél magasabb értékeket mutató gyermekek (n=114) túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult (OS 40,0 % vs 88,6 %; $p<0,001$ ill. EFS 30,0 % vs 81,6 %; $p<0,001$) (13/A. ábra). (A többi 8 gyermeknél nem lehetett egyértelműen meghatározni a 33. napi ALC-t.)

Az 500 sejt/ μ l határértékkal számolva (18 értékelhető beteg volt ezen érték alatt és 106 felette) a különbség szintén szignifikáns. Az OS 61,1 % vs 88,7 % ($p=0,001$), az ES pedig 44,4 % vs 83,0 % ($p<0,001$) a két csoportban (13/B. ábra).



A

B



13. ábra: EFS értékek a 33. napi ALC alapján

A: 350 sejt/ μ l határértéket használva

B: 500 sejt/ μ l határértéket használva

Amennyiben határértéknek az 1000 sejt/ μ l-t tekintettük, akkor már nem kaptunk szignifikáns összefüggést. Az OS 77,3 % és 88,8% ($p=0,07$) volt a két csoportban ($n=44$ és 80), míg az EFS 70,51 % vs 81,2 % ($p=0,129$). Hasonló eredményt kaptunk 1500 sejt/ μ l-t határértéket alkalmazva is (nem közölt adatok).

Multivariációs Cox analízissel is a 33. napi ALC a 350 sejt/ μ l-t határértéknek véve szignifikáns prognosztikai faktornak bizonyult ($p=0,011$) (nem közölt adatok).

Ezt követően az ALC lehetséges prognosztikai szerepét összevetettük az egyéb prognosztikai faktorokkal. Az alacsonyabb ALC értékkel bíró betegek diagnóziskori életkora szignifikánsan magasabb volt a magasabb ALC értékeket (>350 sejt/ μ l vagy >500 sejt/ μ l) mutató betegekhez képest (11,4 vs 4,6 év; $p=0,001$ ill. 10,0 vs 4,5 év; $p=0,001$). A betegek rizikócsoportjai között is szignifikáns eltérés jelentkezett, mivel az alacsonyabb ALC33 értékeket mutató gyermekek mind az MR vagy HR szerinti kezelést kaptak, míg a magasabb ALC értékek mellett a betegek 37-39 %-a SR ágon kezelődött (a kétféle határértékkel számolva, $p=0,048$ és 0,039).

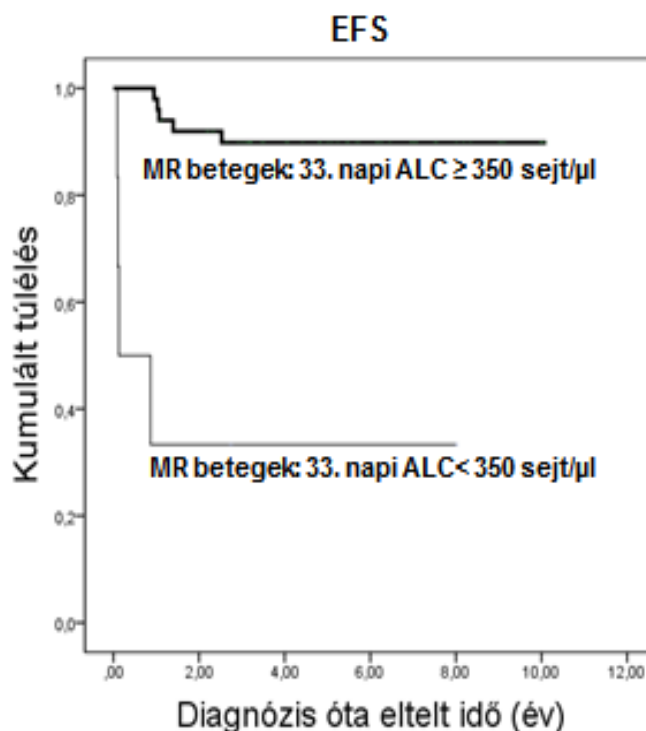
Nem volt különbség ugyanakkor az alacsonyabb és magasabb ALC33 értékkel bíró betegek között (akár 350 sejt/ μ l-t akár 500 sejt/ μ l-t vettünk alapul) csoportjaiban a nem, az immunfenotípus, a kezdeti fvs.szám vagy prednisolon válasz tekintetében (nem közölt adatok).

A 15. és 33. napi minimális reziduális betegség (MRD15 és MRD33) pozitivitás az ALL kimenetelének legerősebb prognosztikai faktorai. A 15. napi FC-MRD értékek és az ALC ill. túlélés között összefüggéseket nem találtunk (nem közölt adatok). A 33. napi FC-MRD adatok elemzve a következő eredményekre jutottunk. Általánosságban az MRD negatív betegek túlélési mutatói lényegesen jobbak voltak az MRD pozitív betegekhez képest (OS 92,9 % vs 73,3 %; $p=0,002$ ill. EFS 86,7 % vs 63,3 % $p=0,003$).

Az *MRD pozitív* betegek ($n=36$) csoportjában az ALC33 érték semmilyen határértékkel számolva sem mutatott összefüggést a túléléssel (nem közölt adatok). Ezzel szemben az *MRD negatív* betegeknél az ALC33 350 sejt/ μ l határértéke alapján a nagyobb ALC értékű betegek túlélése jobb: OS 94 % vs 66,7 %; $p=0,009$ és EFS 88,1 % vs 50 %; $p=0,005$). Más ALC határértékekkel számolva már nem találtunk szignifikáns különbségeket.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az egyes rizikócsoportokban megfigyelhető-e az ALC33 és túlélés közötti kapcsolat. A *SR csoportban* összesen 42 gyermeket kezeltünk. A csoport teljes túlélése 95,3 %, eseménymentes túlélése 88,4 % volt. Vizsgálatunk szerint az ALC33 értéke az alacsony rizikóval rendelkező betegek mindegyikében a határérték felett volt található.

A *MR csoportban* az ALC33 értéke alapján lehetséges volt egy alacsony és magas rizikójú csoportot elkülöníteni. Az 55 kiértékelhető közepes rizikójú gyermek közül 7 beteg ALC33 értéke volt 350 sejt/ μ l-nél alacsonyabb, és közülük négyen veszítették életüket, míg a többi 48 gyermek között további 5 haláleset fordult elő (OS 33,3 % vs 92 %; $p < 0,0001$ és EFS 33,3 % vs 90,0 %; $p < 0,0001$) (14. ábra).

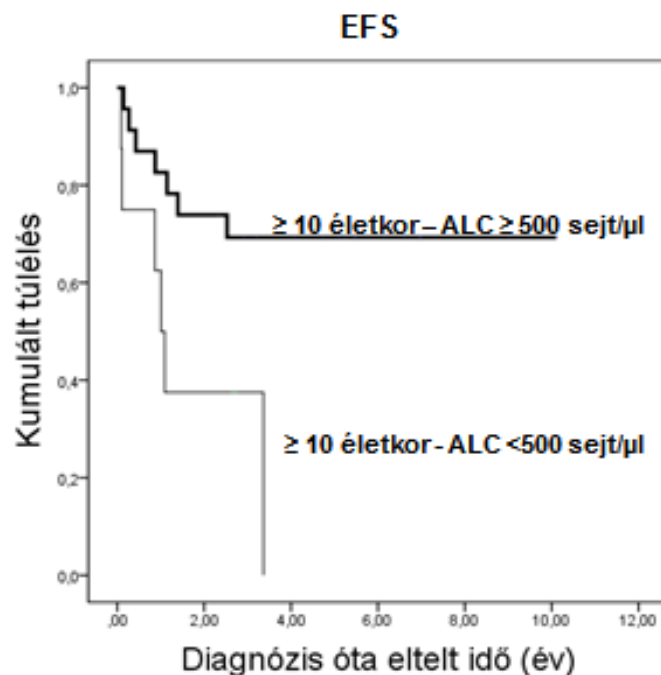


14. ábra: EFS az MR-ALL betegcsoportban az ALC függvényében

Az 500 sejt/ μ l határértéket figyelembe véve hasonló, kevésbé szignifikáns eredményeket kaptunk (nem közölt adatok).

A *HR betegek* körében ($n=26$) a különbség már nem volt szignifikáns (OS 50 % vs 68,2 %, míg EFS 25 % vs 50,0 %).

Ezt követően megnéztük, hogy az életkor függvényében az ALC értékek mutatnak-e összefüggést a túléléssel. Az életkor medián értéke 10 és 11,4 évnek adódott az alacsony ALC értékeket mutató betegcsoportokban, így a 10 éves életkort határértéknek véve is elemeztük az ALC értékek hatását a túlélésre (≥ 10 év $n=31$). A 10 éven felüli betegekben egyértelműen meg lehetett különböztetni egy viszonylag jó és egy nagyon rossz prognózisú csoportot: ALC33 350 sejt/ μ l ($n=7$) OS 79,2 % vs 28,6 %, EFS 70,8 % vs 14,3 % ($p=0,002$ és $p=0,001$) és ALC33 500 sejt/ μ l ($n=8$) OS 78,3 % vs 37,5% és EFS 69,6 % vs 25% ($p=0,017$ és $p=0,011$) (15. ábra).



15. ábra: ALL betegek EFS értékei az életkor és az ALC33 alapján

Cox regressziós modellel hasonló eredményekre jutottunk (9. tábl.). Az ALC folyamatos változóként történő vizsgálata nem volt alkalmas a kockázat becslésére. Eredményeink alapján azonban az ALC33 350 sejt/ μ l és 500 sejt/ μ l alatti értékei független összefüggést mutattak a betegek mortalitásával ALL-ben.

Végezetül az indukciós kezelés hosszának (*terápiás csúszások*) hatását vizsgáltuk meg a túléléssel. Az intenzív indukciós kezelés napjainak számát folyamatos változóként elemezve nem találtunk kapcsolatot a túléléssel. A kezelés hosszában határértékeket meghatározva, és így kategórikus változóként alkalmazva sem találtunk a teljes betegcsoportban kapcsolatot a túléléssel (nem közölt adatok). Kizárólag a HR betegekben viszont ($n=27$), akiknél ≥ 8 nap késés volt az eredeti protokollhoz képest ($n=6$), az OS szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (33% vs 80%; $p=0,011$), de az EFS tekintetében a különbség már nem volt szignifikáns (33% vs 50%, $p=0,163$).

Cox-féle modellel is a 33. napi kezelés ≥ 5 napos csúszása és az egész indukció (64 nap) ≥ 8 nap csúszása a HR betegek körében az OS-t szignifikánsan befolyásolta ($p=0,047$ és $0,022$), vagyis a kevésbé intenzív kezelést kaptak (hosszabb indukciós szakasz) túlélése rosszabb volt (9. tábl.).

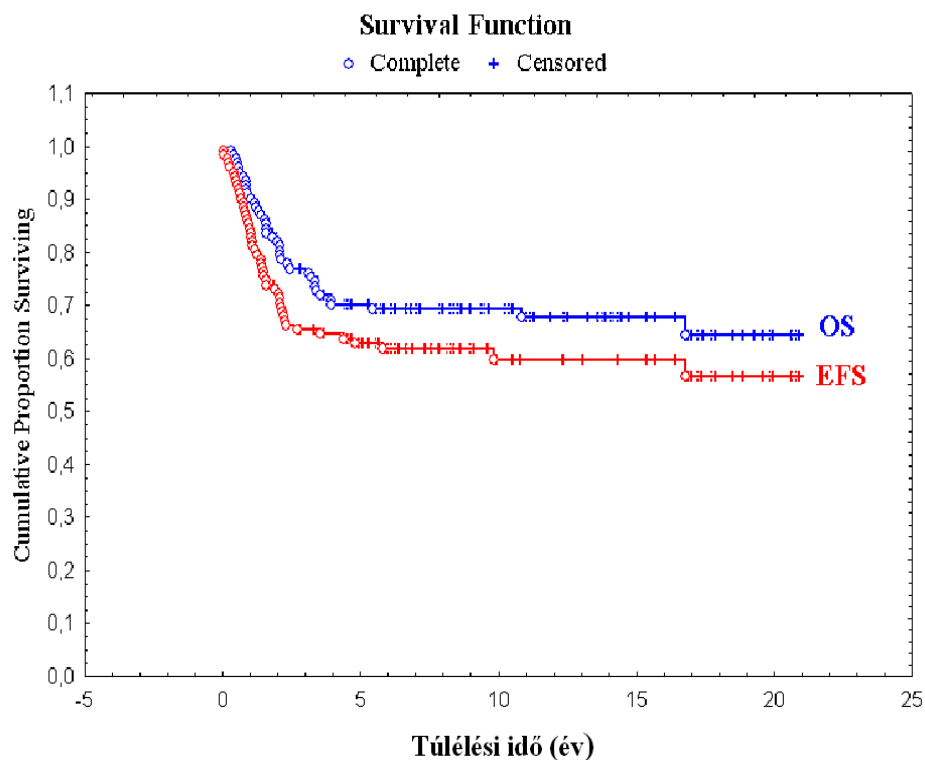
Az EFS tekintetében ill. a többi betegcsoportban nem találtunk összefüggést az intenzív kezelés hossza és a túlélés között.

V/1/2. Prognosztikai tényezők vizsgálata gyermekkori OSC-ben

A túlélési adatok elemzése során betegeinkben az 5 éves OS 68 %, míg az EFS 61,5 % volt (11. tábl., 16. ábra).

	betegek	OS (%)	p	EFS (%)	p
Túlélés	összes beteg	68,0		61,5	
Életkor a diagnóziskor	≤ 14 év	77,6	0,04383	74,1	0,0085
	>14 év	59,4		48,4	
Diagnózis dátuma	1988-1995	62,0	0,30883	56,9	0,62776
	1996-2006	73,4		64,1	
Metasztázis	Nincs áttét	79,0	0,00002	81,1	<0,00001
	Korai áttét	16,7		22,1	
	Késői áttét	41,7		13,0	
Műtét típusa	Biopszia	0	< 0,00005	0	0,00005
	Amputáció	63,3	0,3	56,7	0,3
	Végtagmegtartó	76,8		68,3	
Tumor lokalizációja	Törzs	33,3	0,01626	22,2	0,0133
	Felső végtag	68,7	0,7	56,2	0,7
	Alsó végtag	71,1		64,9	
Nem	Fiú	66,1	0,68473	56,9	0,48097
	Lány	70,2		64,9	
Szövettani altípus	Oszteoblasztos	67,7	0,96227	64,6	0,87902
	Kondroblasztos	62,5		56,2	
	Fibroblasztos	73,3		60,0	
	Egyéb	69,0		58,6	
Neoadjuváns kemoterápiára adott válasz	Rossz válasz	55,3	0,00974	50,0	0,0182
	Jó válasz	84,1		77,27	

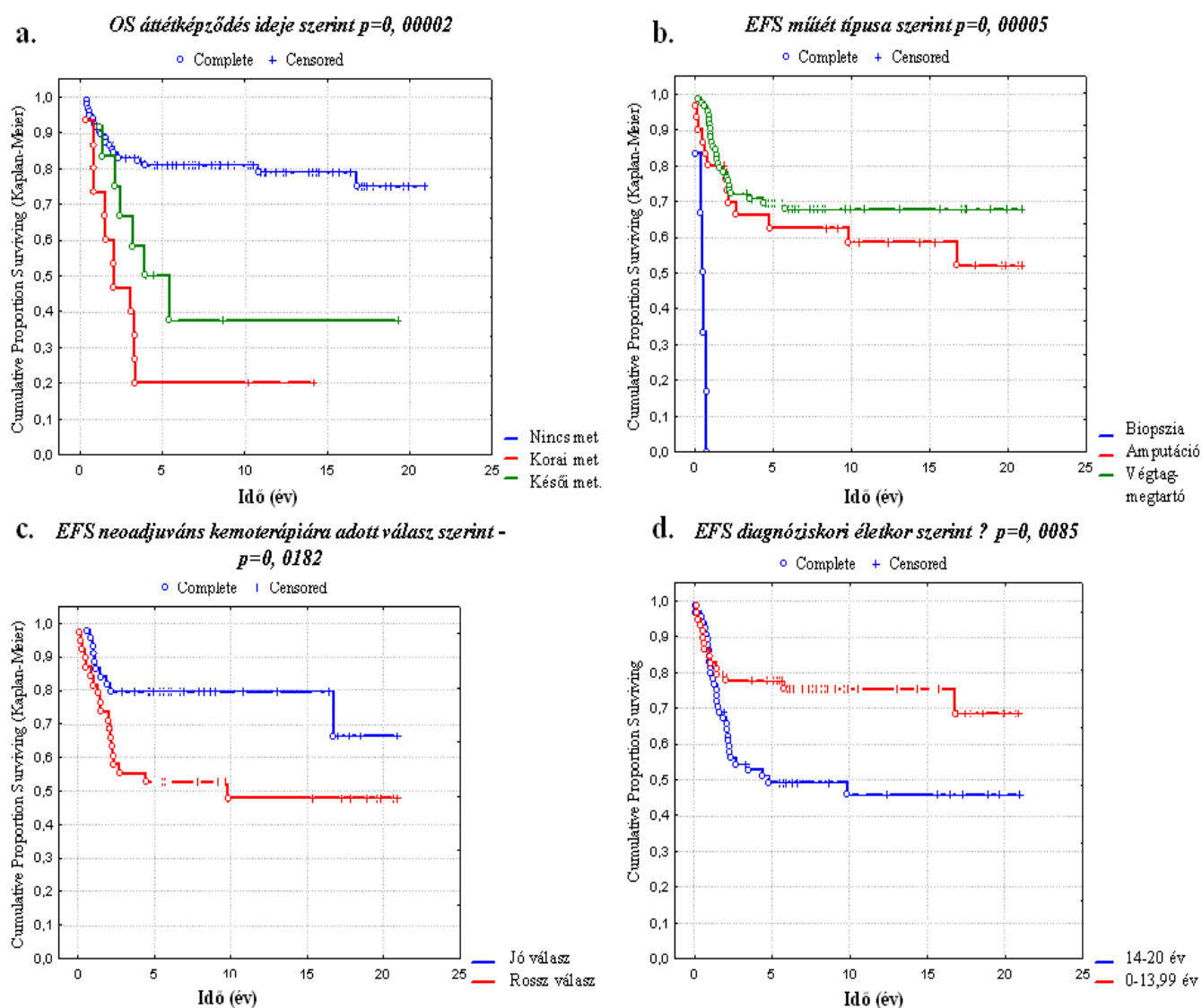
11. táblázat: Az OSC lehetséges prognosztikai tényezőinek hatása a túlélésre



16. ábra: OS és EFS OSC betegekben

A 122 beteg közül 37 esetében diagnosztizáltunk áttétet és/vagy lokális recidívát. Ezen gyermekek közül 15-ben volt már a diagnóziskor korai metasztázis, amiből 11 a tüdőre lokalizálódott, 3 esetben disszeminált csont metasztázist, egy esetben pedig vese áttétet észleltünk. Ezen korai áttétes betegek közül csak három gyermek élte túl a betegséget (OS 16,7 %). Késői metasztázis 13 gyermeknél fordult elő. A tüdőben, ezen betegekben, minden esetben találtunk áttétet, valamint 4 esetben regionális nyirokcsomó áttét, 8 esetben pedig lokális recidíva is megfigyelhető volt. A 13 tüdőáttétes beteg közül 5 élte túl a betegséget, náluk torakotómiás műtét történt (metasztázisok eltávolítása) és posztoperatív kemoterápiát is kaptak. Az áttét nélküli betegcsoportban a túlélés szignifikánsan jobb volt (OS 79 %), mint a korai vagy késői áttéteket mutató esetekben (OS 17 ill. 42 %) ($p < 0,0002$ áttét nélkül vs áttéttel) (17/A ábra).

Vizsgáltuk a túlélést a műtét típusa szerint (17/B. ábra). Azon betegek, akiknél a daganatot nem lehetett eltávolítani (vagy nem járultak hozzá a műtétnek), és max. csak biopszia történt, valamennyien meghaltak. Az eseménymentes túlélés amputáció esetében 57 %, végtagmegtartó műtét esetén 68 %, a különbség nem szignifikáns ($p = 0,3364$). Ugyanakkor meg kell említeni, hogy az elmúlt 10 évben 85% fölött volt a végtagmegtartó műtétek száma.



17. ábra: Lehetséges prognosztikai faktorok szerepe a túlélésre OSC-s betegeinkben I.

a. OS áttétképződés ideje szerint $p=0,00002$

Nincs áttét (kék) OS= 79,0 % Korai áttét (piros) OS= 16,7 % Késői áttét (zöld) OS= 41,7 %

b. EFS műtét típusa szerint $p=0,00005$

Biopszia (kék) EFS= 0,0 % Amputáció (piros) EFS= 56,7 % Végtagmegtartó műtét (zöld) EFS= 68,3 %

c. EFS neoadjuváns kemoterápiára adott válasz szerint - $p=0,0182$

Rossz válasz (piros) EFS= 50,0 %, Jó válasz (kék) EFS= 77,3 %

d. EFS diagnóziskori életkor szerint — $p=0,0085$

14 éves kor alatt (piros) EFS= 74,1 % — 14 éves kor fölött (kék) EFS= 48,4 %

Külön megnéztük, hogy a radikális műtét előtti kemoterápia, hogyan befolyásolja a prognózist. A neoadjuváns kemoterápiára jól reagáló betegcsoport esetén az EFS 77 % volt, míg a rosszul reagáló betegeké 50 % ($p=0,0182$) (17/C ábra).

A betegek életkora alapján azt lehetett megállapítani, hogy a fiatalabb gyermekek gyógyulási eredményei szignifikánsan jobbak: a 14 év alattiak EFS-e 74,1 %, ugyanakkor a 14 évesnél idősebb gyermekek esetében 48,4 % ($p=0,0085$) (17/D ábra).

Nem találtunk ugyanakkor szignifikáns különbséget az 1995 előtt (COSS-86 protokoll, 57 % EFS) és az 1995 után (COSS-96 protokoll, 64 % EFS) kezelt betegek túlélésében (18/A ábra).

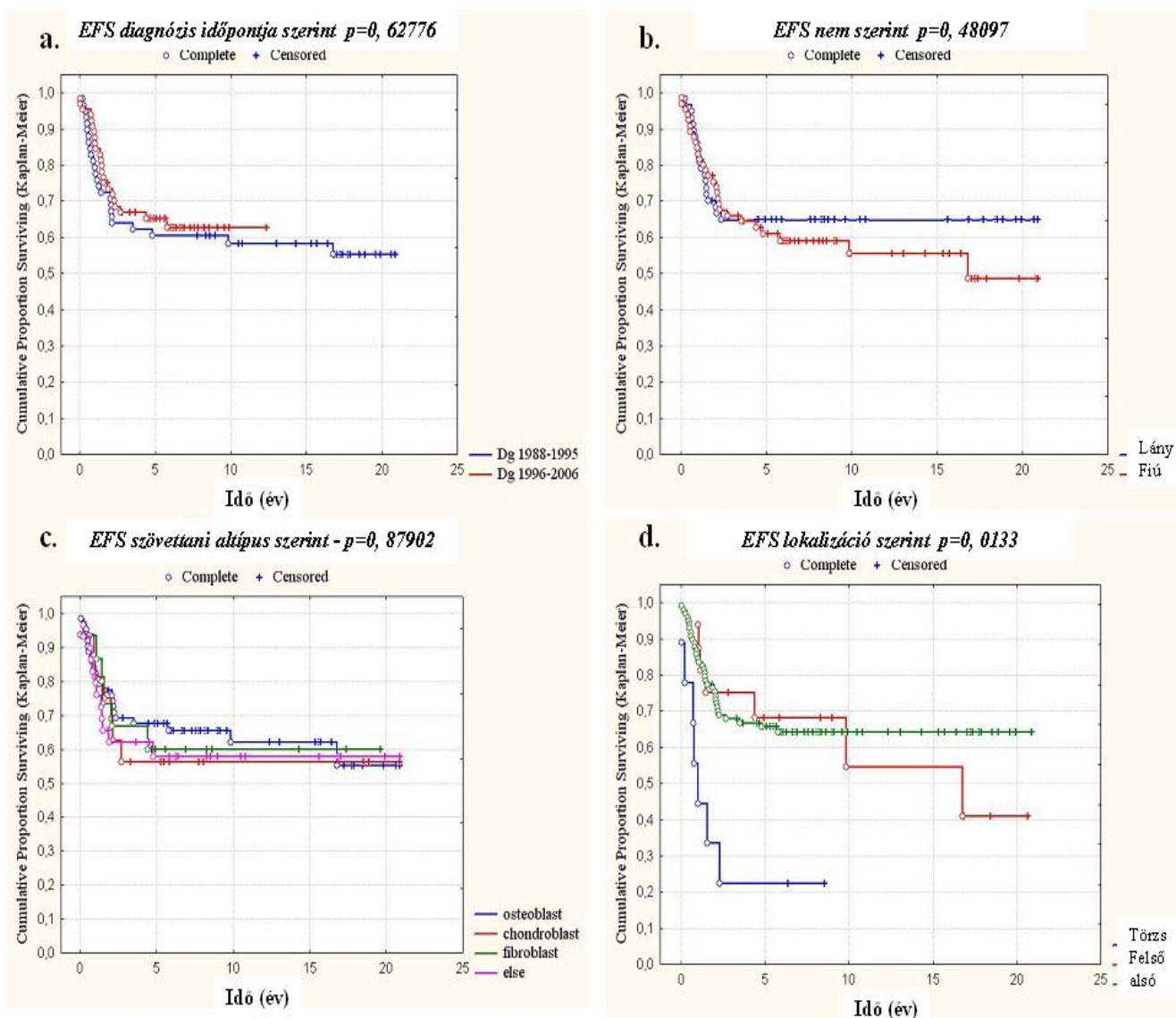
Nem mutatkozott szignifikáns különbség a fiúk és a lányok túlélésében sem. A fiúk esetében az EFS 57 %, a lányokéban pedig 65 % ($p=0,48$) (18/B ábra).

A szövettani altípusok tekintetében sem találtunk szignifikáns különbséget ($p=0,879$) (18/C ábra).

A primer daganat kiindulási helye alapján azt találtuk, hogy a törzsi lokalizációjú tumoroknak rossz a prognózisa, az EFS 22,5 % ($p=0,01$ törzs versus egyéb lokalizáció). Az alsó vagy a felső végtagon elhelyezkedő tumorok esetében viszont nincs különbség a túlélésben ($p=0,7$). Az EFS felső végtagi tumor esetén 56,3 %, alsó végtagi tumor esetén 65 % (18/D ábra).

23 betegnél újult ki lokálisan a daganat. Tizennyolcat közülük elvesztettünk. 16 gyermek esett át végtag megőrző műtéten a lokális recidíva kialakulása előtt. 6 esetben volt jelen egyszerre korai tüdőáttét és lokális recidíva, öten közülük exitáltak. Izolált lokális daganat kiújulást 9 betegben észleltünk, 2 közülük tartós túlélő. Nyolc esetben a lokálrecidíva mellett késői tüdő áttét alakult ki, ezen betegekből hatan meghaltak. A betegség kiújulása átlagosan a diagnózis után 16 (0,4-118,3) hónappal, a műtét után számítva átlagosan 11 hónappal jelent meg.

A 39 haláleset közül 6 esetben a halál oka primeren nem operálható betegség vagy a kezelés visszautasítása volt, 20 esetben metasztázis vagy disszeminált betegség, 7 esetben lokálrecidíva, 4 esetben toxicitás és 2 esetben progresszív, a terápiára nem reagáló betegség volt.



18. ábra: Lehetséges prognosztikai faktorok szerepe a túlélésre OSC-s betegeinkben II.

a. EFS diagnózis időpontja szerint $p=0,628$

Dg. 1988-1995 között (kék) EFS= 56,9 % - Dg. 1996-2006 között (piros) EFS= 64,1 %

b. EFS nem szerint $p= 0,481$

Lány (kék) EFS = 64,9 % Fiú (piros) EFS = 56,9 %

c. EFS szövettani altípus szerint - $p=0,879$

Oszteoblasztos (kék) EFS= 64,56 %, Kondroblasztos (piros) EFS= 56,25%, Fibroblasztos (zöld) EFS= 60,0 %, egyéb (lila) EFS= 58,6 %,

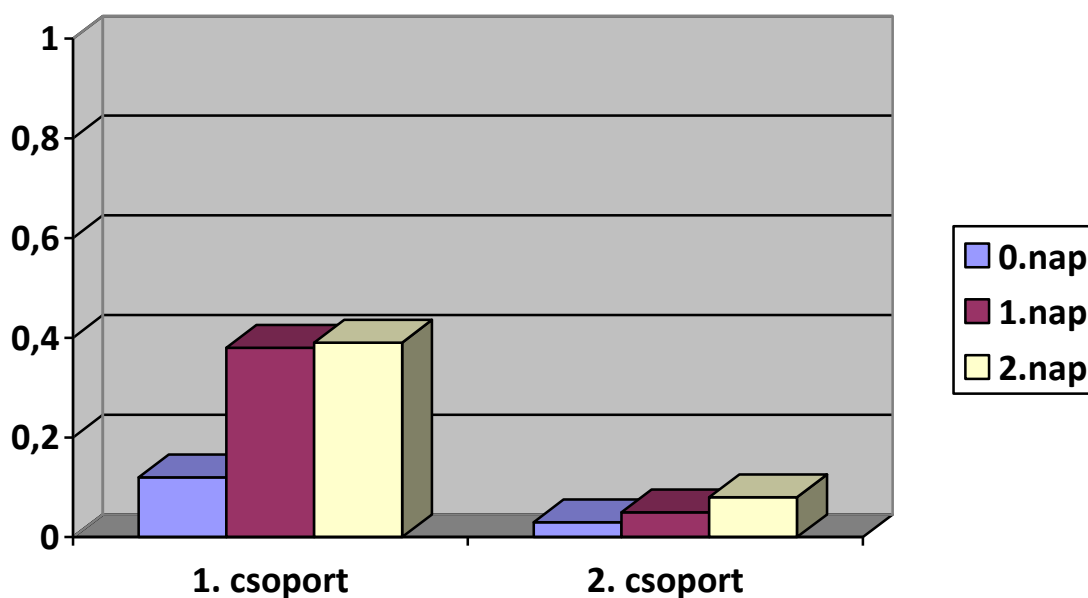
d. EFS lokalizáció szerint $p=0,0133$

Törzs (kék) EFS=22,2 % Felső végtag (piros) EFS= 56,25 % Alsó végtag (zöld) EFS=64,9 %

V/2. MTX farmakokinetikai és toxicitási vizsgálatok

V/2/1. A HD-MTX vesetoxicitása különböző hidrálási protokollok mellett

Az első, *korai* vesekárosodás vizsgálat során, HD-MTX kezelésnél a kevésbé intenzív hidrálási ajánlás mellett (1. csoport) szignifikáns proteinuriát észleltünk a kezelés utáni 1. és 2. napon (fehérjeürítés a kezelés előtt: $0,12 \pm 0,03$ g/m²/nap ill. a kezelést követő 1. és 2. napon: $0,38 \pm 0,06$ és $0,39 \pm 0,11$ g/m²/nap). Az esetek 50 %-a (26/52) és 54 %-a (28/52) a kezelés utáni 1. és 2. napon $>0,2$ g/m²/nap emelkedést mutatott a fehérjeürítésben. A glomeruláris filtrációs ráta (GRF) átlaga nem változott e kezelés hatására, de a betegek 17 %-ában (9/52) a GFR >20 ml/min/1,73 m²-es csökkenése volt megfigyelhető. A Ca-exkréció a betegek 43-48 %-ában emelkedett a MTX infúziók után. Az egyéb vizsgált tubuláris paraméterekben (FeNa, FeK, TPR) nem találtunk számottevő eltéréseket (nem közölt adatok). Az intenzív hidrálás és alkalizálás bevezetésével a MTX vesekárosító hatása jelentősen csökkent (2. csoport). A fehérjeürítés a kezelés előtt $0,03 \pm 0,02$ g/m²/nap, míg a kezelés utáni 1. és 2. napon: $0,05 \pm 0,03$ és $0,08 \pm 0,05$ g/m²/nap volt. A betegek közel egyötödében (8/45) észleltünk szignifikáns proteinuriát a MTX kezeléseket után (19. ábra). Ezen értékek szignifikánsan ($p < 0,05$) különböztek a korábbi, kevésbé intenzív hidrálás során mért adatoktól.



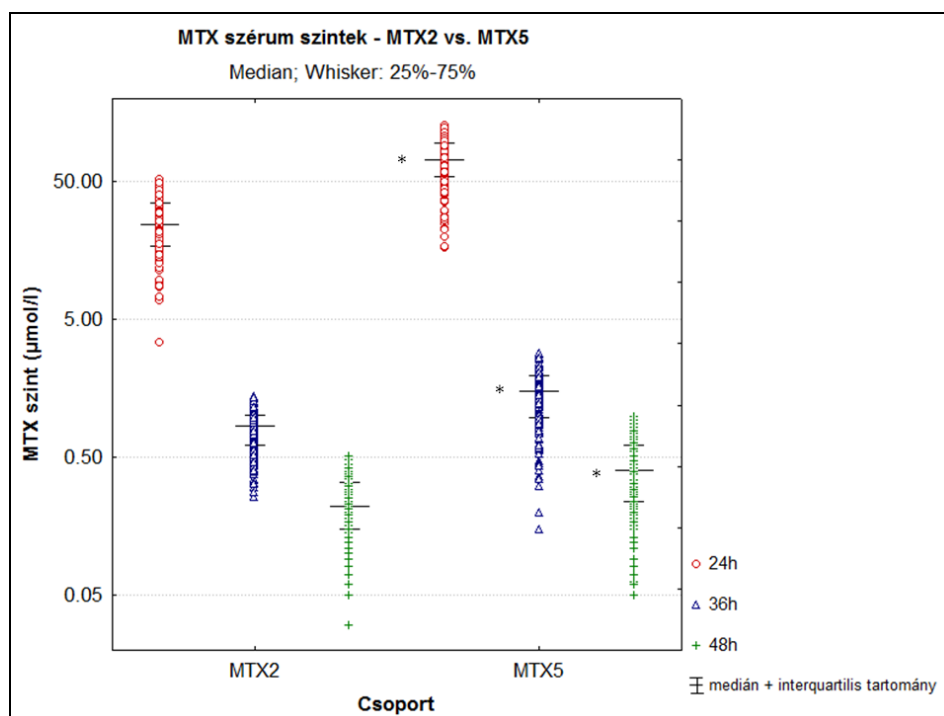
19. ábra: A fehérjeürítés változása HD-MTX kezeléseket során (g/nap)

A GFR és Ca-exkréció adatainál nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (nem közölt adatok).

V/2/2. A MTX farmakokinetikája és toxicitása gyermekkori ALL-ben.

Szérum MTX és 7-OH-MTX koncentrációk 2 g/m² és 5g/m² MTX dózisoknál

A MTX farmakokinetikai adatainak elemzésekor a gyógyszer eliminációja jelentős inter- és intraindividuális különbségeket mutatott. Ugyanakkor megállapítható volt, hogy a szérum MTX és 7-OH-MTX szintek mindegyik vizsgált időpontban (24, 36, 48. óra) szignifikánsan magasabbak voltak az 5 g/m²/24 óra dózist (MTX5) kapott gyermekek HD-MTX kezelése során mint a 2 g/m²/24 óra adagot kaptak esetén (p minden esetben <0,0001) (20. ábra, 15. táblázat).



20. ábra: MTX és 7OH-MTX szintek 2 g/m² (MTX2) és 5 g/m² (MTX5)

MTX kezeléseknél

A MTX és metabolitja kiürülését jellemző görbe alatti terület, az AUC_{MTX} és az AUC_{7-OH-MTX} értékek szintén szignifikánsan magasabbak voltak a nagyobb dózist kapott csoportban (p <0,0001) (12. tábl.).

	246 ($\mu\text{mol/l}$)	366 ($\mu\text{mol/l}$)	486 ($\mu\text{mol/l}$)	AUC	Likvor ($\mu\text{mol/l}$)
MTX (5 g/m²) *	72,26 (54,04-95,33)	1,51 (0,99-2,01)	0,40 (0,24-0,63)	1319,34 (990-1732,2)	1,70 (0,99-2,78)
MTX (2 g/m²)	24,77 (17,19-34,93)	0,84 (0,62-1,01)	0,22 (0,15-0,33)	455,85 (318,42-646,32)	0,62 (0,48-1,04)
7-OH-MTX (5 g/m²) *	21,36 (14,11-32,48)	5,47 (3,25-8,84)	2,11 (1,11-3,34)	468,99 (307,23-708,15)	-
7-OH-MTX (2 g/m²)	9,11 (7,06-12,89)	3,87 (2,66-5,11)	1,38 (1,04-1,93)	227,1 (167,76-295,02)	-

**12. táblázat: Szérum és likvor MTX és 7-OH-MTX szintek különböző dózisú MTX
kezeléseknél (*p<0,05 5 g vs 2 g) median (interkvartilis értékek)**

Az alacsonyabb dózisú (2 g/m²) kezelések esetén a MTX szérumszintek nemcsak, hogy alacsonyabbak voltak, de a 24. órában mért értékek csak az esetek 32,3 %-ában érték el az optimális terápiás szintnek tekintett 30 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációt (Borsi *et al.*, 1987) (Evans *et al.*, 1986), míg 5 g/m² esetén ez az arány 76,2 % volt (p<0,0001) (21/a ábra). A legalacsonyabb, 10 $\mu\text{mol/l}$ abszolút határt, amely még hatékonynak tekinthető a 24. órában (Lennard, 1999) (Xu *et al.*, 2007), a 2 g/m² dózisú kezeléseket követően 9,9 %-ban, míg 5 g/m² esetén csak az esetek 1,67 %-ában nem lehetett elérni (p=0,0007). Ezzel szemben azonban az 5 g/m² dózisú kezelések 17,6 %-ában a MTX a 24. órában meghaladta a toxikus 100 $\mu\text{mol/l}$ értéket, míg ez az arány a 2 g/m² adagnál csupán 1,2 % volt (p<0,0001) (21/a ábra).

Az 5 g/m² dózisú kezelések 33,2 %-ában, a 2 g/m² dózisú kezelések 12,6 %-ában elhúzódó MTX ürülést tapasztaltunk (p<0,001). Ez azt jelentette, hogy a MTX és metabolitjának szintje a 48. órában meghaladta a 0,5 $\mu\text{mol/l}$ szintet (19/a ábra). Ha a Ca-folinát rescue kötelező adásának határértéket vesszük alapul, akkor megállapítható volt, hogy a 48 órás szérum MTX koncentráció >0,25 $\mu\text{mol/l}$ volt a nagyobb dózisú MTX kezelések 72,2 %-ában, míg a 2g/m² adagok 44,4 %-ában (p<0,0001).

Likvor MTX koncentráció

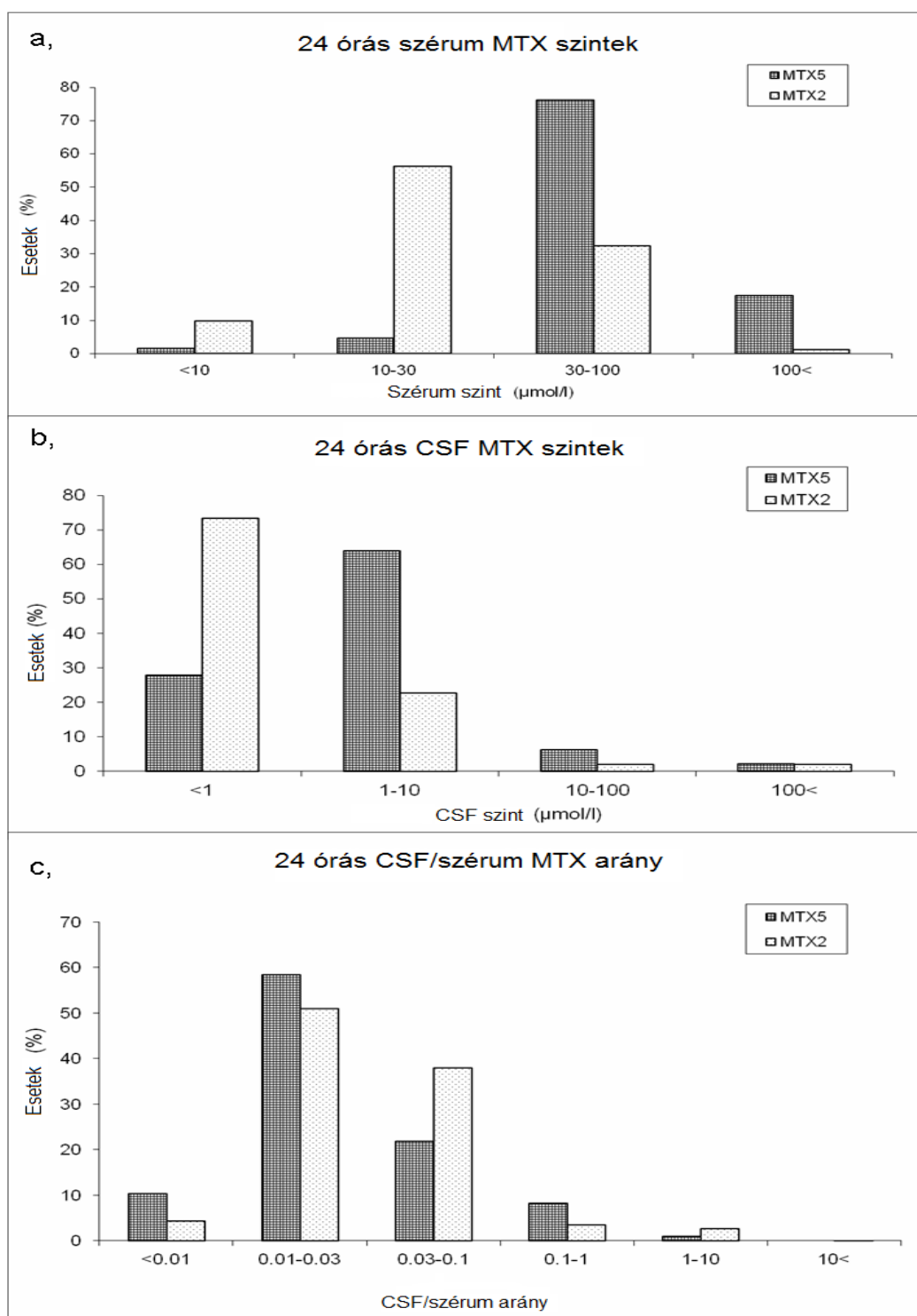
A szérumszintekben tapasztalható különbségeknek megfelelően, szignifikáns különbséget találtunk a két különböző dózis esetén a 24. órában levett likvor MTX-szintekben ($p < 0,0001$).

A likvor MTX szintek mediánja $1,7 \mu\text{mol/l}$ (95% CI: 1,41-2,09) volt az 5 g/m^2 adagnál és $0,62 \mu\text{mol/l}$ (95% CI 0,59-0,88) a 2 g/m^2 adagnál, jelentős intra- és interperszonális különbségek mellett (l. 13. tábl.). A 24 órás szérumszint és likvor MTX szintek között mindkét dózis mellett szignifikáns korreláció mutatkozott (MTX 5 g/m^2 : Spearman $r=0,36$, $p=0,0002$, míg MTX 2 g/m^2 : $r=0,38$, $p < 0,0001$).

A 2 g/m^2 -es kezeléseket követően 73,3 %-ban a még citotoxikusnak gondolt $1 \mu\text{mol/l}$ -nél alacsonyabb likvorszinteket mértünk, míg az 5 g/m^2 -es kezelések után csak 29 %-ban volt az érték $1 \mu\text{mol/l}$ alatt. A terápiás tartománynak tartott $1-10 \mu\text{mol/l}$ közé esett a nagyobb dózis 63,9 %-ban, míg a kisebb dózis csak 22,7 %-ban ($p < 0,0001$ 2g vs 5g). Másrészt, a toxikusnak gondolt $>10 \mu\text{mol/l}$ feletti értékeket a nagyobb dózissal 8,3 %-ban, míg 2 g/m^2 esetén mindössze 3,9 %-ban mértünk ($p=\text{ns}$) (21/b ábra).

Az intravénásan beadott HD-MTX központi idegrendszeri penetrációjának aránya nem különbözött a különböző MTX adagoknál. Ha a likvor MTX szinteket a szérumszintekhez hasonlítottuk (szérumszint %-ában), akkor nem találtunk szignifikáns különbséget a két dózis között. A median érték 5 g/m^2 adagnál 0,023 (95% CI: 0,017-0,025) (vagyis 2,3 %), míg 2 g/m^2 esetén 0,028 (95% CI: 0,024-0,03) (vagyis 2,8 %) volt.

Az irodalomban (Wysocki *et al.*, 1992) (Westerhout *et al.*, 2014) (Niemann *et al.*, 2010) meghatározott normál tartomány, az 1-3 % közötti likvor MTX szint (a szérumszinthez viszonyítva) az esetek 58,3 %-ában (5 g/m^2) ill. 51 %-ában (2 g/m^2) volt kimutatható a két különböző adagú MTX kezelés alatt. Egy % alatti értéket mértünk 10,4 ill. 4,4 %-ban, míg 10 % feletti értékeket a kezelések 9,4 ill. 6,7 %-ában (a különbségek nem szignifikánsak) (21/c ábra).



21. ábra: A 24. órában mért szérumszint és likvorszintek %-os megoszlása kezelések szerint (Csordás K. PhD értekezés 2014)

a, 24-órás szérumszintek

b, 24 órás liquor MTX szintek

c, 24 órás liquor MTX szintek a 24-órás szérumszintek arányában

sötétszürke: 5 g/m² (n=241 kezelés) világosszürke: 2 g/m² (n=342 kezelés)

Toxicitás

Tekintettel arra, hogy a kezeléseket követően csak viszonylag alacsony arányban észleltünk szignifikáns (GrIII/IV.) toxicitást, és így az esetek nagy részében nem találtunk összefüggéseket a toxicitási és farmakokinetikai paraméterek között, itt főleg azokat az érdekesebb eredményeket mutatjuk be, ahol statisztikailag szignifikáns összefüggéseket találtunk.

Hematológiai toxicitás is csak alacsony arányban fordult elő és nem volt különbség a két MTX dózis között (13. tábl.) a kezelések utáni első 2 napon. Ugyanakkor egy hét elteltével (kezelés 7. napja) szignifikánsan több GrIII/IV leukopénia fordult elő az 5 g/m² dózis esetén (57/155 eset 36,8 % vs 41/265 eset 15,5 %, $p < 0,0001$). A Hb érték is magasabb volt egy hét elteltével a kisebb MTX dózis mellett ($112 \pm 14,1$ vs $99,6 \pm 17,0$ p<0,05).

Az esetek kb. felében a szérum **összfehérje** értékek szignifikánsan lecsökkentek a MTX kezelést követő első vagy második napra (80/177 45,2% 5 g/m² esetén és 189/283 66,8% 2 g/m² esetén). Az átlagértékek 1 hét elteltével jórészt visszakerültek a normális tartományba, de az 5 g/m²-t kapott gyermekek esetében valamivel több esetben maradt meg a hipoproteinemia, mint a 2 g/m²-t kaptak között (14,8 vs 8,7 %) ($p = ns$).

A **hepatotoxicitást** vizsgálva a szérum GPT átlagértékei szignifikánsan megemelkedtek a kezelés utáni 2. és 7. napon mindkét csoportban (13. tábl.). A 2. napon mért GPT enzimaktivitás pl. az 5 g/m²-es kezelések esetén 36 %-kal, a 2 g/m²-es kezelések esetén pedig 40%-kal magasabb volt a kezelés előtti értékhez képest ($p < 0,05$) (22. ábra).

A hepatotoxicitást összesítve is vizsgáltuk, a kezelést követő első héten mért legmagasabb értékeket elemezve. A kezelés utáni 1-7. napon az 5 g/m² dózisú kezelések esetén magasabb arányban alakult ki valamilyen hepatotoxicitás (GPT, GGT **vagy** sebi emelkedés) (22/178 eset 12,4 % vs 15/283 eset 5,3 %) ($p = 0,006$). Az emelkedett májfunkciós érték a kezelés után 1 héttel is emelkedett volt mindkét csoportban, de itt a különbség már nem volt szignifikáns (17,6 % és 13,5 %).

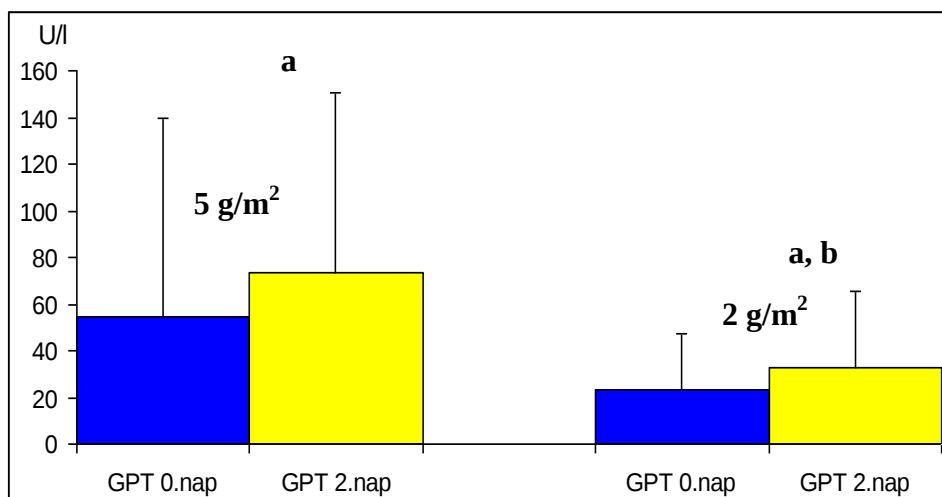
A **vesefunkciós** érték (kreatinin) csak néhány esetben volt emelkedett, és nem volt különbség a különböző MTX adagot kaptak között. A normál tartományon belül – de szignifikáns, enyhe – kreatinin érték emelkedést ($> 20 \mu\text{mol/l}$) észleltünk a kezelés után 7. napon mindkét csoportban ($p = 0,0003$ és $p = 0,005$).

		0. nap	0. nap	1. nap	1. nap	2. nap	2. nap	7. nap	7. nap
		Kóros érték (%)	Median (IQR)	Kóros érték (%)	Median (IQR)	Kóros érték (%)	Median (IQR)	Kóros érték (%)	Median (IQR)
Hgb <80 g/l	5g	8/89 (9,0)	101 (92-111)	-	-	6/77 (7,8)	98 (91-107)	13/94 (13,8)	100 (87-111)
	2g	5/283 (1,8)	110 (102-118)	-	-	5/261 (1,9)	105 (99-112)	4/240 (1,7)+	113 (103-119)+
Fvs <2,0 G/l	5g	11/89 (12,4)	3,6 (2,8-5,1)	-	-	17/77 (22,1)	3,8 (2,3-5,2)	57/155 (36,8)	2,5 (1,5-3,7)
	2g	8/283 (2,8)	4,1 (3,2-5,3)	-	-	34/261 (13,0)	3,0 (2,43,9)	41/265 (15,5)+	3,0 (2,3-4,1)
Thrc <50 G/l	5g	1/89 (1,1)	287 (198-402)	-	-	1/77 (1,3)	220 (166-318)	21/94 (22,3)	110 (57-182)
	2g	2/283 (0,7)	223 (160-296)	-	-	2/259 (0,8)	214 (163-270)	12/239 (5,0)	175 (124-240)
Seöfeh<60 g/l	5g	14/137 (10,2)	69 (65-72)	44/173 (25,4)*	63 (59-66)*	69/176 (39,2)	60 (58-63)*	22/149 (14,8)	68 (63-71)
	2g	40/151 (26,5)+	65 (59-70)	134/281 (47,7)*+	59 (56-62)*	189/283 (66,8)+	58 (55-61)*	18/206 (8,7)	69 (65-72)
GPT>200 U/l	5g	1/148 (0,7)	22 (14-36)	1/174 (0,6)	20 (13-30)	5/176 (2,8)	33 (17-62)	11/165 (6,7)	29 (15-54)
	2g	1/179 (0,6)	18 (12-34)	0/280 (0)	14 (10-22)	4/279 (1,4)	20 (12-43)	8/217 (3,7)	25 (14-55)
GGT>200 U/l	5g	0/147 (0)	15 (10-30)	-	-	2/163 (1,2)	15 (10-26)	6/160 (3,7)	16 (10-32)
	2g	0/179 (0)	13 (10-18)	-	-	0/275 (0)	11 (9-15)	0/215 (0)	13 (10-17)

Sebi>50 $\mu\text{mol/l}$	5g	-	-	7/167 (4,2)	23 (16-35)	-	-	-	-
	2g	-	-	5/278 (1,8)	18 (12-25)	-	-	-	-
Kreat>100 $\mu\text{mol/l}$	5g	3/137 (2,2)	44 (37-55)	2/171 (1,2)	42 (33-52)	2/170 (1,2)	40 (33-50)	5/155 (3,2)	45 (37-53)
	2g	0/153 (0)	36 (25-45)	1/281 (0,4)	37 (27-44)	2/277 (0,7)	36 (26-44)	4/208 (1,9)	42 (32-51)

13. tábl. Toxicitási paraméterek a HD-MTX kezelések mellett

(* $p<0,05$ kezelés után vs kezelés előtt) (+ $p<0,05$ 5 g vs 2 g)



22. ábra: Szérum GPT enzimaktivitás HD-MTX kezelés előtt és után

(a: $p<0,05$ 2. nap vs. 0.nap; b: $p<0,05$ 5 g/m^2 vs. 2 g/m^2)

Megvizsgáltuk a szérum MTX és 7-OH-MTX szintek valamint a toxicitás kialakulása közötti lineáris korrelációt. A szérum MTX koncentráció és a hematológiai paraméterek vagy szérum kreatinin, összfehérje, bilirubin, GPT szintek között szignifikáns összefüggés nem állt fenn.

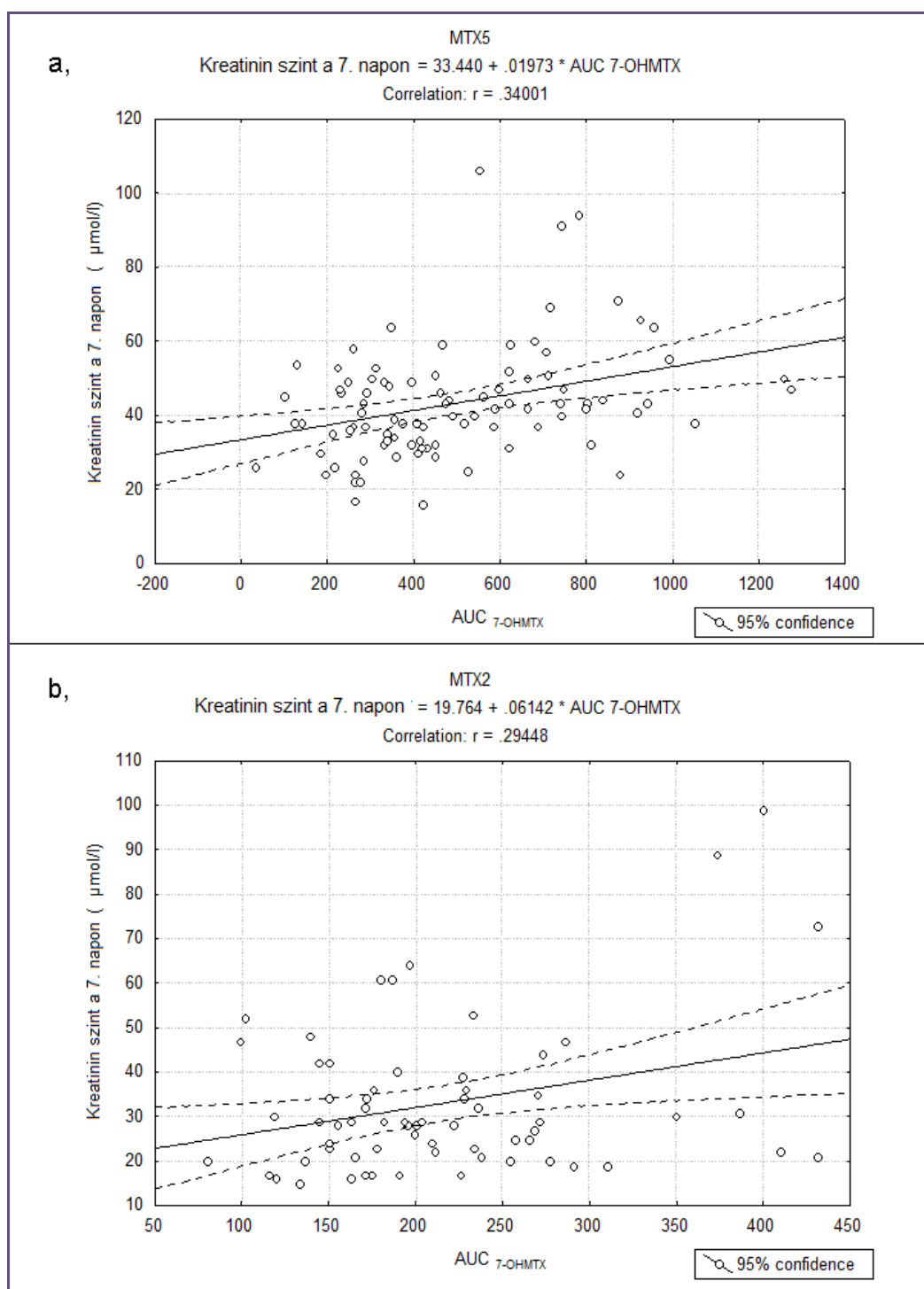
Ugyanakkor az 5 g/m^2 adag esetén a 24. órán mért 7-OH-MTX koncentráció és a szérum kreatinin szint emelkedés között szignifikáns összefüggés mutatkozott a kezelés utáni 1-2. napon is (Pearson $r=0,42$, $p<0,0001$) és a 7. napon is (Pearson $r=0,36$, $p<0,0001$). Továbbá az $\text{AUC}_{7\text{-OH-MTX}}$ értékek is korreláltak az 1-2. napon mért legmagasabb kreatinin szintekkel 5 g/m^2 adag esetén (Pearson $r=0,41$, $p<0,001$), és a 7. napi szérum kreatinin szintekkel pedig

mindkét MTX dózis esetén (MTX5: Pearson $r=0,34$, $p=0,001$; MTX2: Pearson $r=0,29$, $p=0,016$) (23. ábra). A többi paraméterrel (máj, összfehérje, hematológia) a 7-OH-MTX szint sem mutatott szignifikáns összefüggést (nem közölt adatok).

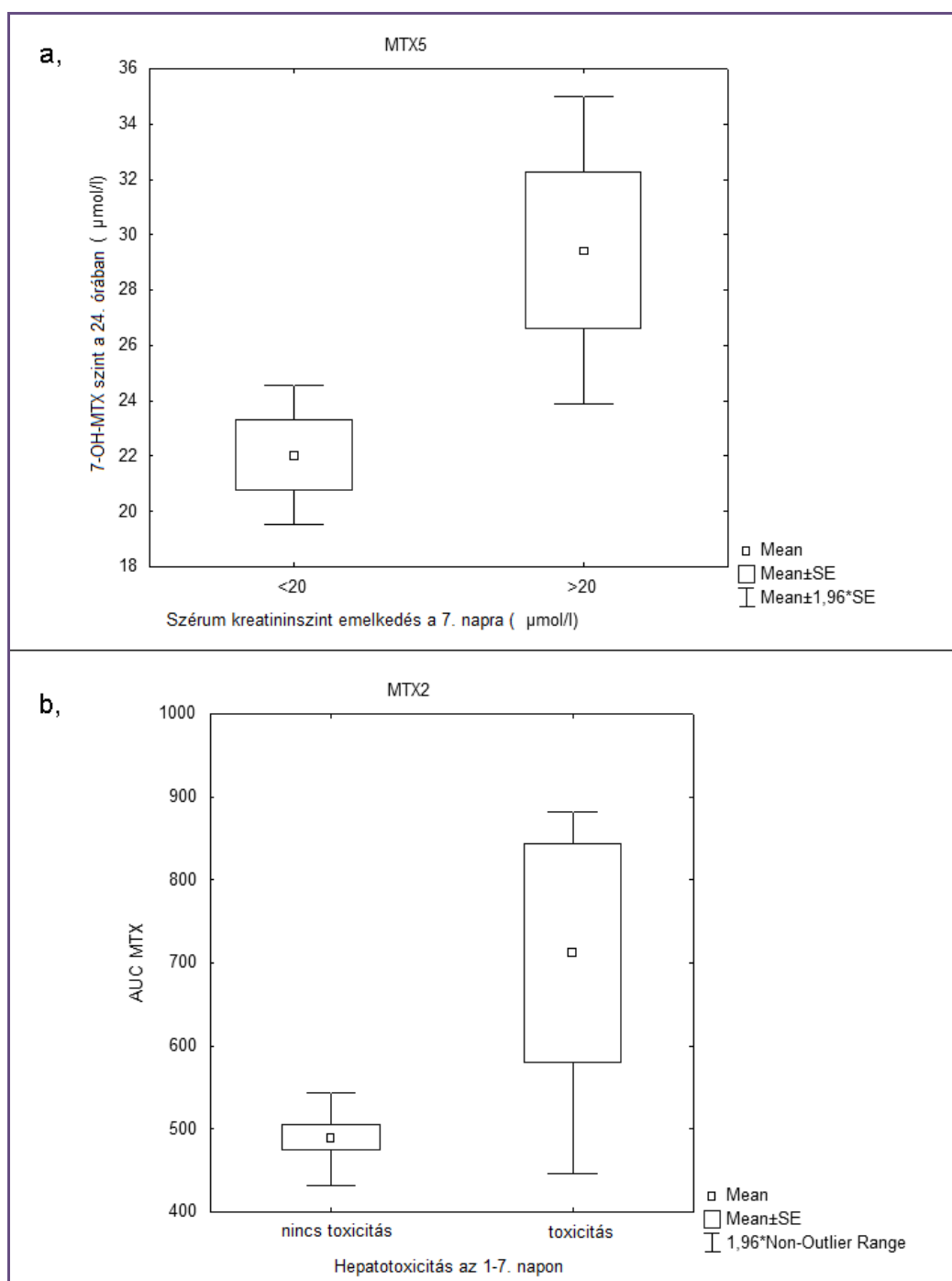
A MTX kezelés utáni 7. napon egy tendenciát lehetett megfigyelni, miszerint azon betegek esetében ahol a 7. napi szérum kreatinin érték > 20 $\mu\text{mol/l}$ -rel meghaladta a kezelés előtti kreatinin szintet, magasabb 24 órás 7-OH-MTX szinteket kaptunk, bár ez a különbség nem érte el a szignifikancia határát ($p=0,07$) (24/a ábra).

A 2 g/m^2 MTX adagnál, azon betegekben, akiknél a MTX kezelés utáni első héten (1-7. nap) valamilyen hepatotoxicitás (összesített adatok) alakult ki, az AUC_{MTX} érték szignifikánsan emelkedettebb volt ($p=0,005$) (24/b ábra).

Ezen felül Spearman korrelációval összefüggéseket találtunk még 2 g/m^2 MTX adagnál a 24 órás MTX szint és az első napi GPT között (Spearman $r=0,11$, $p=0,0439$), valamint 5 g/m^2 adagnál a 48 órás MTX szint és a 2. napi GGT érték között (Spearman $r=0,23$, $p=0,0005$).



23. ábra. Korreláció az AUC_{7-OH-MTX} és a 7. napon mért szérumban kreatinin szintek között 5 g/m² (A) és 2 g/m² (B) MTX adagok mellett.



14. ábra. Korreláció a szérum MTX/7-OH-MTX szintek és a vese- ill. májtoxicitás között.

- (a) A szérum 7-OH-MTX szintek összefüggése a kreatinin szintemelkedéssel (7. nap vs. 0. nap <20 $\mu\text{mol/l}$ vs >20 $\mu\text{mol/l}$, $p=0,07$)
- (b) Az AUC_{MTX} összefüggése a hepatotoxicitással ($p=0,005$)
- (Csordás K. PhD disszertáció 2014)

Életkorban és nemben megfigyelhető különbségek

A farmakokinetikai paraméterek életkori bontásban a 14. tábl-ban láthatók.

A 14 év feletti korosztályban (n=9 és 7 eset) magasabb volt a MTX szintje a szérumban a 24., 36., 48. órában, mint a 6 évnél fiatalabbakban (n=35 és 60 eset). A különbség a 48. órában szignifikánsnak bizonyult 5 g/m² és 2 g/m² esetén is (p=0,0013 és p=0,0021).

Elhúzódtó MTX eliminációt (48 órás MTX > 0,5 µmol/l) az idősebbek 63 % ill. 21,7 %-ában (5 g ill. 2 g), míg a 6 év alattiak 31,2 %-ában ill. 7,6 %-ában tapasztaltunk (p<0,05) (14. tábl).

	5 g/m ²		2 g/m ²	
	≤6 év	>14 év	≤6 év	>14 év
246 MTX (µmol/l)	71,44 (54,68-94,70)	79,10 (58,04-158,77)	24,80 (16,81-34,93)	22,29 (14,68-34,34)
366 MTX (µmol/l)	1,47 (0,99-1,92)	1,69 (1,2-4,32)	0,80 (0,60-0,99)	0,87 (0,52-1,51)
486 MTX (µmol/l)	0,37 (0,31-0,40)	0,54 (0,42-0,92)*	0,19 (0,18-0,20)	0,30 (0,21-0,38)*
AUC_{MTX}	1308,99 (1003,32-1732,20)	1428,76 (1061,52-2882,94)	461,10 (311,34-646,32)	428,82 (277,98-639,96)
likvor MTX (µmol/l)	1,41 (0,99-2,37)	1,47 (0,99-4,60)	0,58 (0,44-0,98)	0,90 (0,59-1,36)
246 7-OH-MTX (µmol/l)	20,99 (14,62-31,02)	16,65 (12,58-32,80)	9,66 (7,21-13,69)	7,37 (6,09-9,79)
366 7-OH-MTX (µmol/l)	5,50 (3,40-7,83)	7,86 (2,92-12,13)	3,88 (2,59-5,23)	2,66 (2,36-3,78)
486 7-OH-MTX (µmol/l)	2,13 (1,15-3,23)	3,46 (1,22-4,40)	1,37 (0,95-1,89)	1,36 (0,95-1,53)
AUC_{7-OH-MTX}	466,08 (331,32-688,08)	498,54 (273,66-919,44)	229,86 (169,74-313,50)	188,31 (144,60-227,10)
Elhúzódtó MTX ürülés	39/125 (31,2 %)	17/27 (63 %)*	17/223 (7,6 %)	5/23 (21,7 %)*

14. tábl. Farmakokinetikai paraméterek különböző életkori csoportokban (* p<0,05)

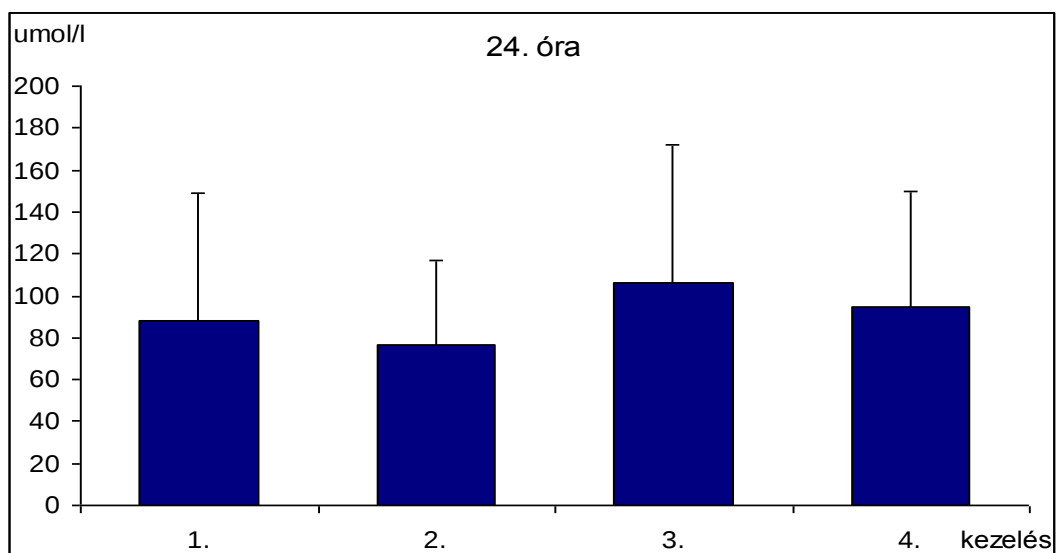
További szignifikáns eredménynek még azt találtuk, hogy a 2 g/m^2 MTX kezelést kapott gyermekeknél a fiatalabb korosztály (<6 év) esetében lényegesen kevesebb májtoxicitás fordult elő a kezelést követő 1-2. napon [>14 év: 8,7% (2/23 kezelés) vs <6 év: 0,5% (1/222 kezelés), $p=0,024$]. Egyébként más toxicitási paraméterekben nem találtunk különbséget a különböző életkori csoportokban.

Az 5 g/m^2 dózisú kezeléseket követően lányokban az egyes időpontokban (24., 36., 48., bizonyos esetekben 66. órában) mért MTX szérumszintek magasabbak voltak a fiúkban mért értékeknél. A különbség nem mutatkozott szignifikánsnak, mégis figyelemre méltó, hogy a lányok 24 órás átlagos MTX szintje meghaladta a $100 \mu\text{mol/l}$ toxikus koncentrációt (nem közölt adatok), és a MTX lassabban eliminálódott szervezetükből (elhúzódó elimináció: lányok: 57,1 %, fiúk: 37,5 %, $p=\text{ns.}$). A 2 g/m^2 MTX adagnál a 24 órás MTX szintek és az AUC_{MTX} értékek szignifikánsan magasabbak voltak a lányokban ($n=120$) (medián $27,8 \mu\text{mol/l}$, 95% CI: $25,3\text{-}30,1 \mu\text{mol/l}$) mint a fiúkban ($n=213$) ($22,6 \mu\text{mol/l}$, 95% CI: $20,8\text{-}24,8 \mu\text{mol/l}$) ($p=0,001$).

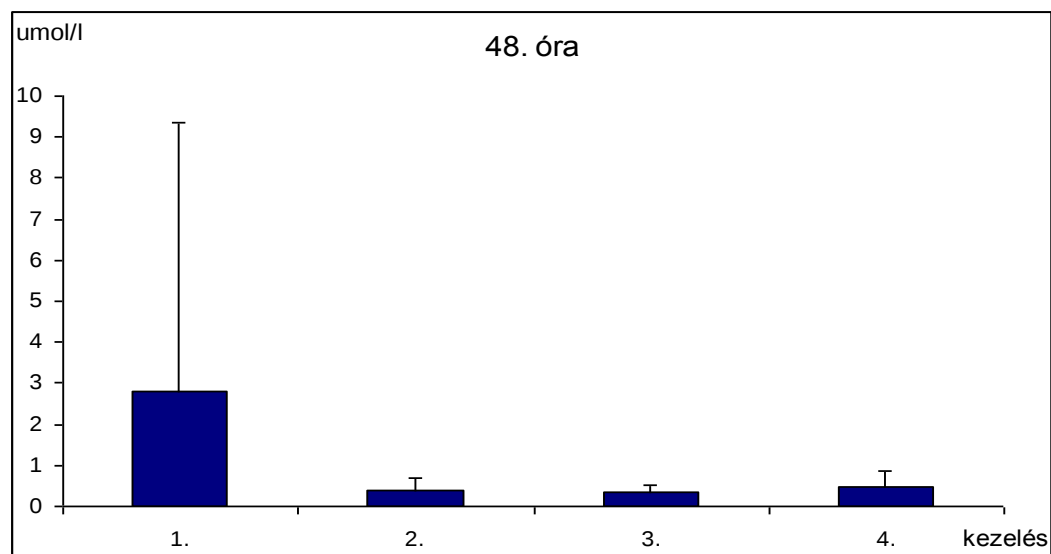
Az AUC_{MTX} értéke lányokban 510,2 (95% CI: 464,8-563,8), míg fiúkban 422,43 (388,1-449,6) volt ($p=0,002$). A 48 órás értékekben nem volt különbség a nemek között.

Ismételt kezelések

Megvizsgáltuk, hogyan változik ugyanazon gyermek MTX szérumszintje az ismételten kapott kezelések során. Az 1., 2., 3. és 4. kezelés után mért 24., 36., 48. órás MTX és 7-OH-MTX értékeket összehasonlítva azonban hasonló koncentrációkat mértünk az 5 g/m^2 -es és a 2 g/m^2 -es dózisok esetén is. Egyedül az első 5 g/m^2 -es kezelés után mértünk magasabb értékeket szérumszint MTX értékeket a 36. és 48. órában, de a nagy szórás miatt ez a különbség sem szignifikáns (csak részben bemutatott adatok) (25.-26. ábra).



25. ábra: 5 g/m^2 -es ismételt kezelések esetén mért szérumszint MTX koncentráció a 24. órában (átlag+SD)



26. ábra: 5 g/m^2 -es ismételt kezelések esetén mért szérumszint MTX koncentráció a 48. órában (átlag+SD)

Az AUC_{MTX} , az $\text{AUC}_{7\text{-OH-MTX}}$ értékekben és a likvor MTX koncentrációban sem voltak szignifikáns változások a kezelések után.

V/2/3. MTX farmakokinetikai vizsgálatok gyermekkori OSC-ban

Farmakokinetikai paraméterek

A 15. táblázatban láthatók a főbb farmakokinetikai paraméterek az OSC-s gyermekek 12 g/m² adagú MTX kezelése kapcsán. Technikai okok miatt a 7-OH-MTX szinteket csak a betegek egy részében sikerült meghatározni, így ezen adatokat nem tüntettük fel.

MTX 6 órás szint (csúcskoncentráció)($\mu\text{mol/l}$)	1134,81 (106,3-2750)
MTX 24 órás szint ($\mu\text{mol/l}$)	11,9 (0,51-198,5)
24h % (24 óra/6 óra)	1,3 (0,11-6,34)
MTX 36 órás szint ($\mu\text{mol/l}$)	1,68 (0,06-68,8)
MTX 48 órás szint ($\mu\text{mol/l}$)	0,64 (0,01-32,5)
48h % (48 óra/6 óra)	0,075 (0,009-0,64)
AUC 0-48 ($\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$)	13997,96 (7998,75-33708,6)
MTX felezési idő (óra)	15,11 (14,66-15,67)
MTX clearance ($\text{g}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}\cdot\text{h}$)	1,37 (0,41-2,91)
Dózisintenzitás (csak ≥ 8 blokkra)($\text{g}/\text{m}^2/\text{hét}$)	2,81 (0,56-4,57)

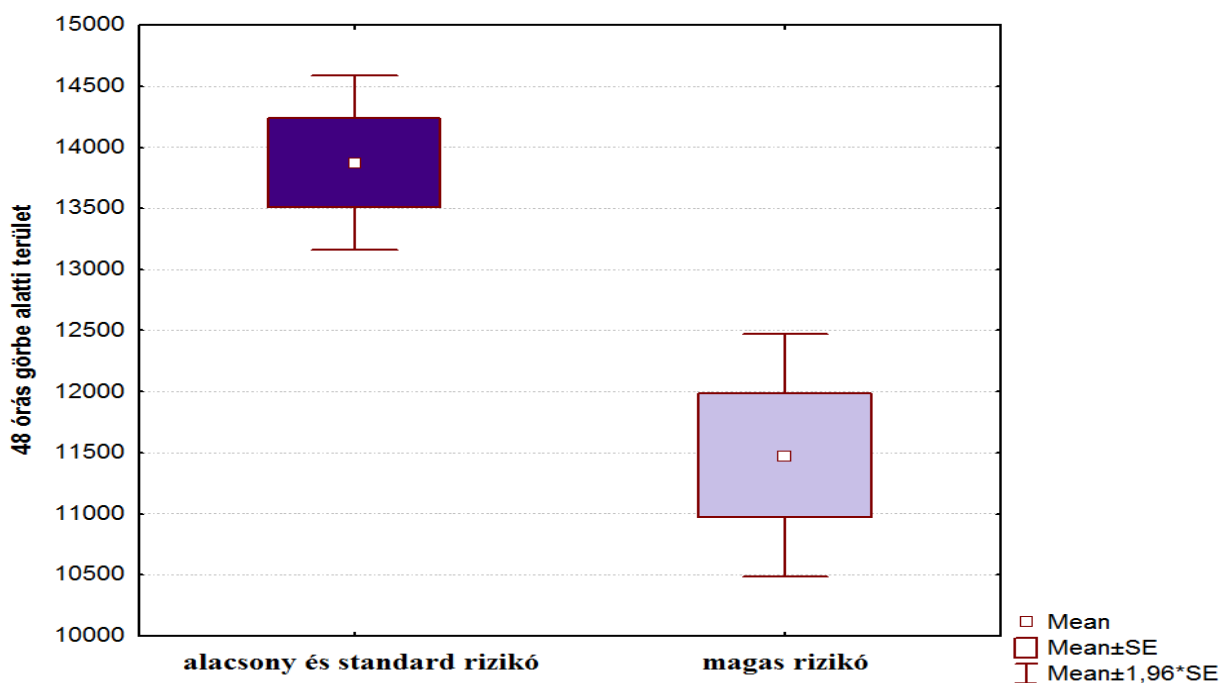
15. tábl: Farmakokinetikai paraméterek OSC betegekben (átlag + intervallum)

A farmakokinetikai paraméterekben nem volt különbség a nemek, az életkor, a szövettani válasz és a metasztázis megléte szempontjából. Az összefüggések p-értékeit a 16. táblázatban foglaltuk össze.

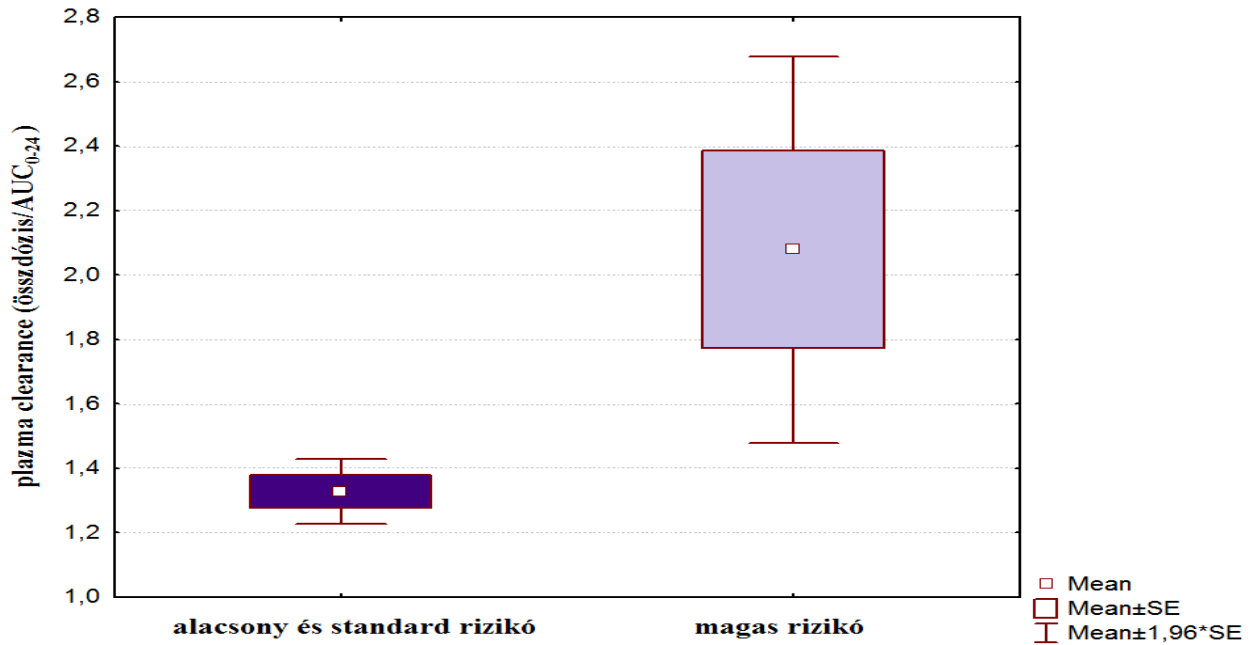
	AUC 0-48	clearance	48h%	24h%	felezési idő
nem (fiú/lány)	0,4261	0,3514	0,0869	0,3329	0,3038
életkor (14 év alatt/ felett)	0,1918	0,0632	0,6862	0,0244	0,0330
szövettani válasz (jó/rossz)	0,2551	0,2435	0,6012	0,2170	0,2769
metasztázis (igen/nem)	0,9687	0,5522	0,7532	0,2174	0,3088

16. táblázat: A MTX farmakokinetikai paramétereinek statisztikai összefüggései OSC-ban (p értékek)

A magas rizikójú csoportban (HR) alacsonyabb volt a 48 órás görbe alatti terület ($p=0,0018$) (27. ábra), és nagyobb volt a MTX clearance ($p=0,0001$) (28. ábra), a másik két rizikócsoporthoz képest.

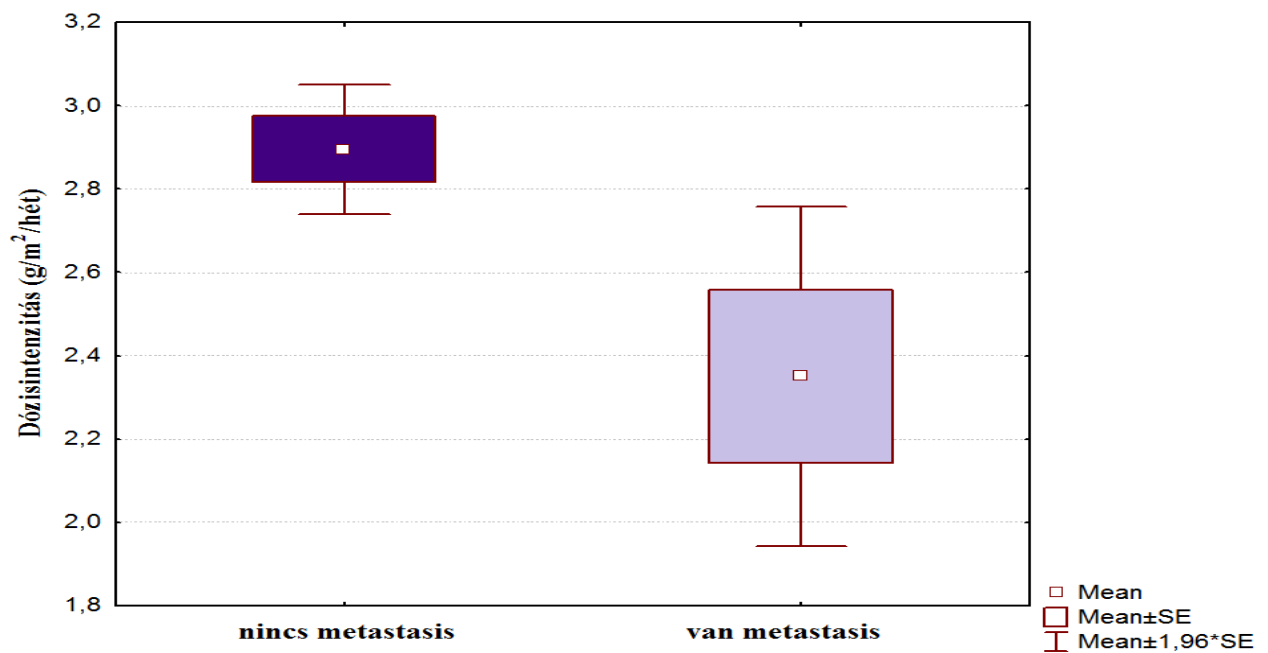


27. ábra. A MTX AUC nagysága a különböző rizikócsoportokban, OSC-ban



28. ábra. MTX clearance a különböző rizikócsoportokban, OSC-ban

Metasztázis jelenléte esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a dózisintenzitás, mint a metastázis nélküli esetekben ($p=0,009$) (29. ábra). Ugyanakkor a görbe alatti terület ($p=0,97$), a MTX clearance ($p=0,55$), a felezési idő ($p=0,31$), a 24 órás ($p=0,22$) és a 48 órás szérumszint ($p=0,75$) tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között.



29. ábra. MTX dózisintenzitás a metastasis jelenlétének függvényében

Toxicitás

A MTX kezelések előtti és utáni főbb laboratóriumi paraméterek a 17. tábl-ban láthatók.

A kezelést követően a májfunkciós értékek szignifikánsan emelkedtek, a Seöfeh jelentősen csökkent a kezelés hatására. A vesefunkciós értékek átlagában nem következett be szignifikáns eltérés.

	GPT (U/l)	GGT (U/l)	sebi ($\mu\text{mol/l}$)	öfeh (g/l)	kreat ($\mu\text{mol/l}$)	fvs (G/l)
kezelés előtt	40,5 $\pm$ 35,3	46,4 $\pm$ 24,8	8,7 $\pm$ 3,5	72,7 $\pm$ 6,2	59,8 $\pm$ 13,5	4,62 $\pm$ 1,43
kezelés után	398,0 $\pm$ 312,4*	83,8 $\pm$ 32,9*	20,1 $\pm$ 6,9*	62,7 $\pm$ 5,2*	63,9 $\pm$ 13,5	3,24 $\pm$ 0,83

* $p < 0,05$

átlag $\pm$ SD

17. tábl. Toxicitási paraméterek HD-MTX kezelések előtt és után (első egy hét legmagasabb értékei) OSC-ban

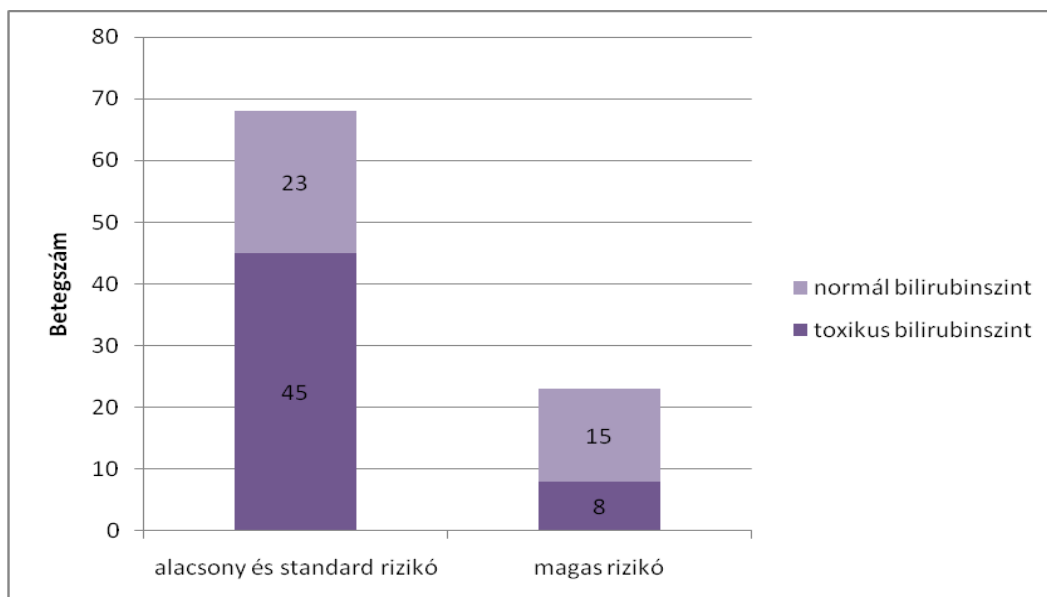
A toxicitás előfordulásában nem volt szignifikáns különbség a nemek, az életkor, metastasis jelenléte vagy a szövettani válasz szempontjából (nem közölt adatok). Jelentős különbséget találtunk azonban rizikócsoporthoz szerint. Az alacsonyabb rizikócsoporthoz tartozók között gyakoribb volt a toxikus bilirubin-szint, mint a magas rizikójú csoportban ($p=0,0083$) (30. ábra).

Ugyanakkor nem találtunk összefüggést az egyéb májfunkciós értékek (GPT, γ GT) és a rizikó besorolás szerint (nem közölt adatok).

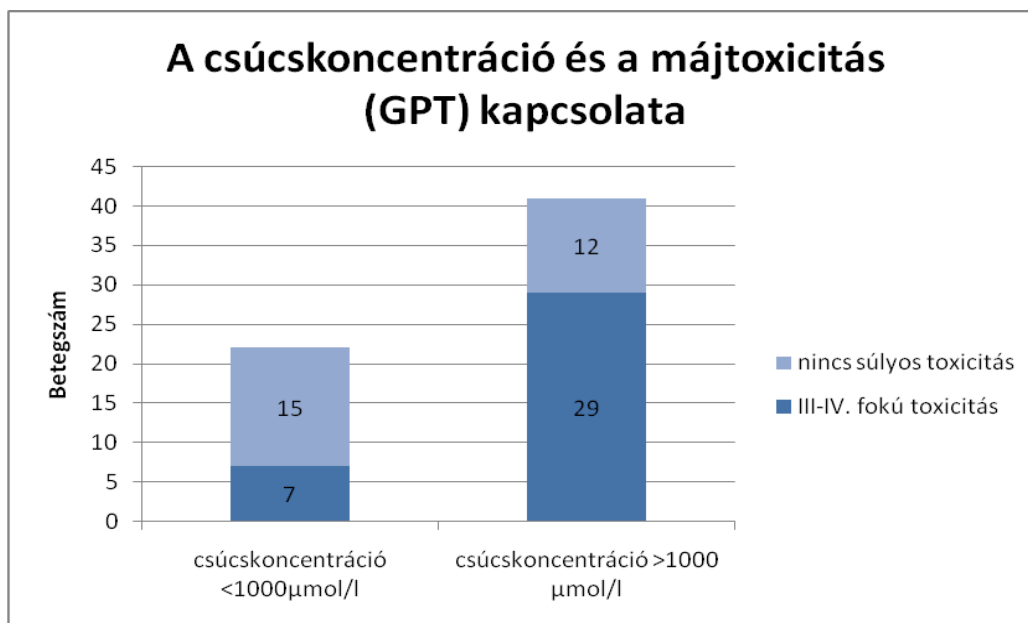
Szignifikáns összefüggéseket találtunk a farmakokinetikai paraméterek és a májtoxicitás fellépése között. Azokban a betegekben, akikben az átlagos MTX csúcskoncentráció 1000 $\mu\text{mol/l}$ felett volt, gyakoribb volt a III-IV fokú májtoxicitás (GPT), mint azokban a betegekben, akikben a csúcskoncentrációk átlaga nem érte el ezt az értéket ($p=0,002$) (31. ábra).

Azokban a betegekben, akikben a GPT szintek átlaga a III. vagy IV. fokú toxicitási kategóriába esett, magasabb volt a MTX csúcskoncentráció (1183,8 $\mu\text{mol/l}$ vs 999,1 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,0000001$), és a csúcskoncentráció %-ában megadott 24 órás MTX-szintek (24h%) ($p=0,0031$) és 48 órás MTX-szintek átlaga (48h%) is ($p=0,0001$) emelkedett volt a többiekhez képest. Továbbá ezekben az esetekben jelentősen nagyobb volt a 48 órás koncentráció-idő görbe alatti terület (14425,2 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$ vs 12259,2 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$, $p < 0,0000001$) (32. ábra), és

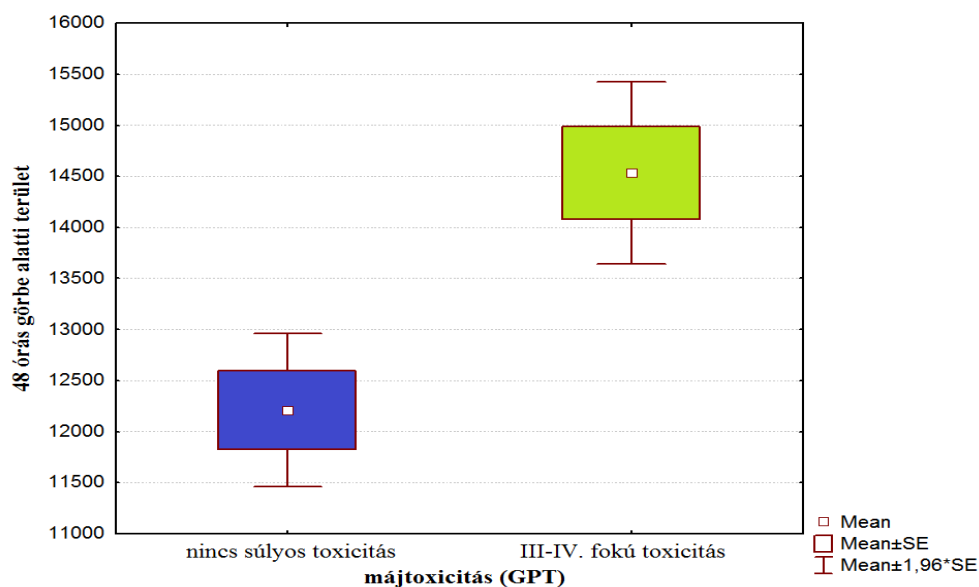
kisebbség a MTX clearance (medián 1,29 kg*1*h/ μ mol vs 1,47 kg*1*h/ μ mol, $p < 0,00005$), mint az enyhén toxikus vagy normál májfunkciós értékek esetén.



30. ábra: Emelkedett szérumbilirubin szintek OSC betegek különböző rizikócsoportjaiban



21. ábra: Májtoxicitás (GPT) előfordulása különböző MTX csúcskoncentrációk esetén

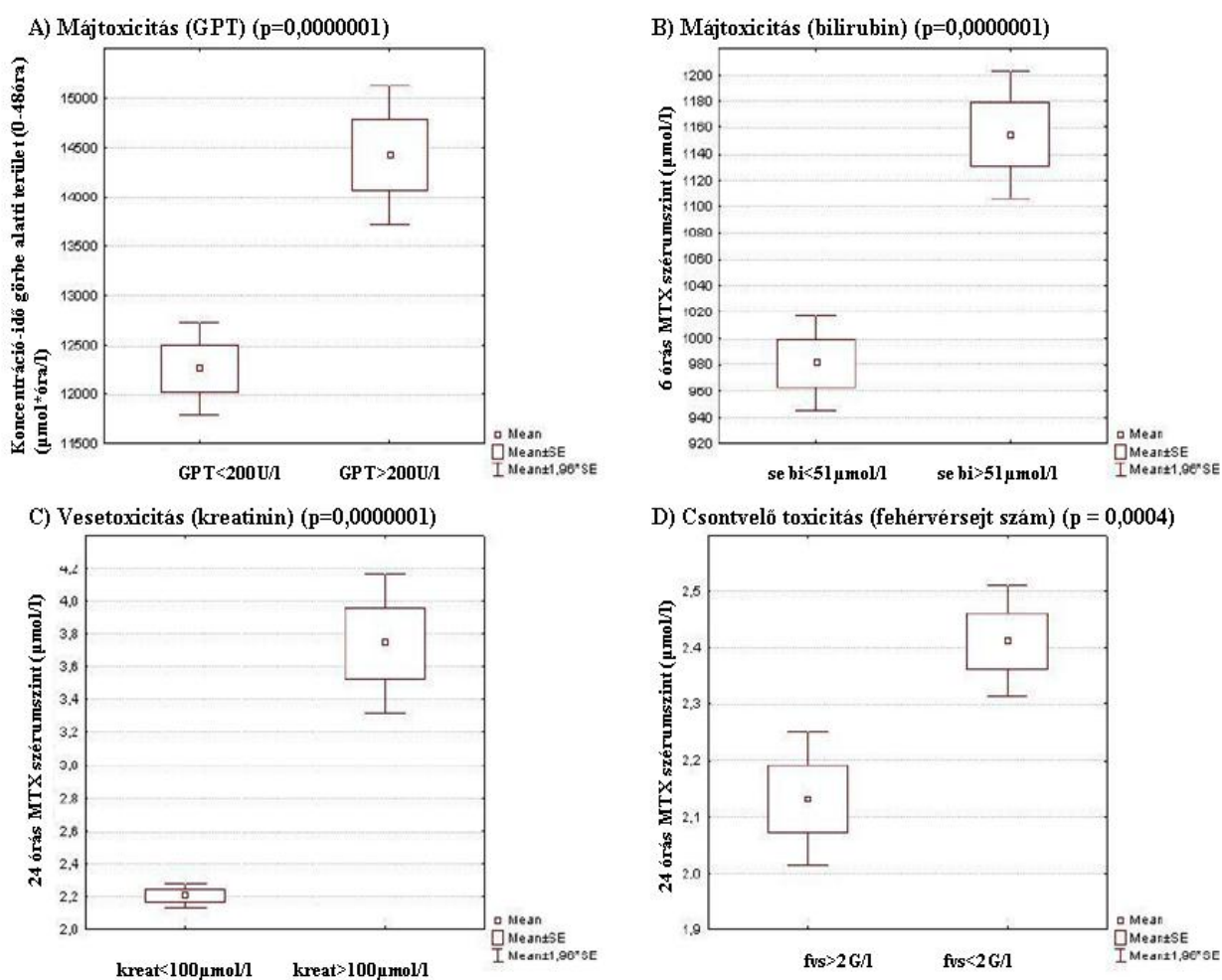


32. ábra. A MTX AUC és a májtoxicitás (GPT) kapcsolata OSC-ban

A bilirubin-szintek esetében hasonló eredményeket kaptunk: a toxikus esetekben (grade I-IV.) szignifikánsan magasabb volt a csúcskoncentráció %-ában megadott 24 órás ($p=0,026$), a 48 órás MTX-szint ($p=0,0007$), a görbe alatti terület ($p<0,00001$), és a felezési idő ($p=0,022$), valamint alacsonyabb volt a MTX clearance, mint a nem toxikus esetekben ($p=0,0001$) (33/B ábra).

A **vesetoxicitást** vizsgálva az emelkedett Sekreat ($>100 \mu\text{mol/l}$) értékeket mutató betegekben magasabb 24 órás MTX szinteket mértünk ($3,74 \mu\text{mol/l}$ vs $2,2 \mu\text{mol/l}$, $p<0,0000001$) (33/C ábra).

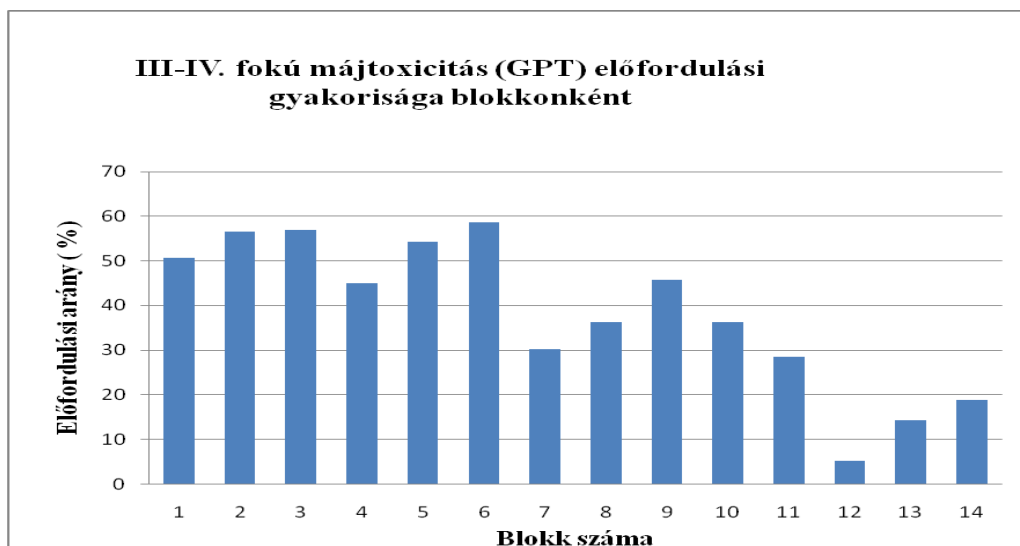
A **csontvelő toxicitás** előfordulása összefüggést mutatott a magasabb 24 órás MTX szintekkel (mielotoxikus betegcsoport átlaga: $2,4 \mu\text{mol/l}$ vs nem mielotoxikus betegcsoport átlaga: $2,1 \mu\text{mol/l}$, $p=0,0004$) (33/D. ábra) és a magasabb 48 órás MTX szérumszintekkel (mielotoxikus betegcsoport átlaga: $0,44 \mu\text{mol/l}$ vs nem mielotoxikus betegcsoport átlaga: $0,38 \mu\text{mol/l}$, $p=0,001$)



33. ábra A toxicitási és MTX farmakokinetikai paraméterek összefüggései OSC-ban

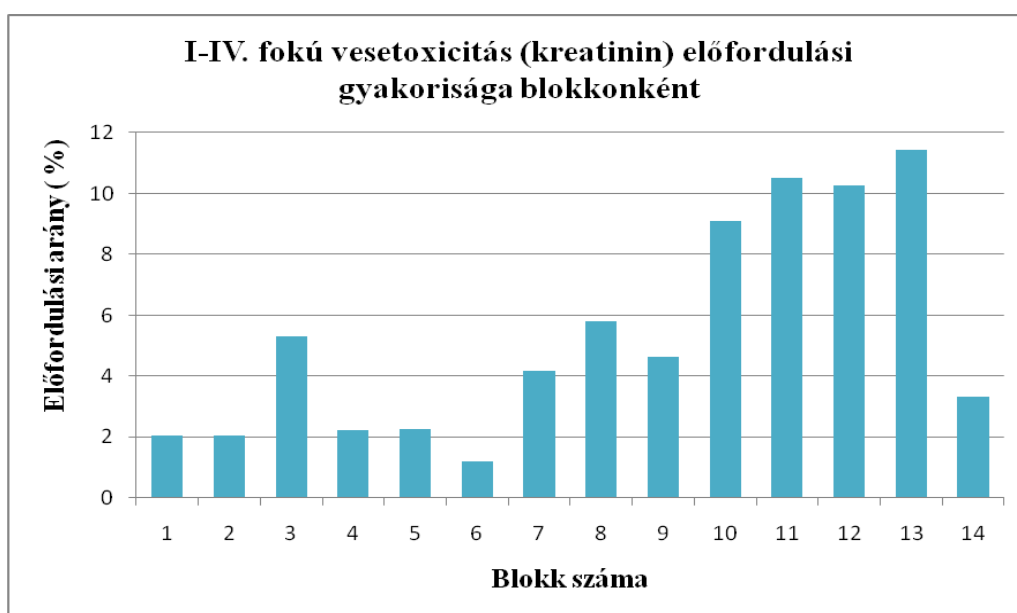
- A:** Koncentráció-idő görbe alatti terület (0-48óra) és a májtoxicitás (GPT) kapcsolata
- B:** MTX csúskoncentráció és a szérum bilirubin kapcsolata ($p=0,0000001$).
- C:** 24 órás MTX szérumszintek és a vesetoxicitás (Sekreat) kapcsolata ($p=0,0000001$).
- D:** 24 órás MTX szérumszintek és a csontvelő toxicitás (fvs) kapcsolata ($p = 0,0004$)

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a terápia folyamán változott-e a különböző toxicitások előfordulásának gyakorisága. Az a tendencia volt megfigyelhető, hogy a kezelés előrealadtával a májtoxicitás inkább csökkent, a III-IV.fokú toxikus esetek százalékos aránya csökkenő (de nem szignifikáns) tendenciát mutatott a blokkok előre haladtával (34. ábra).



34. ábra: Májtoxicitás (Grade III-IV. GPT) előfordulása ismételt kezelések során

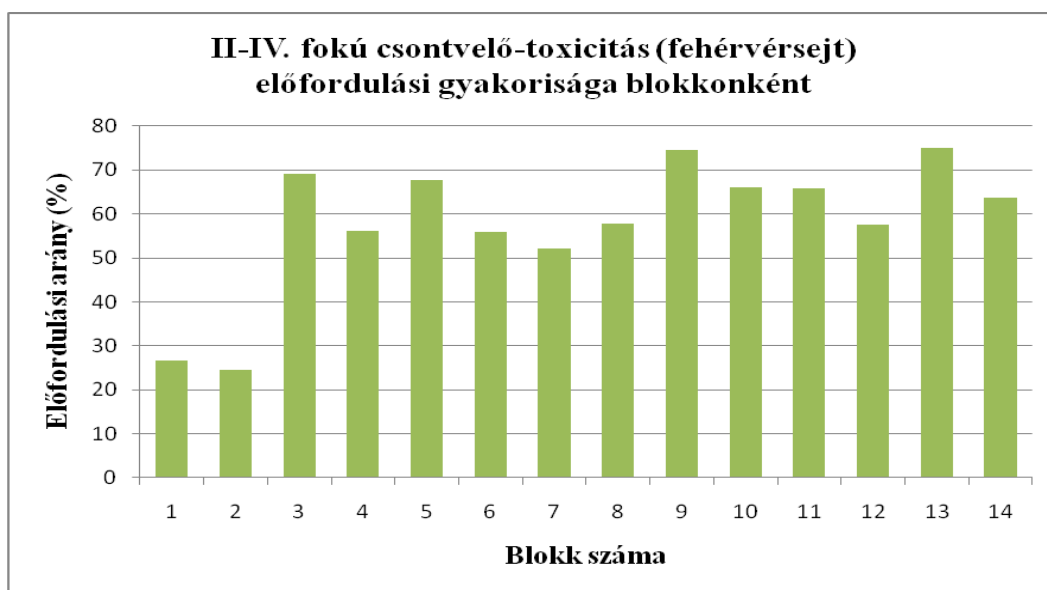
Ismétlődő kezeléseknél a vesetoxicitás a kezelés előre haladtával gyakoribb lett, azonban így is szinte minden blokkban 10% alatt maradt (35. ábra). Az alacsony esetszámok miatt a változás itt sem szignifikáns.



35. ábra: Vesetoxicitás (Szkreat) előfordulása ismételt kezelések során

A csontvelő toxicitás előfordulása a 3., 5., 9., 13. blokkokban mutatott kiugrást. Ezt a MTX kezelést megelőző ciszplatin-ifoszamid blokk okozhatta (36. ábra).

Egyébként nem figyeltünk meg tendenciát a kezelés előre haladtával a csontvelői toxicitás esetén. Az első két blokk esetén észleltünk viszonylag alacsony toxicitást, a későbbiekben nem volt jelentős különbség a blokkok között.



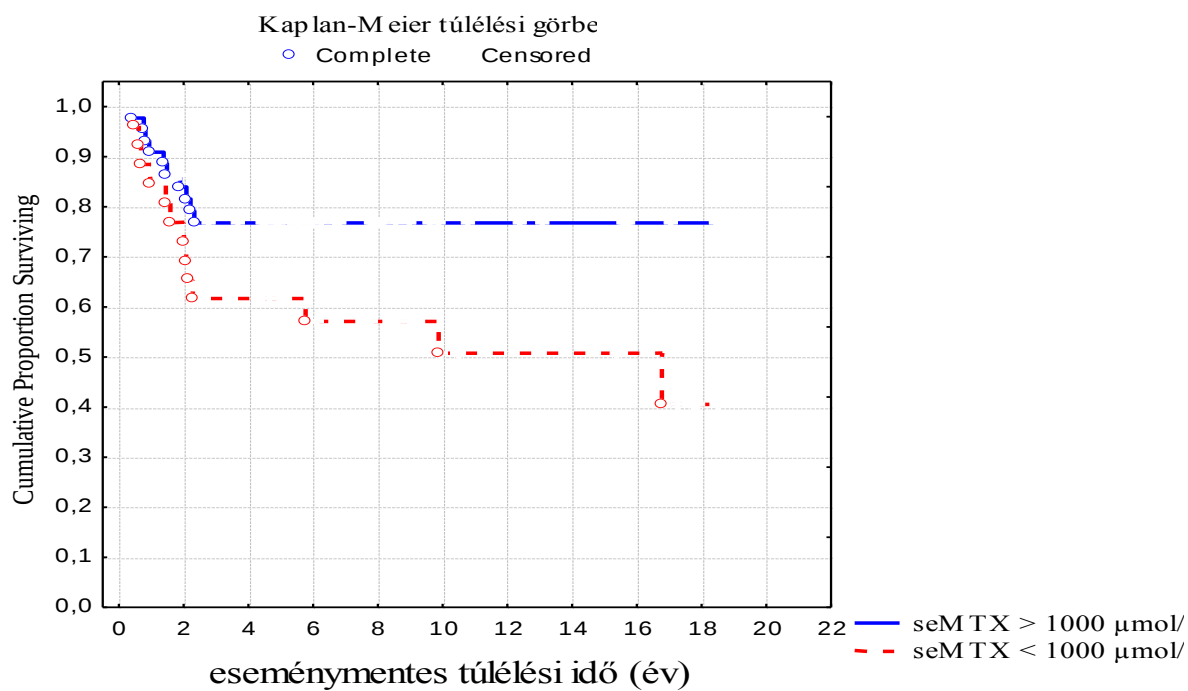
36. ábra: A csontvelő toxicitás (fvs) előfordulása ismételt kezelések során

Farmakokinetikai paraméterek és túlélés

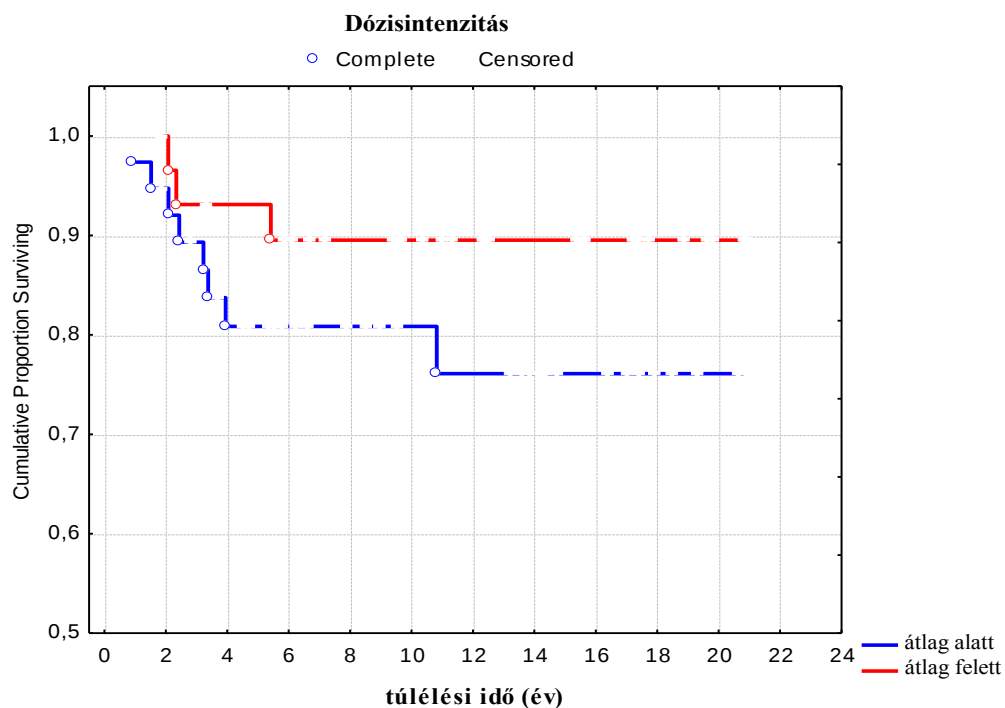
A 24 órás és a 48 órás MTX szérumszint szignifikáns korrelációt mutatott az eseménymentes ($p=0,0037$ ill. $p=0,047$) és az általános túléléssel ($p=0,02$ ill. $p=0,008$) is (Cox proporcionális hazard modell). A nagyobb 24 órás és 48 órás szérumszint MTX koncentrációt mutató betegek túlélése jobb volt.

A MTX csúcskoncentráció (4.-6. órában) ugyanakkor nem befolyásolta a túlélést ($>1000 \mu\text{mol/l}$ vs $<1000 \mu\text{mol/l}$, $p=0,06$ EFS esetén és $p=0,45$ OS esetén) (37. ábra). Nem találtunk összefüggést továbbá a csúcskoncentráció és a szövettani válasz ($p=0,172$) között sem. A túlélésre vonatkozóan nem volt kimutatható összefüggés a görbe alatti területtel (AUC_{0-48}), a felezési idővel és a MTX clearance-szel (nem közölt adatok).

A dózisintenzitás és az eseménymentes túlélés közötti összefüggés p -értéke éppen a szignifikanciahatáron volt ($p=0,0504$), magasabb dózisintenzitás jobb EFS értékkel járt együtt, de OS tekintetében ez az összefüggés már nem állt fenn ($p=0,217$) (38. ábra).



37. ábra A MTX csúcskoncentrációk és az OSC-s betegek EFS-e közötti összefüggés



38. ábra. OSC-s betegek általános túlélése (OS) a dózisintenzitás függvényében

Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a toxicitás előfordulása és a terápia kimenetele között. Eredményeink azt mutatják, hogy nem volt összefüggés a toxicitási paraméterek és az általános, illetve az eseménymentes túlélés között. A p-értékek a 18. táblázatban láthatók.

	Túlélés	OS	EFS
Csontvelő toxicitás	Fvs-mélypont (Gr0-I vs GrII-IV)	0,3567	0,8883
	Granulocita-mélypont (Gr0-I vs GrII-IV)	0,4208	0,7342
Májkárosodás	GPT első heti csúcs (Gr0-II vs GrIII-IV)	0,8448	0,8562
	GGT első heti csúcs (Gr0-I vs GrII-IV)	0,5739	0,3659
	Sebi első heti csúcs (Gr0 vs GrI-IV)	0,8347	0,7667
Vesetoxicitás	Kreatinin első heti csúcs (Gr0 vs GrI-IV)	0,2828	0,5444

**18. táblázat: A toxicitási paraméterek összefüggése a túléléssel gyermekkori OSC
kezelése során (p-értékek)**

V/3. Farmakogenetikai vizsgálatok

V/3/1. Farmakogenetikai vizsgálatok gyermekkori ALL-ben

V/3/1/1. *Kardiotoxicitás*

A genotipizálási eredmények a 19. táblázatban láthatók. A vizsgált 12 polimorfizmusból – technikai okok miatt – csak 9 esetében volt sikeres a meghatározás, így az analízisbe ezen eredményeket vontuk be.

SNP	Allél (1/2)	Funkció	Genotípus 11		Genotípus 12		Genotípus 22		n	MAF (%) ^e	HWE
rs4148330	A/G	promoter	sikertelen genotipizálás								
rs215060	A/G	intron	168	73%	54	24%	6	3%	228	14	0,51
rs246219	C/T	intron	167	74%	59	26%	0	0%	226	13	0,02
rs12922588	A/G	intron	sikertelen genotipizálás								
rs246221	T/C	V275V	91	39%	119	42%	23	19%	233	35	0,08
rs35605	C/T	L562L	sikertelen genotipizálás								
rs45511401	G/T	G671V	200	90%	23	10%	0	0%	223	5	0,41
rs4148358	C/T	intron	146	64%	72	32%	10	4%	228	20	0,76
rs11864374	G/A	intron	131	58%	80	35%	15	7%	226	24	0,55
rs6416666	A/G	intron	202	87%	31	13%	0	0%	233	7	0,27
rs3743527	C/T	3' UTR	140	61%	75	33%	13	6%	228	22	0,48
rs212097	A/G	3' UTR	63	27%	122	52%	48	21%	233	47	0,43

19. táblázat: A kardiotoxicitási vizsgálatokhoz genotipizált SNP-k

1: gyakori allél; 2: ritka allél n= sikeresen genotipizált betegek száma

MAF: a ritka allél frekvenciája HWE: eltérés a Hardy-Weinberg egyensúlytól (χ^2 teszt)

A különböző genotípus csoportok balkamra funkcióit (linEF) a kezelés kezdetén, közvetlenül a kemoterápia befejezésekor és az utolsó kontroll időpontjában határoztuk meg. (Ha nem volt

elég az esetszám a ritka homozigóta genotípus csoportban, akkor őket a heterozigóta egyénekkel egy csoportban elemeztük.) A polimorfizmusok Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak. A szignifikánsnak bizonyult eltéréseket a 20. tábl-ban mutatjuk be.

A diagnózis időpontjában mért szívtultrahangos adatok alapján számolt linEF értékek nem tértek el a három genotípus-csoportban egyik polimorfizmus esetén sem.

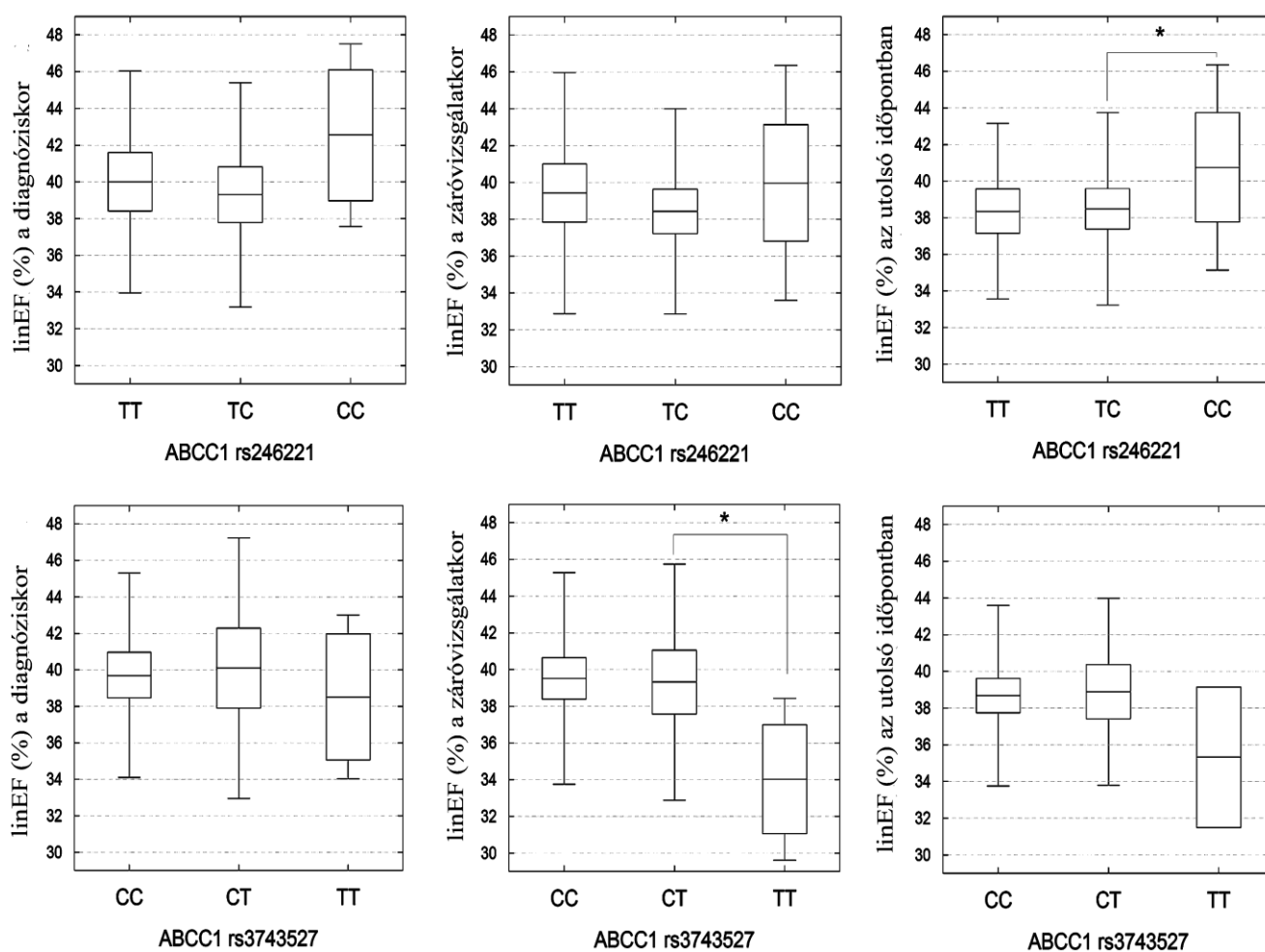
A kemoterápia befejezése után mért utolsó követési időpontnál a szívUH vizsgálatnál az *ABCC1* rs246221 TC/TT genotípusú betegeknek alacsonyabb volt az FS (linEF) értéke (38,4% és 38,5%), mint a CC genotípusúaknak (40,7%, $p=0,027$) (lásd 20. tábl. és 39. ábra).

Az rs3743527TT genotípusú betegeknél a kezelés befejezésekor mért pumpafunkció szignifikánsan alacsonyabb volt (34,0%), mint a CC (39,5%) és CT (39,3 %) genotípusú betegeknél ($p=0,001$) (lásd 21. táblázat, 39. ábra). Hasonló tendenciát figyeltünk meg az utolsó szívtultrahang mérés (a diagnózistól átlag $6,6 \pm 2,7$ év) alapján számolt FS értékeknél is. Az rs3743527TT genotípusú betegek utolsó követési időpontjánál mért FS 35,3%, a heterozigótáké 38,9% a CC homozigótáké 38,7% volt, de ez a különbség nem volt szignifikáns (valószínűleg a kis esetszám miatt).

Vizsgáltuk az előbb említett két SNP genotípus kombinációinak a hatását is. Összehasonlítottuk az rs3743527TT és rs246221TC vagy rs246221TT genotípusú egyének (TT-TC/TT, 2. csoport) linEF (FS) értékét az összes többi genotípus-kombinációval (1. csoport). A diagnózis idején nem volt különbség a csoportok között. A kezelés befejezésekor viszont a TT-TC/TT genotípus-kombinációjú gyermekeknek szignifikánsan alacsonyabb volt az FS értékük (34,0%), mint a többieknek (39,4%) ($p=0,001$) (21. táblázat és 40. ábra).

A különböző egyéb ECHO-val vizsgált paraméter, úgymint pl. a bal kamrai átmérők (LVEDs, LVEDd) tekintetében nem találtunk szignifikáns összefüggéseket a vizsgált genetikai paraméterekkel (nem közölt adatok).

A többváltozós elemzésbe kofaktorként bevett klinikai változók közül a diagnóziskori életkor, a kezelő kórház és a kemoterápiás protokoll szignifikáns (de nem releváns) kofaktornak bizonyult (nem közölt adatok). Ezzel szemben a nem, az össz-antraciklin dózis és a dexrazoxán használat nem volt szignifikáns (az FS értéke az utolsó kontroll alkalmából a DEX kezelésben részesülteknél 38,57 % volt, míg a többi betegben pedig 38,60 %).



39. ábra: A különböző időpontokban meghatározott lineáris ejekciós frakció (linEF vagy más néven FS) az *ABCC1* rs3743527 és rs246221 genotípus-csoportokban

(Félné Dr. Semsei Ágnes PhD értekezés)

Box-plot ábrák, box: átlag $\pm$ 95% CI, whisker: átlag $\pm$ SD * $p < 0,05$

(Az *ABCC1* rs3743527 TT genotípusú egyének utolsó időpontban mért linEF értékénél átlag $\pm$ SD egyenlő az átlag $\pm$ 95% CI-val)

Gén	Polimorfizmus	Allélok (1/2)		n	FS 11	SD	n	FS 12	SD	n	FS 22	SD	n	p
ABCC1	rs246221	T/C	linEF dg.	132	40,0	6,0	57	39,3	6,1	65	42,5	5,0	10	0,1
			linEF zv.	171	39,4	6,5	69	38,4	5,6	84	40,0	6,4	18	0,2
			linEF uk.	164	38,4	4,8	62	38,5	5,2	86	40,7	5,6	16	0,027
ABCC1	rs3743527	C/T	linEF dg.	131	39,7	5,6	79	40,1	7,1	43	38,5	4,5	9	0,5
			linEF zv.	168	39,5	5,8	103	39,3	6,4	54	34,0	4,4	11	0,001
			linEF uk.	161	38,7	4,9	108	38,9	5,1	47	35,3	3,6	6	0,2

20. táblázat: Szignifikáns balkamra funkció eltérésekkel összefüggésbe hozható polimorfizmusok gyermekkori ALL-ben.

n: elemszám a különböző csoportokban.

linEF dg.: a diagnóziskor meghatározott linEF; linEF zv.: a záróvizsgálatkor meghatározott pumpafunkció;

linEF uk.: a követés során az utolsó szívvultrahangos mérés alapján számolt bal kamra funkció

FS: fiber shortening (roströvidülés)

11: a gyakori allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a ritka allélra homozigóta

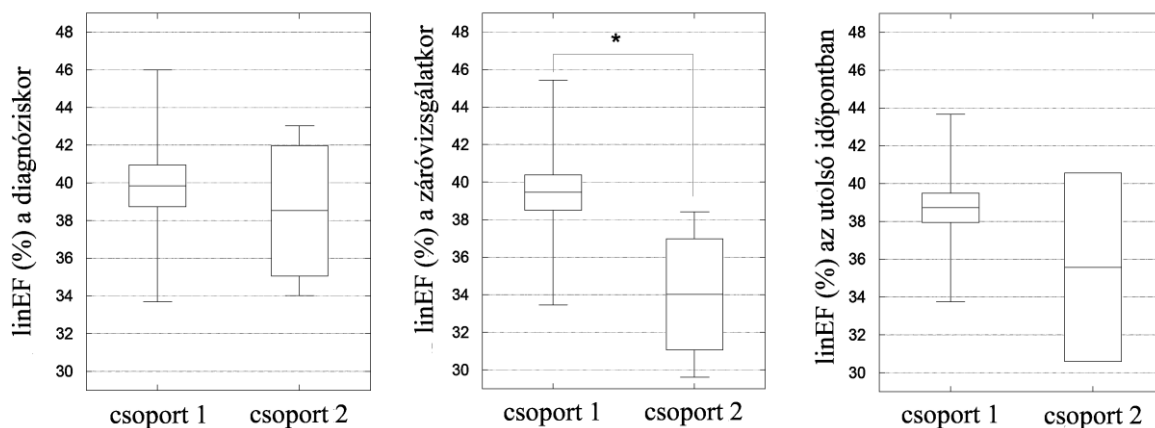
Gén	mérés	N össz	linEF 1.csoport	SD	n	linEF 2.csoport	SD	n	p
ABCC1	linEF dg.	131	39,8	6,2	122	38,5	4,5	9	0,4
ABCC1	linEF zv.	169	39,4	6,0	158	34,0	4,4	11	0,001
ABCC1	linEF uk.	163	38,7	4,9	158	35,6	4,0	5	0,1

21. tábl. Az rs3743527TT és rs246221TC/rs246221TT genotípusok esetén mért linEF értékek

1. csoport: azok a betegek, akiknek a genotípusa **nem** rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT

2. csoport: az **rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT** genotípusú betegek

A linEF érték a csoport átlagát jelöli (%). (Rövidítések: l. 20. tábl.)



40. ábra: Az rs3743527TT és rs246221TC/rs246221TT genotípusok esetén különböző időpontokban mért linEF értékek (Félné Dr. Semsei Ágnes PhD értekezés)

1. csoport: azok a betegek, akiknek a genotípusa **nem** rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT

2. csoport: az **rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT** genotípusú betegek

(Box-plot ábrák, mint előbb) * $p < 0,05$

V/3/1/2. *Immunszuppresszív hatás*

Vizsgáltuk az intenzív kemoterápiás kezelés alatt előforduló infekciók számát, az iv. antimikrobás kezelések hosszát és a teljes kemoterápiás protokoll hosszát, ami a szövődmények miatti csúszások meghatározása szempontjából érdekes. Az antimikrobás (antibiotikum és/vagy antifungális) kezelések hosszát és gyakoriságát vizsgáltuk egyrészt a teljes betegpopuláció medián értéke mentén illetve a felső kvadráns érték mentén két csoportba osztva a betegeket.

Így külön tudtuk vizsgálni azon eseteket, ahol a legsúlyosabb, leghosszabb fertőzések voltak. Az *ABCB1* 3435 C>T esetén a TT genotípus előfordulási aránya 28 % volt (39 eset), a CT 45 % (62), míg a CC 27 % (n=37). Ugyanezen gén esetén a homozigóta, 2xTTT (1236T-2677T-3435T) haplotípus gyakorisága 17 % volt (n=23), míg a többi 83 % (n=114). Az *ABCG2* 421C>A esetén a CC genotípus előfordulása 81 % volt (n=112), míg az AA+AC 19 % (n=26).

Az *ABCB1* 3435TT genotípust hordozók esetében az intenzív kemoterápia alatt több súlyos infekciós szövődményt észleltünk (TT: 67 % vs CC+CT: 46 % p=0,035) ill. az intenzív (hosszú antibiotikus kezelés, felső kvadráns) antibiotikus kezelést igénylő betegek száma nagyobb volt (TT: 44 % vs CC+CT: 21 % p=0,009) (22., 23. tábl.).

A leggyakoribb kapcsolt haplotípussal (2xTTT) végzett elemzés során nem találtunk szignifikáns összefüggést.

A kemoterápiás kezelések hossza, vagyis a terápiás csúszások időtartama is nagyobb volt a TT genotípus esetén (200 ± 18 nap vs 212 ± 20 nap, p=0,03) (41. ábra). A kemoterápiás kezelés denzitása, vagyis a kemoterápiás kezelés hossza döntő tényező a túlélés szempontjából. A csúszások kb. 90 %-a az infekcióknak köszönhető. Ugyanakkor nem volt összefüggés az előforduló súlyos (GrIII/IV) leukopénia és a különböző SNP-k között (23. tábl.).

Az *ABCG2* 421C>A genotípus tekintetében nem volt különbség az immunszuppresszív hatásban (22., 23. tábl.).

Az *ABCG2* 34G>A genotípus hatásait az alacsony gyakorisági adatok miatt nem tudtuk vizsgálni.

	ABCB1 3435T>C genotípus			ABCB1 haplotípus		ABCG2 421C>A	
	TT	CT	CC	2 x TTT ^a	Egyéb	CC	AA+CA
I.v. antimikrobiális kezelés a teljes intenzív terápiás protokoll alatt (medián határérték szerint: ≥ 18 nap); n=138							
≥ 18 nap ^b	26 (67%)*	28 (45%)	18 (49%)	13 (57%)	59 (51%)	57 (51%)	15 (58%)
Excesszív i.v. antimikrobiális kezelés a teljes intenzív terápiás protokoll alatt (felső kvadráns: ≥ 29 nap); n=138							
≥ 29 nap ^b	17 (44%)*	12 (19%)	9 (24%)	10 (44%)	28 (24%)	29 (26%)	9 (35%)
III/IV-es fokú leukocitopénia a kemoterápia reindukciós fázisa alatt; n=137							
Gr III/IV ^b	26 (67%)	33 (54%)	19 (51%)	14 (61%)	64 (56%)	65 (59%)	13 (50%)

22. táblázat: Immunszuppresszió ALL-ben. A vizsgált klinikai jellemzők előfordulási aránya genotípus csoportonként.

^a homozigóta a TTT (1236T-2677T-3435T) haplotípusra;

^b a százalékos értékek a genotípus csoporton belüli előfordulási arányra utalnak

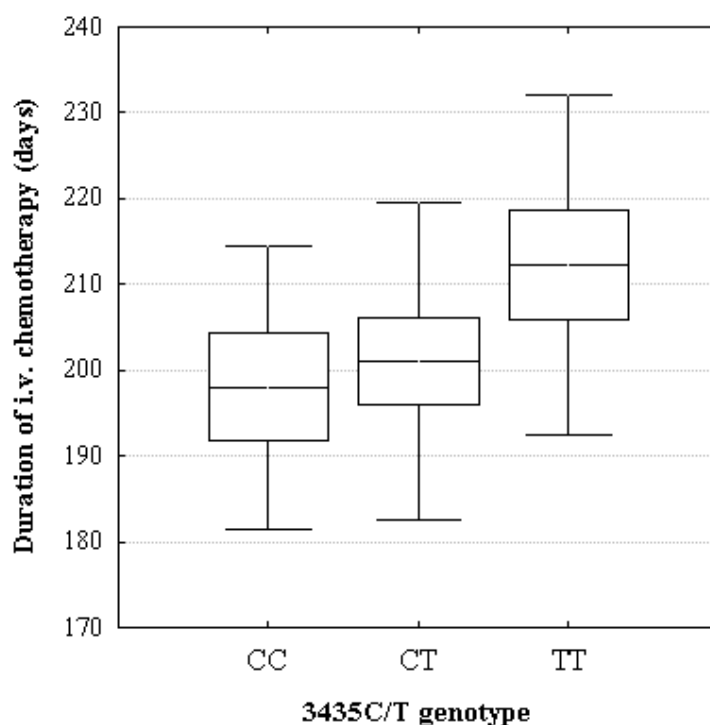
* $p < 0,05$ (TT vs egyéb)

	Univariáns elemzés				Multivariáns elemzés		
	OR (CI 95%)		p		OR (CI 95%)		p
Iv. antimikrobás kezelés hossza a teljes intenzív terápia alatt (medián határérték szerint: ≥18 nap)							
ABCB1 3435T>C (TT vs CC+CT)	2,3	(1,1-5,5)	0,035		2,1	(0,9-4,8)	0,068
ABCB1 haplotípus (2xTTT vs egyéb)	1,2	(0,5-3,0)	0,6		1,3	(0,5-3,4)	0,5
ABCG2 421C>A (AA+CA vs CC)	1,3	(0,6-3,1)	0,5		1,5	(0,6-3,8)	0,4
Hosszú iv. antimikrobás kezelés a teljes intenzív terápia alatt (felső kvadráns: ≥29 nap)							
ABCB1 3435T>C (TT vs CC+CT)	2,9	(1,3-6,4)	0,009		2,5	(1,1-5,6)	0,029
ABCB1 haplotípus (2xTTT vs egyéb)	2,4	(1,0-6,1)	0,066		2,3	(0,9-5,9)	0,087
ABCG2 421C>A (AA+CA vs CC)	1,5	(0,6-3,8)	0,4		1,5	(0,6-3,8)	0,4
III/IV-es fokú leukocitopénia a kemoterápia reindukciós fázisa alatt (ProtII)							
ABCB1 3435T>C (TT vs CC+CT)	1,8	(0,8-3,8)	0,15		1,4	(0,6-3,3)	0,5
ABCB1 haplotípus (2xTTT vs egyéb)	1,2	(0,5-3,0)	0,7		1,5	(0,5-4,6)	0,5
ABCG2 421C>A (AA+CA vs CC)	0,7	(0,3-1,7)	0,4		0,5	(0,3-1,4)	0,2

23. táblázat: A genotípus és az immunszuppresszív mellékhatások összefüggése ALL-s betegekben (Dr. Erdélyi Dániel PhD értekezés, 2009)

^a homozigóta a TTT (1236T-2677T-3435T) haplotípusra.

OR: odds ratio, CI 95%: 95%-os konfidencia intervallum.



41. ábra: Az ABCB1 génpolimorfizmus összefüggései az intenzív kezelés időtartamával

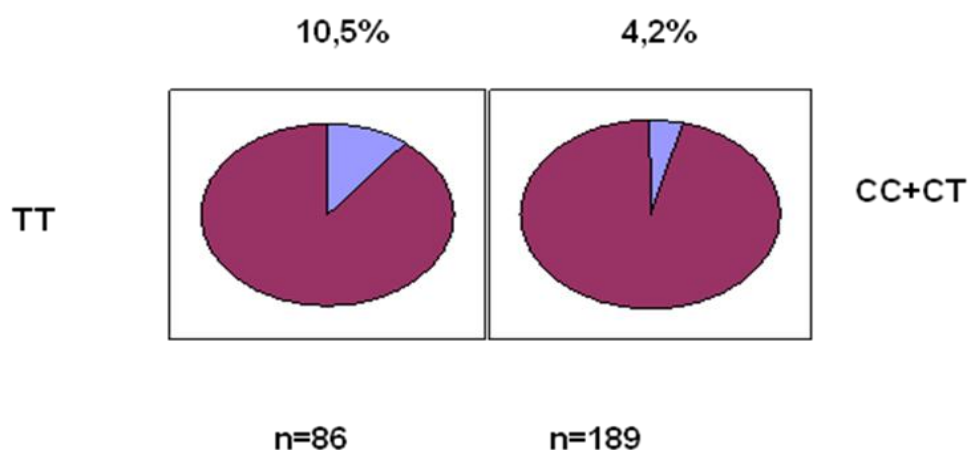
V/3/1/3. Enkefalopátia

Az ABCB1 3435 C>T esetén a TT genotípus előfordulása aránya 31 % volt (86 eset), a CT 47 % (129), míg a CC 22 % (n=60). Ugyanezen gén esetén a 2xTTT haplotípus gyakorisága 20 % volt (n=55), míg a többi 80 % (n=200). Az ABCG2 421C>A esetén a CC genotípus előfordulása 78 % volt (n=215), míg az AA+AC 22 % (n=60).

Az ABCG2 34G>A esetén az adatok: GG 93 % (n=255), AG 7 % (n=20), AA 0 %.

A vizsgált betegek esetén a vizsgált periódusban összesen 17 esetben (6,2 %) fordult elő toxikus enkefalopátia (egy kivételével mind reverzibilisnek bizonyult).

ALL-es betegeink esetében az ABCB1 transzporter 3435TT genotípus csoportban nagyobb arányban fordult elő akut enkefalopátia (10,5 %), mint a 3435CC+CT hordozókban (4,2 %) (multivariáns analízis: OR=3,5; CI 95% 1,2-10,7; p=0,03) (42. ábra).



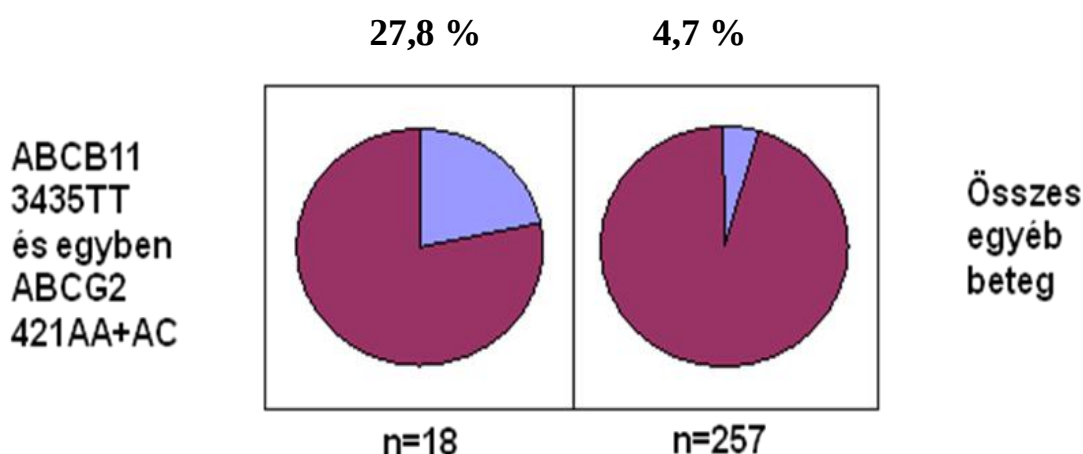
42. ábra: Az akut toxikus enkefalopátia előfordulása genotípus csoportonként

ALL-ben (*ABCB1* 3435T>C)

bordó: nincs enkefalopátia kék: van enkefalopátiás epizód

Amennyiben a leggyakoribb kapcsolt haplotípust elemeztük (2xTTT), akkor már nem kaptunk statisztikailag szignifikáns különbséget (univariáns analízis OR=1,7; CI 95% 0,6-5,1 multivariáns analízis OR= 2,2; CI 95% 0,7-7,2) (24. tábl.).

Ugyanakkor egyértelműen elkülöníthető volt egy veszélyeztetett betegcsoport, ha az *ABCB1* 3435TT genotípust kombinálva vizsgáltuk az *ABCG2* 421AA/AC genotípussal (27,8 % klinikai tünet vs 4,7 %) (univariáns analízis: 7,7; CI 95% 2,1-27,7 multivariáns analízis: OR=10,7; CI 95% 2,1-55,7; p=0,001) (43. ábra) (25. tábl.).



43. ábra: Génpolimorfizmusok kapcsoltsága a toxikus enkefalopátiával ALL-ben

(*ABCB1* 3435T>C és *ABCG2* 421C>A genotípus) (n=275)

A 24. és 25. táblázatban feltüntettük a különböző génpolimorfizmusok lehetséges asszociációt a központi idegrendszeri károsító hatásokkal a kezelések különböző szakaszaiban. Míg az egyes meghatározó SNP-k (pl. (*ABCB1* 343T>C) önmagukban csak csekély hatást fejtettek ki, addig a potenciálisan hajlamosító SNP-k kombinációja multivariáns elemzésben kifejezetten szignifikáns. A legerősebb összefüggés a kezelési szakaszok között a konszolidációban volt, ahol a betegek csak HD-MTX-ot és 6-merkaptopurint kapnak (25. tábl.).

Az *ABCG2* gén polimorfizmusai önmagukban nem voltak kapcsolatba hozhatók az idegrendszeri mellékhatásokkal (nem közölt adatok). Az *ABCG2* esetén csak egy tendencia volt megfigyelhető: több mellékhatás fordult elő azon betegek között, akik legalább egy variáns 421A allélt hordoztak, szemben a vad típust hordozókkal (OR=2,1; CI 95% 0,7–5,8 és 2,0; CI 95% 0,6–6,1 egy- és többparaméteres kalkulációval, $p=ns$). Ugyanakkor nem figyeltünk meg idegrendszeri károsodást azon 20 betegben, akik a ritka *ABCG2* 34 A allélt hordozták (de ez statisztikailag nem volt értékelhető az alacsony elemszám és %-os előfordulás miatt).

	Univariáns elemzés OR	Multivariáns elemzés OR
<i>ABCB1</i> 3435TT vs CC+CT	2,6 ($p=0,05$)	3,5 ($p=0,03$)
<i>ABCB1</i> haplotípus: 2xTTT vs egyéb	1,7 ($p=0,32$)	2,2 ($p=0,25$)
<i>ABCG2</i> 421AA+AC vs CC	2,1 ($p=0,17$)	2,0 ($p=0,26$)
<i>ABCG2</i> 34GG vs AG+AA	– ($p=1,0$)	– ($p=1,0$)

2xTTT: 3435T-2677T-1236T homozigóta haplotípus

OR: odds ratio.

24. táblázat: Az *ABCB1* és az *ABCG2* genotípusok összefüggései a toxikus encefalopátiával ALL-ben

	Univariáns elemzés OR (CI 95%)	Multivariáns elemzés OR (CI 95%)
Teljes intenzív protokoll alatt:		
<i>ABCB1</i> 3435TT+ <i>ABCG2</i> 421CC vs 3435 CC+CT+421CC	1,3 (0,35–4,4)	1,2 (0,26–5,4)
<i>ABCB1</i> 3435CC+CT+ <i>ABCG2</i> 421AA+AC vs 3435 CC+CT+421CC	0,5 (0,06–4,1)	0,5 (0,05–5,7)
<i>ABCB1</i> 3435TT+ <i>ABCG2</i> 421AA+AC vs 3435 CC+CT+421CC	7,7 (2,1–27,7)	10,7 (2,1–55,7)
Indukció és reindukció alatt:		
<i>ABCB1</i> 3435TT+ <i>ABCG2</i> 421AA+AC vs 3435 CC+CT+421CC	7,2 (1,5–35,0)	8,6 (1,1–69,9)
Konszolidációs szakasz alatt:		
<i>ABCB1</i> 3435TT+ <i>ABCG2</i> 421AA+AC vs 3435 CC+CT+421CC	9,1 (1,2–68,8)	19,7 (0,7–53,9)

OR: odds ratio, CI 95%: 95%-os konfidencia intervallum.

25. táblázat: Az *ABCB1*–*ABCG2* összetett genotípus csoportokban előforduló heveny enkefalopátiás epizódok gyakoriságának statisztikai összehasonlítása

A betegek egy részénél (n=120) a likvor MTX koncentrációk is rendelkezésre álltak. Nem találtunk azonban összefüggést a genetikai alcsoportok és a likvor MTX szintek között (nem közölt adatok).

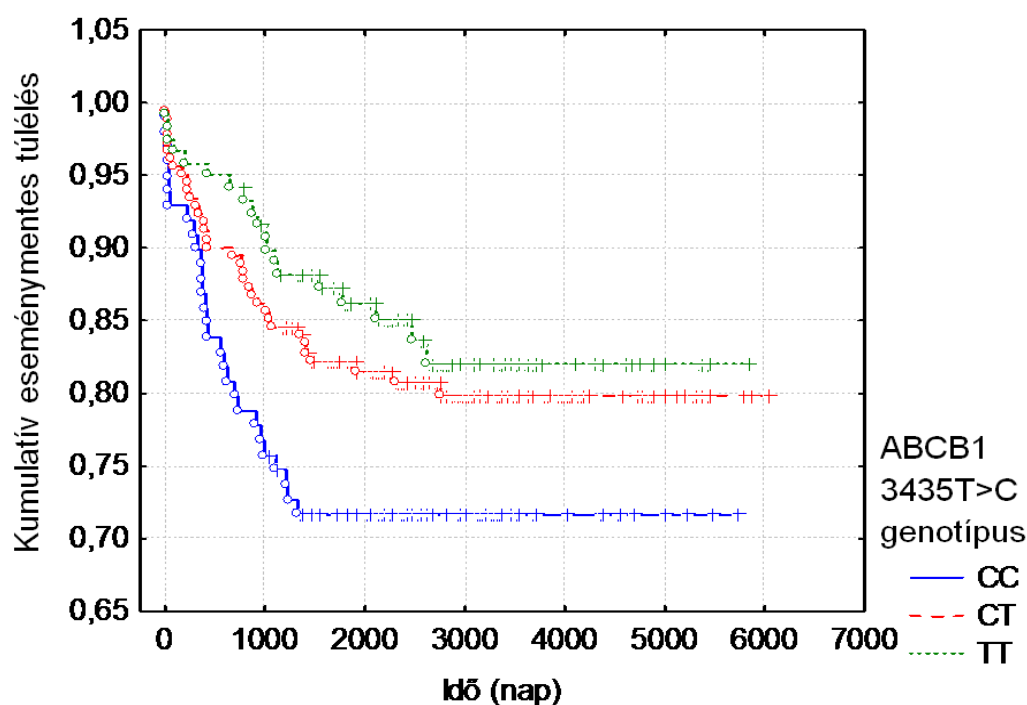
Mindezek alapján megállapítható, hogy bizonyos génpolimorfizmusok kombinációjával meghatározható egy olyan kis betegcsoport (*ABCB1* 3435TT+*ABCG2* 421AA+AC), ahol a toxikus komplikációk megjelenésének esélye különösen nagy.

V/3/1/4. *ABCB1* és *ABCG2* génpolimorfizmusok hatása a gyermekkori ALL túlélésére.

Az *ABCB1* 3435T>C genotípus csoportok eseménymentes túlélésében szignifikáns különbséget találtunk. A CC genotípust hordozók túlélése szignifikánsabb rosszabb volt a CT vagy TT csoportokhoz képest (p=0,026), (44. ábra).

Az egyes genotípus csoportok nem különböztek szignifikánsan az ismert prognosztikai tényezők (nem, életkor, T- vagy B-sejtes immunfenotípus, blasztok genetikai jellemzői, BFM rizikócsoportok aránya) tekintetében (nem közölt adatok).

Nem találtunk szignifikáns különbséget a túlélés vonatkozásában az *ABCB1*-haplotípusok (TTT homozigóta vs egyéb) ill. az *ABCG2* genotípus csoportok között.



44. ábra: Az ALL-es betegek eseménymentes túlélése *ABCB1* genotípus csoportonként

(n=403, medián követés 6,5 év, ALL-BFM90 és ALL-BFM95 protokollok alapján)

(Dr. Erdélyi D. PhD értekezés, 2009)

V/3/1/5. Szteroid receptor polimorfizmusok előfordulása a szteroid hatásokban és mellékhatásokban gyermekkori ALL-ben

GCR N363S

Az összes betegből 32/346 esetben tudtunk heterozigóta formában ritka típust kimutatni (9,2 %) (homozigóta nem fordult elő).

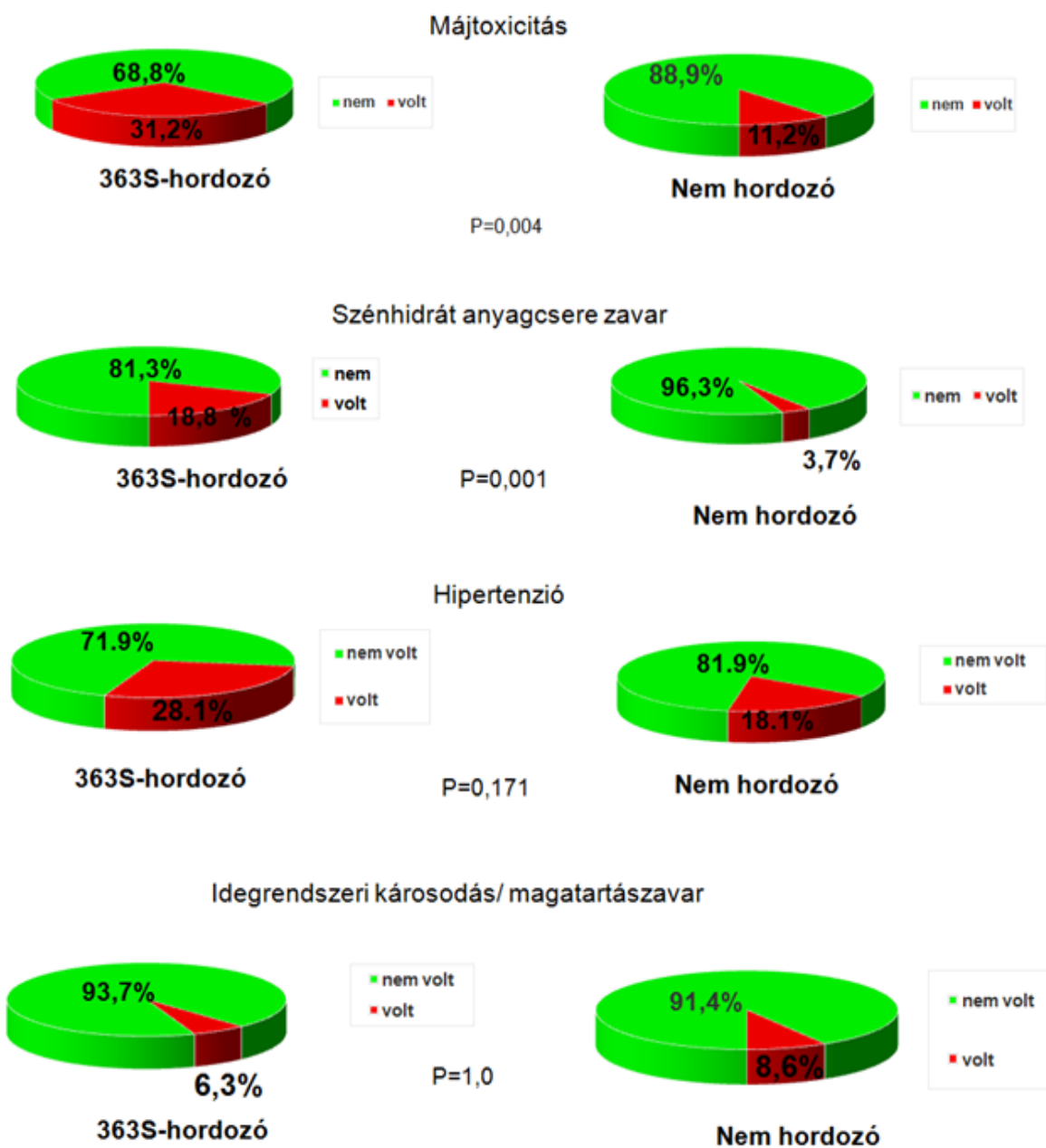
A ritka allélt hordozókban szignifikánsan több súlyos *májtoxicitást* észleltünk. A ritka allélt hordozókban 10/32 esetben, míg a többiekben 35/314 esetben lehetett Grade III/IV. hepatotoxicitást kimutatni (31,3 % vs 11,2 %, $p=0,004$, OR=3,6; CI: 1,586-8,277, 95%) (45. ábra).

Kóros *hiperglikémia* vagy glukózuria szintén gyakrabban fordult elő ritka allél esetén, 6/32 ill. 8/314 esetben (18,8 vs 3,8 %, $p=0,001$, odds ratio=8,8, CI: 2,847-27,372, 95%) (45. ábra).

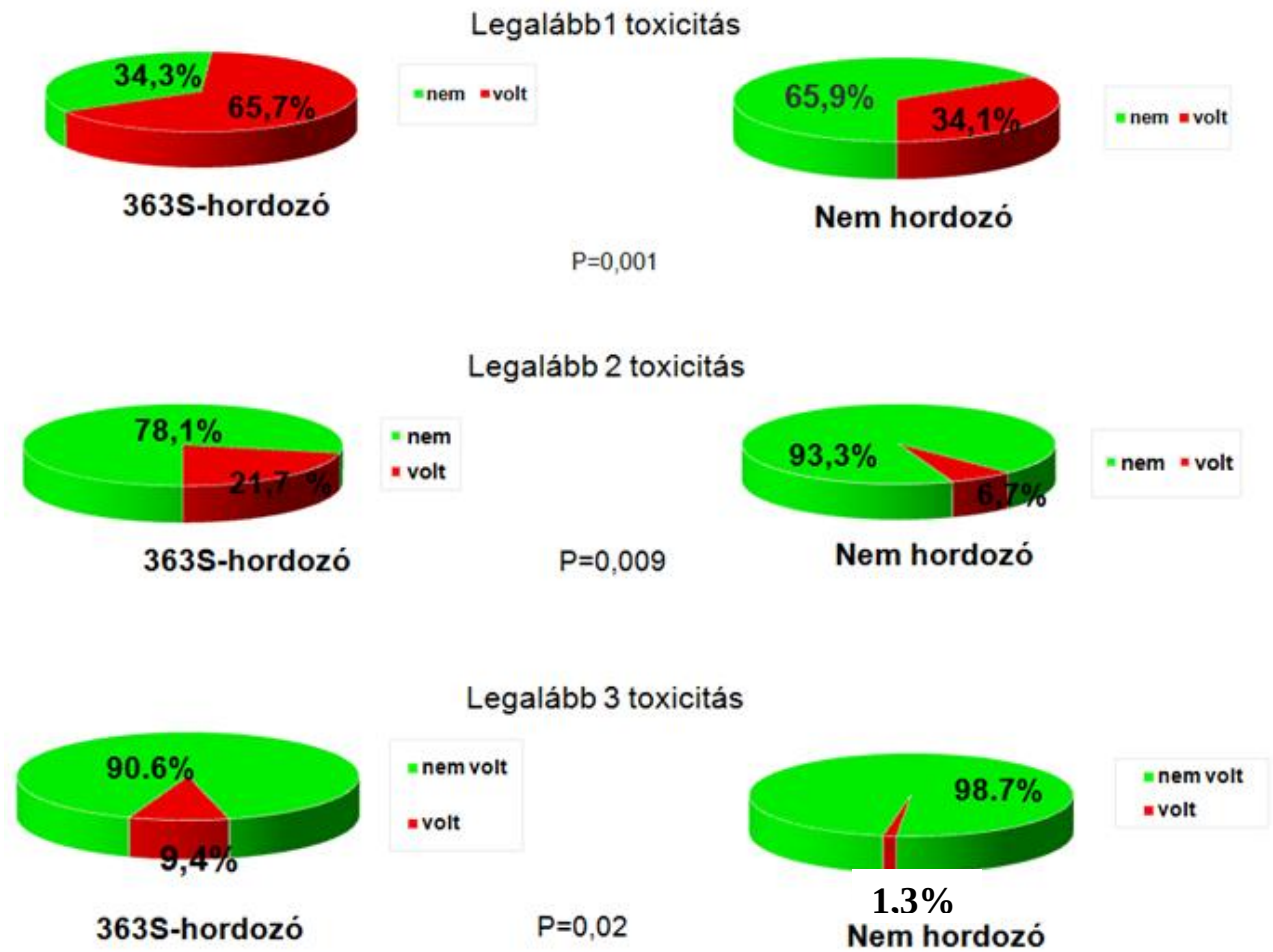
Nem találtunk korrelációt viszont az enkefalopátia (6,3 vs. 8,6 %, $p=1,0$), vagy a hipertonia (28,1 vs. 18,2 %, $p=0,171$) előfordulási gyakorisága és a vizsgált génpolimorfizmus között (45. ábra).

Szintén nem volt összefüggés pancreatitis, szemészeti ill. csontelváltozások tekintetében (nem közölt adatok).

Szignifikáns különbség mutatkozott, ha az egy betegnél előforduló *szteroid mellékhatások számát* hasonlítottuk össze a hordozók és nem-hordozók között. Egyféle toxicitás 65,6 ill 34,1 %-ban fordult elő ($p=0,001$), kétféle toxicitás 21,9 ill. 6,7 %-ban ($p=0,009$), míg legalább háromféle toxicitás 9,4 ill. 1,3 %-ban volt kimutatható ($p=0,02$) (46. ábra).



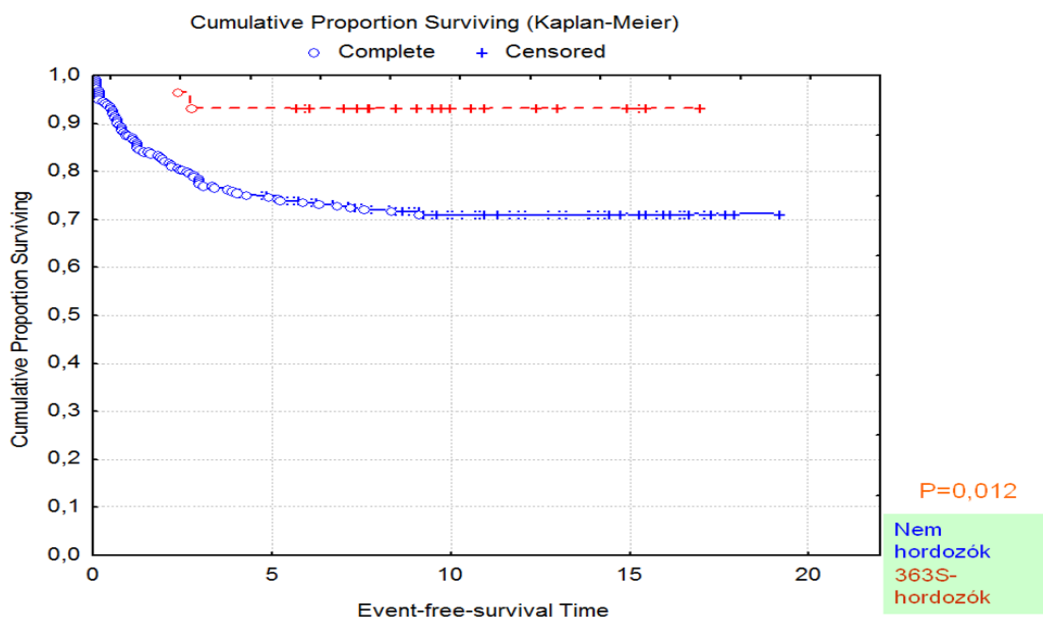
45. ábra: Különböző toxicitások előfordulása a 363S/1220G-hordozók és nem-hordozók (1220A/1220A) között (Eipel O. PhD értekezés 2014)



46. ábra: Egy gyermeknél előforduló toxicitások aránya az N363S GCR polimorfizmussal összefüggésben (Dr. Eipel O. PhD értekezés, 2014)

A szteroid kezelés *terápiás hatását* vizsgálva azt találtuk, hogy a variáns allélt hordozókban minden esetben (32/32) jó terápiás választ kaptunk (perifériás blaszt szám <1 G/l), míg a vad allélt hordozókban csak 288/314 esetben (91,7%) (p=ns).

A 363S/1220G genotípussal rendelkezők körében az 5-éves eseménymentes *túlélés* szignifikánsan jobbnak mutatkozott (p=0,012) a nem hordozókhoz képest (5 év EFS 92 % vs 72 %, p=0,12) (47. ábra). Hasonló értékeket kaptunk az általános túlélés tekintetében is (5 év OS 100 % vs 78 %, p=0,013).



47. ábra: EFS a GCR N363S polimorfizmussal összefüggésben

ER22/23EK polimorfizmus

A 346 ALL-s gyermekből 10 hordozta heterozigóta formában a polimorfizmust (3,46%).

A *hepatotoxicitást* vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a polimorfizmust hordozók és nem-hordozók között (1/10 ill. 44/336, 10 % vs 13,1 %, $p=0,6185$).

Szintén nem volt különbség a két csoport között a *szénhidrát anyagcserét* érintő toxicitások között (0/10 ill. 14/336; 4,1 %, $p=0,51$).

Magas vérnyomás a polimorfizmust hordozók között nem fordult elő, míg a nem-hordozóknál 66/336 esetben (19,6 %) volt megfigyelhető ($p=0,25$).

Idegrendszeri károsodás a hordozókban szintén nem fordult elő, míg a nem-hordozókban 29/336 gyermekben volt észlelhető (8,6 %, $p=0,695$).

Ha a *toxicitások halmozódását* vizsgáltuk egy betegben, akkor azt találtuk, hogy nem akadt szignifikáns különbség a legalább egy toxicitást mutató betegek számában a hordozók és a nem hordozók között, bár a különbség a szignifikancia határán volt ($p=0,06$). A hordozók között csak egy betegnek (1/10) volt legalább egyféle toxicitása, míg a nem-hordozók 37,8 %-ában (127/336). Kétféle vagy háromféle toxicitás már nem fordult elő a hordozók között, míg a nem-hordozóknál ez az arány 8,3 % (28/336) ill. 2,1 % (7/336) volt ($p=ns$).

A *8. napi szteroid terápia választ* vizsgálva azt találtuk, hogy a polimorfizmust hordozók esetében minden gyermek jól reagált a kezelésre, míg a nem-hordozóknál 290/336 (92,3 %)

esetben észleltünk jó terápiás választ ($p=ns$). A *túlélési* görbék esetén sem találtunk különbséget a különböző genetikai csoportok között, sem az EFS, sem az OS vonatkozásában (nem közölt adatok).

BCL1 polimorfizmus

Technikai okok miatt csak 257 beteg genotipizálását tudtuk elvégezni. A homozigóta vad típusúak (C/C) száma: 122/257 (47,47%) a heterozigóták (CG) aránya: 105/257 (40,86%), míg a ritka homozigóta típusúak (GG) száma: 30/257 (11,67%) volt. Kilenc olyan gyermeket is találtunk, akinél a fokozott szteroid-érzékenységgel korábban összefüggésbe hozott genotípus kombináció: BCL1:GG és N363S:1220G volt jelen. Ezen betegeket külön megvizsgáltuk a toxicitások irányában.

A *hepatotoxicitás* tekintetében nem találtunk különbséget sem a G allél hordozás, sem pedig a homozigóta GG genotípus és a májkárosító hatás között ($p=0,455$ ill. 0,23; nem közölt adatok), és szintén nem volt különbség a genotípus kombinációt hordozók és nem-hordozók között sem ($p=0,671$).

Hasonló eredményre jutottunk a *szénhidrát anyagcserét* érintő toxicitás és a különböző genotípus csoportok között: semmilyen összefüggésben nem volt szignifikáns eltérés. Egyedül a BCL1:GG és N363S:1220G genotípus kombináció mutatott valamivel nagyobb arányú mellékhatást (2/7 ill. 15/233), de a különbség matematikailag itt sem szignifikáns ($p=0,113$).

Az *idegrendszeri mellékhatások* vagy a *magas vérnyomás* betegség és a különböző genetikai csoportok között sem találtunk semmilyen jelentős összefüggést (nem közölt adatok).

Ha a *toxicitások előfordulási arányát* (számát) vizsgáltuk egy betegben, akkor is azt tapasztalhattuk, hogy a különböző genetikai variánsok és a potenciális szteroid toxicitások száma között semmilyen összefüggés nem volt kimutatható (nem közölt adatok).

A *nyolcadik napi prednisolon választ* vizsgálva, megállapíthattuk, hogy a G allél önmagában nem jelent kedvezőbb terápiás hatást ($p=0,559$). A GG genotípust hordozók között egy beteg sem volt, aki rossz választ adott volna a prednisolonra, míg a többi betegben a kedvezőtlen prednisolon válasz aránya 5% volt ($p=ns$). A BCL1:GG és N363S:1220G együttes előfordulása esetén szintén nem fordult elő rossz prednisolon válasz, míg a többiekben a rossz választ adók aránya 3,6% volt.

Végezetül a *túlélési* adatokat vizsgálva, szintén nem találtunk különbséget sem az EFS, sem az OS vonatkozásában a különböző genetikai alcsoportok között (nem közölt adatok).

V/3/1/6. A MTX és a 7-OH-MTX szintek összefüggései a genetikai változókkal ALL-ben

A genetikai vizsgálatok eredményét a 26. táblázatban tüntettük fel. Elemzésünkben pedig a klasszikus statisztikai módszerek új generációját, új módszereit alkalmaztuk.

SNP (rs#)	Gén	Allél (1/2)*	11 %	12 %	22 %	MAF %
rs9967368	TYMS	G/C	37	52	11	37
rs2853741	TYMS	C/T	50	43	7	28
rs2853533	TYMS	G/C	77	19	4	13
rs1004474	TYMS	A/G	34	49	17	42
rs2612100	TYMS	G/A	48	40	12	38
rs2966952	MTRR	C/T	69	29	3	17
rs1801394	MTRR	G/A	30	45	24	47
rs326120	MTRR	A/G	68	30	3	17
rs1532268	MTRR	G/A	39	48	13	37
rs162036	MTRR	A/G	83	16	1	9
rs3776455	MTRR	A/G	43	50	7	32
rs10380	MTRR	C/T	88	11	1	7
rs11888	JAK3	T/C	35	54	11	38
rs3212713	JAK3	G/A	52	43	5	27
rs2842951	TPMT	C/T	54	37	10	28
rs2518463	TPMT	T/C	27	47	26	50
rs4449636	TPMT	G/A	27	47	26	50
rs1979277	SHMT1	G/A	50	43	7	29
rs9909104	SHMT1	T/C	64	28	8	22
rs643333	SHMT1	C/A	52	43	5	27
rs17328763	SLCO1B1	T/C	74	21	4	15
rs11045818	SLCO1B1	G/A	74	23	3	14
rs11045819	SLCO1B1	C/A	74	28	3	14
rs4149056	SLCO1B1	T/C	67	31	3	18
rs11045823	SLCO1B1	G/A	74	23	3	19
rs4363657	SLCO1B1	T/C	64	33	3	19
rs10841769	SLCO1B1	G/A	26	51	23	48
rs7499	SLC19A1	G/A	28	52	20	46

rs4819128	SLC19A1	T/C	25	53	22	48
rs1051266	SLC19A1	G/A	25	55	20	47
rs4149183	SLC22A8	T/C	54	39	7	27
rs2276299	SLC22A8	A/T	75	21	4	15
rs3809069	SLC22A8	T/C	66	32	2	18
rs4509706	ARID5B	T/C	84	16	0	8
rs4948487	ARID5B	A/C	25	57	18	47
rs10821936	ARID5B	T/C	30	57	14	42
rs4506592	ARID5B	G/A	30	55	15	42
rs7089424	ARID5B	T/G	30	57	14	42
rs4948496	ARID5B	C/T	28	50	22	47
rs4948502	ARID5B	T/C	48	39	13	33
rs1076991	MTHFD1	A/G	25	51	23	49
rs1950902	MTHFD1	C/T	88	33	1	17
rs2236225	MTHFD1	C/T	40	40	20	40
rs745686	MTHFD1	A/G	49	39	12	32
rs310225	JAK1	G/A	53	40	7	27
rs12063205	JAK1	A/G	78	19	3	12
rs2032582	ABCB1	G/T	35	41	24	44
rs2235013	ABCB1	G/A	27	45	28	51
rs1202179	ABCB1	A/G	51	40	9	29
rs9282564	ABCB1	A/G	82	16	2	10
rs1544105	FPGS	G/A	36	46	18	41
rs10106	FPGS	A/G	38	46	17	40
rs4451422	FPGS	A/C	36	49	14	39
rs12759827	MTR	A/G	55	39	6	25
rs4659724	MTR	G/A	40	50	10	35
rs3768142	MTR	T/G	32	55	13	41
rs10925257	MTR	A/G	64	33	3	19
rs1805087	MTR	A/G	64	33	3	19
rs2853523	MTR	C/A	33	55	11	39

26. tábl. Az ALL-s gyermekek genetikai analízisébe bevont SNP-k jellemzői

Allél a vezetősálon: 1: major allél; 2: minor allél

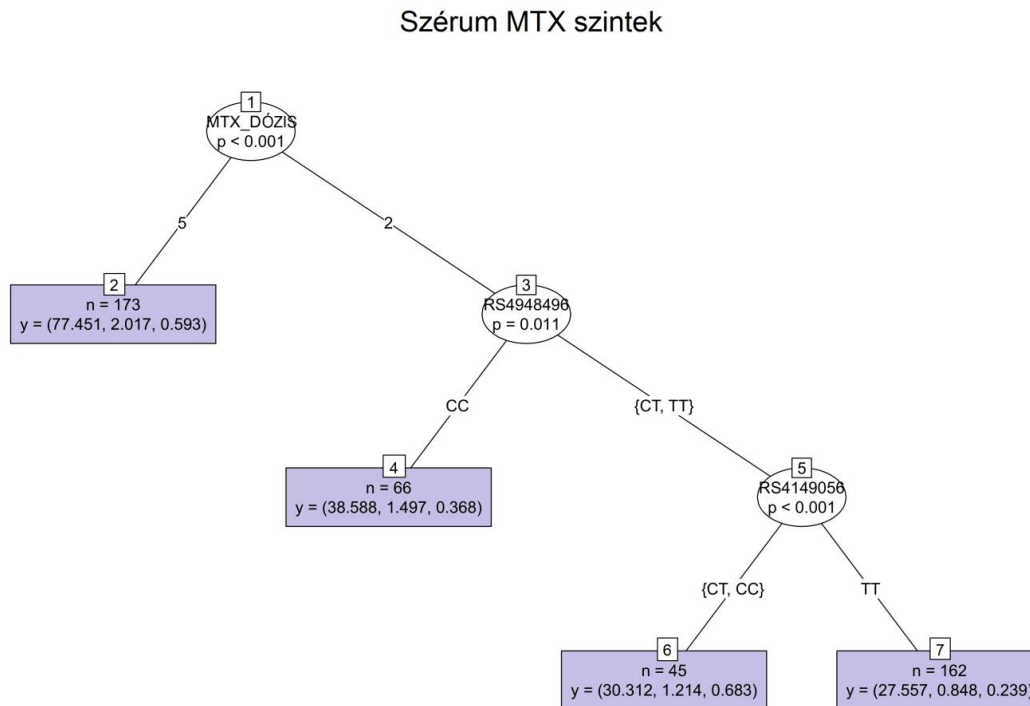
MAF: minor allél frekvencia

A relatív kevés mérési időpont és a nagy számú magyarázó változó miatt első lépésben random forest (RF) elemzéssel választottuk ki azon változókat, amelyek kapcsolatba hozhatók voltak a MTX farmakokinetikai paramétereivel (szérumszintek): MTX dózis, immunfenotípus, rizikó csoport, életkor, az rs2612100, rs2236225, rs1004474, rs9967368, rs7499, rs7089424, rs10821936, rs4506592, rs1076991, rs745686, rs4948496, rs1801394, rs4363657, rs4149056 és az rs1202179.

Ezt követően a kiválasztott magyarázó változókkal végeztük a CART elemzést, melynek alapján a szérum (24ó+36ó+48ó) MTX szinteket, mint egy közös célváltozót az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m²) befolyásolta leginkább ($p < 0,001$) (48. ábra) (hasonló eredményt kaptunk, mint a farmakokinetikai elemzésnél). Továbbá a 2 g/m² MTX dózis esetén, az rs4948496 (*ARID5B*) is szignifikáns összefüggést mutatott a MTX szérumszintekkel ($p = 0,011$) (48. ábra). A CC genotípus esetén magasabb MTX szérumszinteket mértünk, mint a CT vagy TT genotípus esetén. Ugyanebben a betegcsoportban, akik az rs4948496 CT+TT genotípussal rendelkeztek, az rs4149056 (*SLCO1B1*) is szignifikáns összefüggést mutatott az MTX szintekkel ($p < 0,001$) (48. ábra). Az rs4149056 TT genotípus esetén alacsonyabb volt a szérum MTX szint, mint a CT+CC genotípust hordozókban. Ezen SNP-k és a szérum MTX szintek közötti kapcsolat általános lineáris kevert modellel (GLMM) is szignifikánsnak bizonyult (rs4948496: $p = 0,039$, rs4149056: $p = 0,004$). Megfigyeltük továbbá, hogy azon betegekben, akik az rs4948496 CC genotípusával rendelkeztek 2 g/m² MTX dózis esetén gyakrabban fordult elő magasabb 48 órás MTX szint ($> 0,25 \mu\text{mol/l}$) (CC vs CT+TT: 61% vs 39%, $p = 0,044$). Az rs4948502 és a szérum MTX szintek között kapcsoltságot nem találtunk.

Az AUC_{MTX} CART és GLMM elemzése során csak az alkalmazott MTX dózis (5 vagy 2 g/m², $p < 0,001$) mutatott szignifikáns összefüggést a görbe alatti területtel.

Az RF elemzés során szignifikáns összefüggéseket találtunk a szérum 7-OH-MTX szintek és/vagy az AUC_{7-OH-MTX} esetén a következő paraméterekkel: MTX dózis, immunfenotípus, életkor, az rs9967368, rs10841469, rs7499, rs2235013, rs4451422, rs1202179, rs4948487, rs4948496, rs2518463, rs4948502, rs12759827, rs10106 és az rs1801394.



**48. ábra: A szérum MTX szintek klasszifikációs és regressziós fája
(Csordás K. PhD értekezés, 2014)**

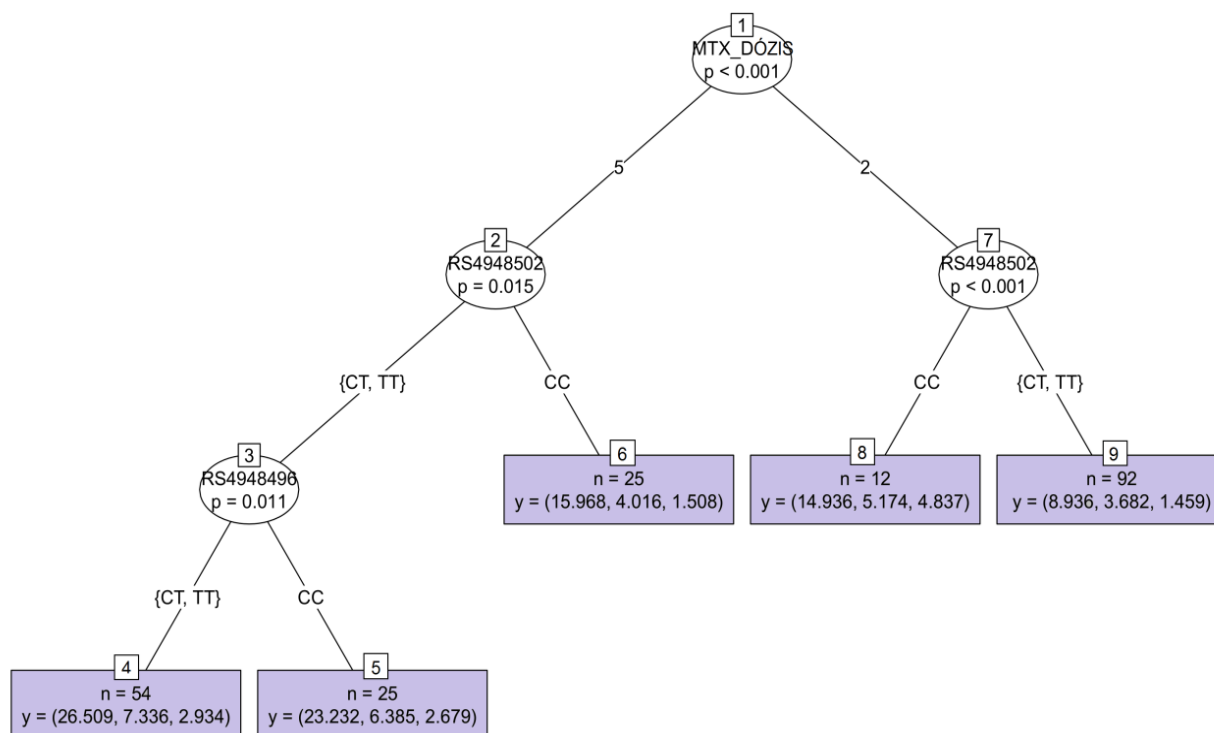
A körök azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a szérum MTX szinttel (24ó, 36ó, 48ó). A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok ábrázolják.

y= átlag MTX szint a 24., 36., 48. órában

A szérum (24ó+36ó+48ó) 7-OH-MTX szintek döntési fája a MTX-éhoz hasonló képet mutatott (49. ábra). A MTX dózis (5g/m² vagy 2 g/m²) befolyásolta legjobban a 7-OH-MTX szinteket, mint közös célváltozót (p<0,001) (l. korábbi eredmények). Mindkét MTX dózis esetén az rs4948502 (*ARID5B*) szignifikáns összefüggést mutatott a 7-OH-MTX szintekkel (p=0,015 és p<0,001), és ezt a GLMM elemzés is igazolta (p=0,003 és p=0,033). Itt azonban az rs4948502 vonatkozásában az eredmény nem egyértelmű. A kisebb MTX dózis (2 g/m²) mellett a CC genotípus magasabb 7-OH-MTX szintekkel, míg a nagyobb dózis (5 g/m²) mellett a CC genotípus alacsonyabb 7-OH-MTX szintekkel állt összefüggésben (a többi genotípus variációval szemben). Az rs4948502 (*ARID5B*) CT+TT genotípus esetén, a nagyobb MTX dózissnál, egy másik SNP, az rs4948496 (*ARID5B*) is szignifikáns összefüggést mutatott a 7-OH-MTX szintekkel a CART elemzés szerint (p=0,011), melyet a GLMM nem erősített meg.

A $AUC_{7\text{-OH-MTX}}$ esetén a CART és GLMM elemzése is megegyező eredményt mutatott. Az rs4948502 (*ARID5B*) mindkét dózis esetén szignifikáns összefüggést mutatott az $AUC_{7\text{-OH-MTX}}$ -tal (CART, $p < 0,001$, GLMM, ($p < 0,001$ és $p = 0,013$). Továbbá a CART alapján az rs4948496 (*ARID5B*) is összefüggést mutatott az rs4948502 CT+TT genotípussal és az $AUC_{7\text{-OH-MTX}}$ -tal, hasonlóan mint a =-OH-MTX szintek esetén (5 g/m² MTX: $p = 0,003$).

Szérum 7-OH-MTX szintek



**49. ábra: A szérum 7-OH-MTX szintek klasszifikációs és regressziós fája
(Csordás K. PhD értekezés, 2014)**

A körök azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a 7-OH-MTX szinttel (246, 360, 486). A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok ábrázolják.

y= átlag 7-OH-MTX szint a 24., 36., 48. órában

A likvor MTX szinteket külön elemeztük. Az RF analízis során úgy tűnt, hogy az életkor és az rs4948502 összefüggést mutathat a likvor szintekkel. A CART és GLMM elemzéssel azonban egyik változóval sem tudtunk szignifikáns összefüggést kimutatni.

Toxicitás

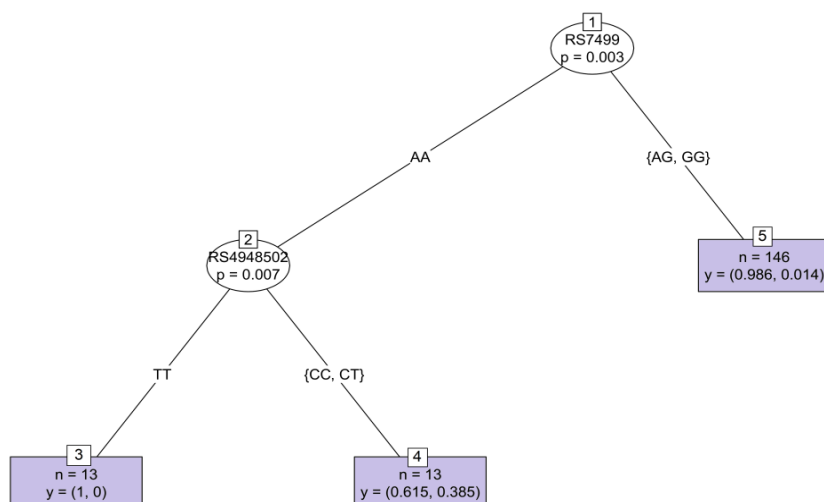
Az főbb toxicitási adatokat a 27. tábl.-ban foglaltuk össze.

Hepatotoxicitás n (%) (sebi, GrIII/IV) 1-7. napon	5 g/m ²	MTX kezelések száma	7/172 (4,1%)
	2 g/m ²	MTX kezelések száma	5/279 (1,8%)
Nefrotoxicitás n (%) (sekreát, GrI/IV) 1-7. napon	5 g/m ²	MTX kezelések száma	5/155 (3,2%)
	2 g/m ²	MTX kezelések száma	4/208 (1,9%)
Granulocitopénia n (%) (GrIII/IV) 1-7. napon	5 g/m ²	MTX kezelések száma	60/153 (39,2%)
	2 g/m ²	MTX kezelések száma	73/267 (27,3%)
Hipoproteinémia n (%) (<60 g/l) 7. napon	5 g/m ²	MTX kezelések száma	22/149 (14,8%)
	2 g/m ²	MTX kezelések száma	18/206 (8,7%)

27. tábl.: A farmakogenetikai paraméterekkel összefüggést mutató toxicitások előfordulása különböző dózisú MTX kezelések utáni első héten ALL-ben

A kezelés utáni első héten (1-7. nap) fellépő **hepatotoxicitást** jelző Sebi emelkedés (GrIII/IV) az RF analízis alapján a következő paraméterekkel mutatott összefüggést: MTX dózis, életkor, az rs3768142, rs11045819, rs7499, rs1544105, rs17328763, rs11045818, rs2853523, rs10106, rs4451422, rs745686, rs4948502, rs2276299 és az rs2853533. A CART számítások során az 5 g/m² MTX-ot kapott betegekben szignifikáns összefüggés mutatkozott a kialakult hepatotoxicitás és az rs7499 (*SLC19A1*, p=0,003) valamint az rs4948502 (*ARID5B*, p=0,007) között (50. ábra). Azokban az esetben (n=13), ha a beteg az rs7499 AA és az rs4948502 TT genotípussal rendelkezett, kórosan magas bilirubin szintet **nem** regisztráltunk (védő hatás?). Az egyéb hepatotoxicitási paraméterek (GPT, GGT) nem mutattak összefüggést a vizsgált változókkal.

HEPATOTOXICITÁS AZ 1-7. NAPON



50. ábra. A hepatotoxicitás klasszifikációs és regressziós fája

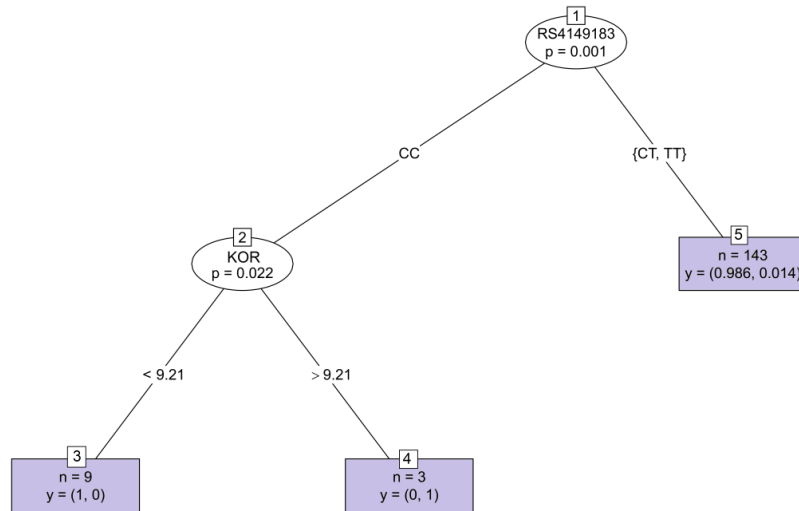
(Csordás K. PhD értekezés, 2014)

A körök azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak a kóros Sebi értékekkel. A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok ábrázolják.

y= annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás ill. a toxicitás gyakorisága

A MTX kezelések 1-7. napján kialakult **nefrotoxicitást** jelző szérumban kreatinin szintemelkedés (GrI/IV) az RF eredménye alapján csak a 36 órás MTX szérumszintekkel, és az rs4149183, rs1544105, rs1004474 és az rs3212713 genotípusokkal mutatott összefüggést. A CART elemzés a nagyobb MTX dózis esetén szignifikáns összefüggést mutatott az rs4149183 (*SLC22A8*) és a 7. napon fellépő nefrotoxicitás között (51. ábra). A CC genotípussal rendelkező betegekben szignifikánsan gyakrabban alakult ki nefrotoxicitás, mint a CT+TT genotípussal rendelkezőkben (25% vs 1%, $p=0,001$). A CART elemzés éles különbséget talált a betegek életkora és a kialakult vesetoxicitás között a CC genotípusú betegekben: 9,2 év felett a nefrotoxicitás előfordulása 100% volt, míg a fiatalabbakban vesetoxicitás nem fordult elő.

NEPHROTOXICITÁS A 7. NAPON



51. ábra. A nefrotoxicitás klasszifikációs és regressziós fája

(Csordás K PhD értekezés, 2014)

A körök azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak az emelkedett Kreat értékekkel. A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok ábrázolják.

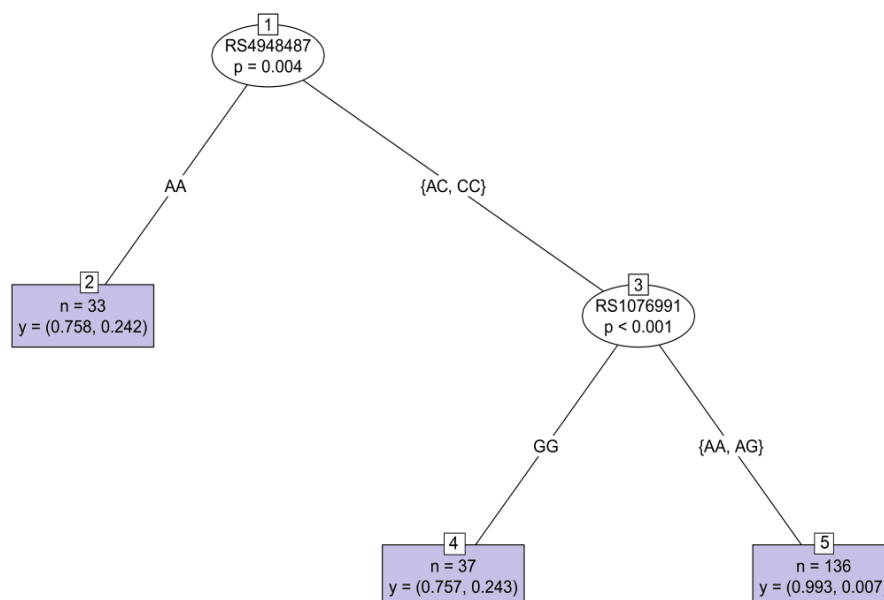
y= annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás, ill. a toxicitás gyakorisága

(Az általunk vizsgált, súlyos hepato- és nefrotoxicitás a betegek kis százalékában következett be (<5%), ezért a kis elemszámra való tekintettel, ezekben az esetekben általánosított lineáris kevert modelleket nem tudtuk alkalmazni.)

Az első héten (1-7. nap) megfigyelhető GrIII/IV **granulocitopénia** 5 g/m² adagnál 39,2 %-ban, míg 2 g/m² adagnál 27,3 %-ban fordult elő (p=ns). Az RF eredménye alapján a csontvelői károsodás a következő változókkal mutatott összefüggést: MTX dózis, rizikó besorolás, az rs1979277, rs2235013, rs9967368, rs10821936, rs4948502, rs4506592, rs7089424, rs1801394, rs1544105, rs4948496 és az rs3768142. A 2 g/m² MTX-ot kapott betegek csoportjában a CART és a GzLMM analízis is szignifikáns összefüggést mutatott a 7. napon regisztrált granulocytopénia és az rs3768142 (*MTR*) genotípus között (GG vs GT+TT: 56% vs 23%, OR: 5,92 95% CI: 2,03-17,27, p=0,001). Továbbá a granulocitopénia szignifikánsan gyakrabban fordult elő a 4. HD-MTX kezelést követően, mint az 1-3. kezelések után (OR: 3,48 95% CI: 1,40-8,64, p=0,007).

Az 1-7. napon fellépő **hipoproteinémia** (szérum öfeh szint <60 g/dl) 14,8 %-ban (5 g/m²) és 8,7 %-ban (2 g/m²) fordult elő (p=ns). A RF alapján a 36 órás 7-OH-MTX szérumszintekkel, a betegek rizikó besorolásával, és az rs4948687, rs1076991 SNP-kkel mutatott összefüggést. A CART elemzés során (52. ábra) szignifikáns összefüggés mutatkozott a kisebb MTX dózist kaptak csoportjában a 7. napon fellépő hipoproteinémia és az rs4948487 (*ARID5B*, p=0,004) valamint az rs1076991 (*MTHFD1*, p<0,001) között (15. ábra). Gyakrabban regisztráltunk hipoproteinémiát az rs4948487 AA genotípussal (24 % vs 4 %) és az rs1076991 GG genotípussal rendelkező (23 % vs 5 %) betegek esetén (2 g/m² MTX dózisok esetén). (A kis esetszámmra való tekintettel GLMM analízist itt sem végeztünk és így p-értékeket sem tudtunk meghatározni.)

HYPOPROTEINÉMIA A 7. NAPON



52. ábra. A hipoproteinémia klasszifikációs és regressziós fája
(Csordás K PhD értekezés, 2014)

A körök azokat a magyarázó változókat ábrázolják, amelyek szignifikáns összefüggést mutattak az alacsonyabb szérum öfeh szintekkel. A magyarázó változók egyes alcsoportjai a vonalak mentén láthatók. A célváltozó értékeit a téglalapok ábrázolják.

y= annak a gyakorisága, hogy nincs toxicitás ill. a toxicitás gyakorisága

V/3/2. Farmakogenetikai vizsgálatok gyermekkori OSC-ban

A vizsgált gének genotípusai a 28. tábl-ban láthatók.

Gén	Polimorfizmus	Allél (1/2)	Genotípus N 11 (%) ¹	Genotípus N 12 (%) ¹	Genotípus N 22 (%) ¹	MAF (%) ²	HWE ³
ABCB1	Rs1045642	C/T	16	23	15	49	1,18
ABCB1	Rs1128503	C/T	16	29	14	48	1,17
ABCB1	Rs9282564	A/G	31	10	0	12	0,79
ABCC1	rs4148358	G/A	32	11	2	17	0,65
ABCC1	rs246219	G/A	38	9	1	11	0,28
ABCC1	rs246221	A/G	25	17	5	29	0,64
ABCC1	rs12922588	A/G	20	23	9	39	0,28
ABCC1	rs215060	A/G	28	18	0	20	2,72
ABCC1	rs4148330	A/G	17	22	4	35	0,68
ABCC2	rs2273697	G/A	32	19	2	22	0,16
ABCC2	rs3740066	G/A	23	21	8	36	0,74
ABCC2	rs717620	G/A	28	13	1	18	0,13
ABCC3	rs4793665	T/C	17	30	9	43	0,49
ABCC3	rs2107441	A/G	16	23	6	39	0,26
ABCC3	rs2412333	G/A	23	24	4	31	0,44
ABCC3	rs733392	G/A	21	28	3	33	2,6
ABCC3	rs12602161	A/G	37	14	0	14	1,29
ABCC10	rs1214748	G/A	15	28	5	40	2,31
ABCC10	rs831314	A/G	37	13	2	16	0,38
ABCC10	rs1214752	G/A	19	18	8	38	1
ABCG2	rs2231142	C/A	39	13	0	13	1,06
GGH	rs3758149	C/T	20	28	7	38	0,34
SLC19A1	rs1051266	A/G	15	27	14	49	0,07
SXR	rs7643038	A/G	16	20	9	42	0,36
SXR	rs3814055	G/A	18	23	11	43	0,51
SXR	rs1054190	G/A	36	12	0	13	0,98
SXR	rs3732361	G/A	13	24	9	46	0,12
SXR	rs3814058	A/G	25	16	3	25	0,04
SXR	rs6785049	A/G	11	29	9	48	1,69

28. táblázat A MTX metabolizmusában fontos gének polimorfizmusai

¹ 11: az első allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a második allélra homozigóta

² MAF: Minor allélfrekvencia (%) ³ HWE: a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés (χ^2 -próba)

A GGH és SLC19A1 gének polimorfizmusai

Első lépésben a hagyományos (frekventista) statisztikai módszerekkel vizsgáltuk a genetikai alcsoportok és a MTX metabolizmus/toxicitás összefüggéseit. Összesen 62 beteg 571 MTX blokkjának adatait tudtuk elemezni. A következőkben a szignifikánsnak talált eltéréseket mutatjuk be első sorban.

Az *SLC19A1* 80AA genotípusú betegcsoportban alacsonyabb volt a 24 órás **MTX clearance**, mint az *SLC19A1* 80 G allélt hordozók körében ($p=0,04$) (53/A ábra). A *GGH*-401 C>T SNP estében nem találtunk szignifikáns különbséget a gén-variánsok és a MTX clearance között ($p=0,1$) (53/B ábra).

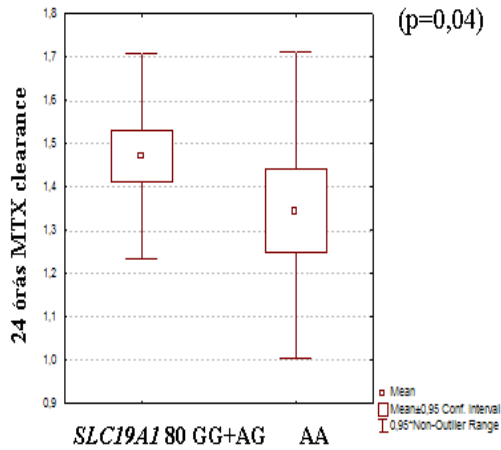
A 24 órás szérumszintekben szignifikáns különbségeket nem találtunk (nem közölt adatok).

Az *SLC19A1* 80G>A polimorfizmusok és a **48 órás MTX szintek** között sem találtunk szignifikáns különbséget ($p=0,53$) (53/C ábra). Ezzel ellentétben a 48 órás szérumszint értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a *GGH*-401 TT genotípusú betegeknél, mint a C allélt hordozó beteg csoportban ($p=0,016$) (53/D ábra).

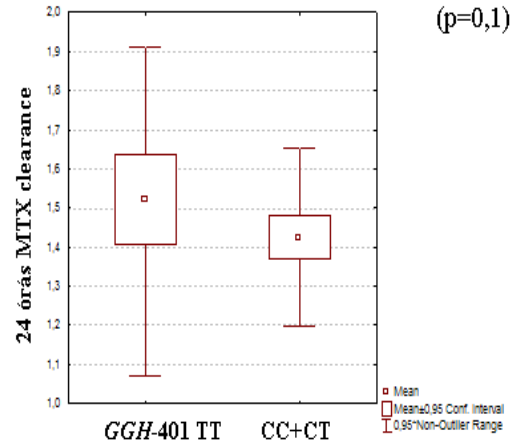
A súlyos akut **májkárosodás** (Gr III-IV) előfordulása ritkább volt a *GGH*-401TT csoportban, mint a C allélt hordozókban ($p=0,00061$) (54/A ábra), és gyakoribb az *SLC19A1* 80AA homozigóta betegeknél, mint a G allélt hordozóknál ($p=0,00245$) (54/B ábra). A különbség még kifejezettebb volt az *SLC19A1* 80AA és a *GGH*-401CC/CT kombinációja esetén ($p=0,00014$) (54/C ábra).

A **csontvelő károsodás** és **vesetoxicitás** nem mutatott összefüggést a genetikai változókkal (nem közölt adatok).

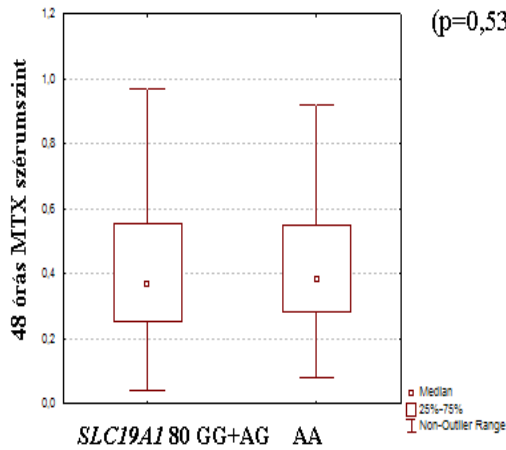
A) 24 órás MTX clearance *SLC19A1* 80 GG+AG vs AA (p=0,04)



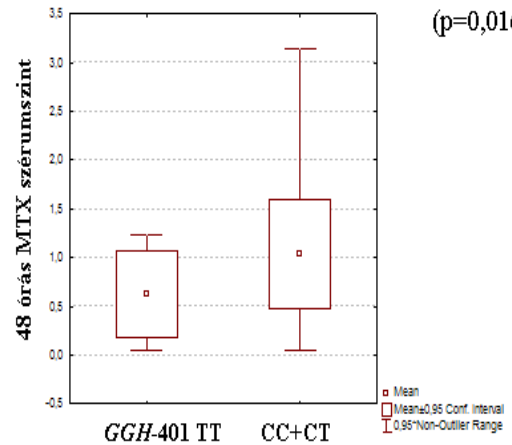
B) 24 órás MTX clearance *GGH-401* CC+CT vs TT (p=0,1)



C) 48 órás MTX szint *SLC19A1* 80 GG+AG vs AA (p=0,53)



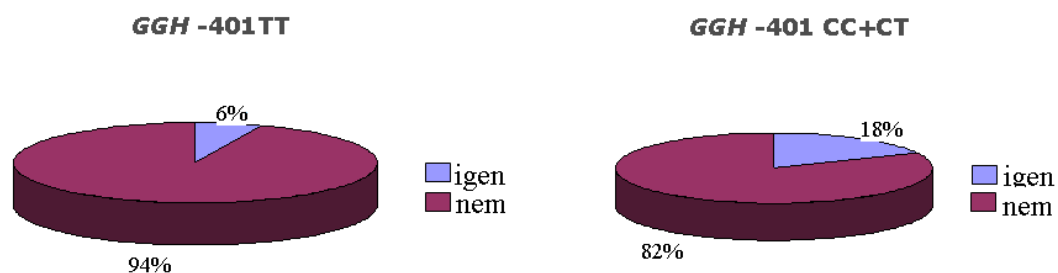
D) 48 órás MTX szint *GGH-401* CC+CT vs TT (p=0,016)



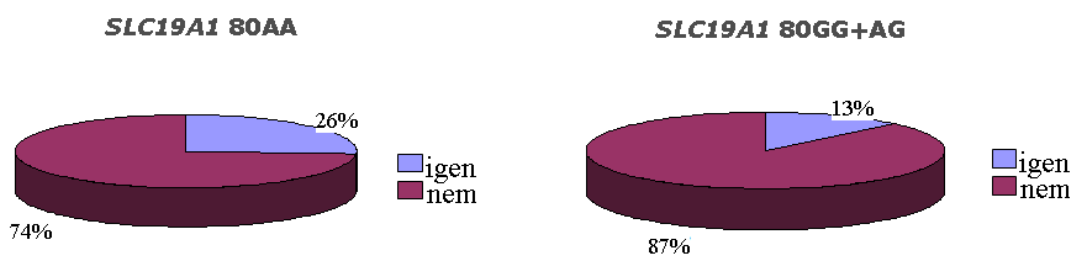
53. ábra A *GGH-401* C>T és az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmusok kapcsolata a MTX farmakokinetikai paramétereivel

- A: 24 órás MTX clearance az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmus mellett
- B: 24 órás MTX clearance a *GGH-401* C>T polimorfizmus mellett
- C: 48 órás MTX szérumszint az *SLC19A1* 80 A>G polimorfizmus mellett
- D: 48 órás MTX szérumszint az *GGH-401* C>T polimorfizmus mellett

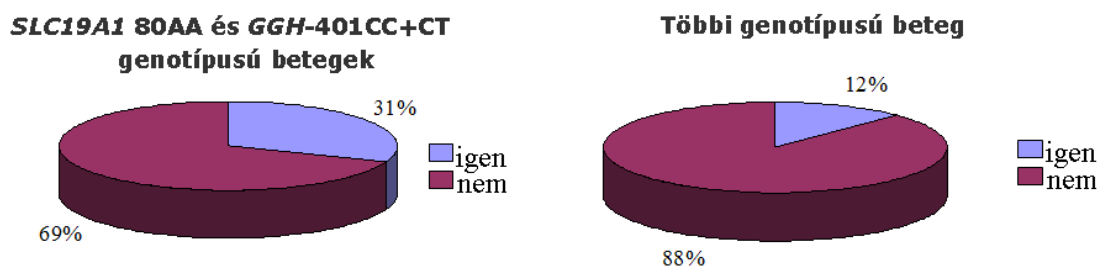
A) Hepatotoxicitás a GGH-401CC+CT és a GGH-401TT genotípusú betegekben ($p=0,00061$)



B) Hepatotoxicitás az SLC19A1 80GG+AG és az SLC19A1 80AA genotípusú betegekben ($p=0,0024$)



C) Hepatotoxicitás az SLC19A1 80AA és GGH-401CC/CT és a többi genotípusú betegekben ($p=0,00014$)



54. ábra A GGH-401 C>T és az SLC19A1 80 A>G polimorfizmusok kapcsolata a MTX májtoxicitásával

Bayes-i elemzés

A szűrés után a 12 gén 46 polimorfizmusából 9 gén összesen 29 polimorfizmusának hatását tudtuk vizsgálni a Bayes-i statisztikán alapuló módszerekkel. Kapcsolatokat kerestünk a MTX farmakokinetikai paraméterei, valamint az általa okozott toxicitások és a MTX hatásában szerepet játszó gének variánsai (SNP) között.

A kapott eredményeket az 27. táblázatban foglaltuk össze (csak a szignifikáns elváltozásokat tüntettük fel, a nyíl iránya a variáns allél által okozott növekedést vagy csökkenést mutatja).

Egyváltozós asszociációs vizsgálatunkban a MTX ürülés első fázisának **felezési idői** ($T_{a1/2}$) pozitív összefüggést mutattak az *ABCG2* rs2231142 (OR: 4,2, $p = 0,037$) ritka alléljának, valamint az *SXR* rs7643038 (OR: 2,6, $p = 0,02$) és rs3814055 (OR: 2,22, $p = 0,04$) SNP-k jelenlétével. Az *ABCB1* rs9282564 (OR: 8,8, $p = 0,02$) polimorfizmus jelenlétében a MTX **csúcskoncentrációk** magasabbak voltak. Az *SXR* rs3732361, rs6785049 SNP-k variáns alléljainak jelenléte szintén magasabb 48 órás MTX koncentrációkat eredményezett. Az *ABCB1* rs9282564 (OR: 4,2, $p = 0,04$) variáns allél jelenléte esetében magasabb, az *ABCC3* rs4793665 (OR: 0,24, $p = 0,03$) variáns allél, illetve az *ABCC2* rs3740066 homozigóta variáns genotípus (OR: 0,096, $p = 0,01$) esetében szignifikánsan alacsonyabb **AUC₀₋₄₈** értékeket mértünk. A **májtoxicitás** ritkábban fordult elő az *SXR* rs3732361, rs3814058, rs6785049 SNP ritka alléljainak jelenlétében. A **csontvelő károsító hatás** (alacsonyabb granulocitaszám) előfordulása gyakoribb volt az *ABCC2* rs2273697 (OR: 3,3, $p = 0,02$), és alacsonyabb az *ABCC2* rs3740066 (OR: 0,4, $p = 0,02$), az *SXR* rs3732361, rs3814058, rs6785049 SNP-k ritka alléljainak esetében. Az egyéb mielotoxicitásra jellemző paraméterek (anémia, trombopénia) és a nefrotoxicitás olyan ritkán fordultak elő, hogy az elemzésbe nem tudtuk ezen paramétereket belevenni.

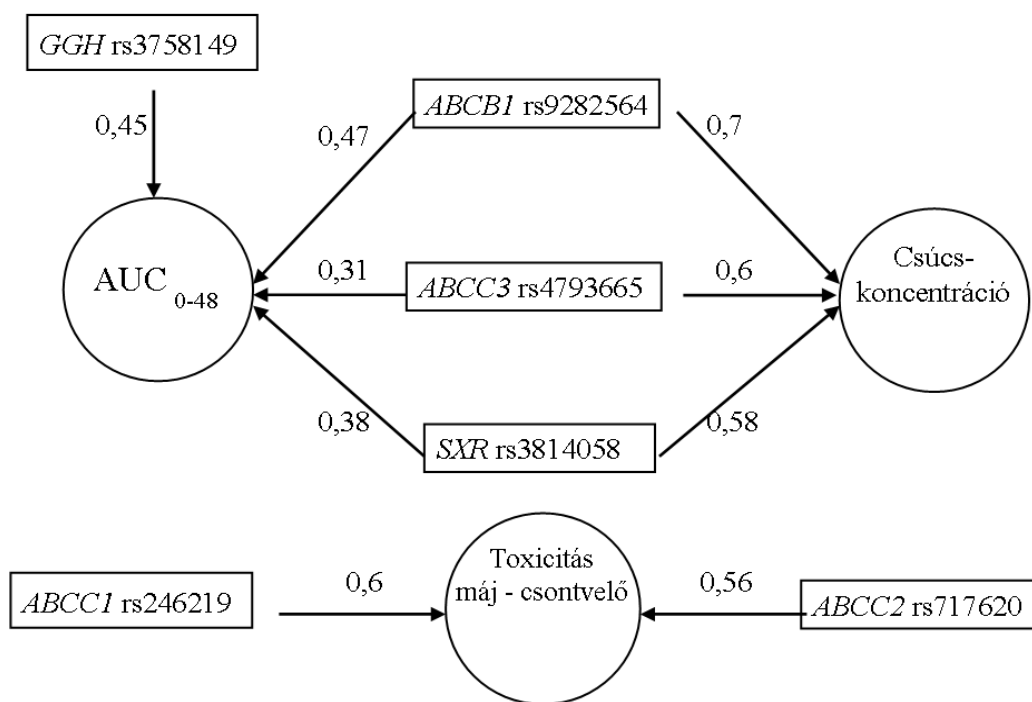
Ezt követően egyváltozós **BMLA** módszerrel elemeztük, hogy a 29 SNP milyen hatással van a farmakokinetikai tényezőkre és a toxicitásra.

Az *a posteriori* valószínűségeket a 55. ábrán mutatjuk be, ahol a nyíl irány jelzi, hogy melyik változó hat a másikra.

A **csúcskoncentrációt** nagy valószínűséggel befolyásolja az *ABCB1* rs9282564 (0,7), az *ABCC3* rs4793665 (0,6), *SXR* rs3814058 (0,58). A **görbe alatti területet** befolyásolhatja az *ABCB1* rs9282564 (0,47), *ABCC3* rs4793665 (0,31), *GGH* rs3758149 (0,45) és az *SXR* rs3814058 (0,38). A **májkárosodásra** az *ABCC1* rs246219 (0,6), míg a **csontvelő károsodására** az *ABCC2* rs717620 (0,56) polimorfizmus bír hatással.

Gén	Polimorfizmus	$T_{a1/2}$	AUC_{0-48}	Csúcs MTX	48h MTX	máj	Csontvelő
ABCB1	rs9282564	-	↑0,04	↑0,02	-	-	-
ABCC2	rs2273697	-	-	-	-	-	↑0,02
ABCC2	rs3740066	-	↓0,01	-	-	-	↓0,02
ABCG2	rs2231142	↑0,037	-	-	-	-	-
SXR	rs7643038	↑0,02	-	-	-	-	-
SXR	rs3814055	↑0,04	-	-	-	-	-
SXR	rs3732361	-	-	-	↑0,01	↓0,035	↓0,035
SXR	rs3814058	-	-	-	-	↓0,006	↓0,006
SXR	rs6785049	-	-	-	↑0,006	↓0,02	↓0,02

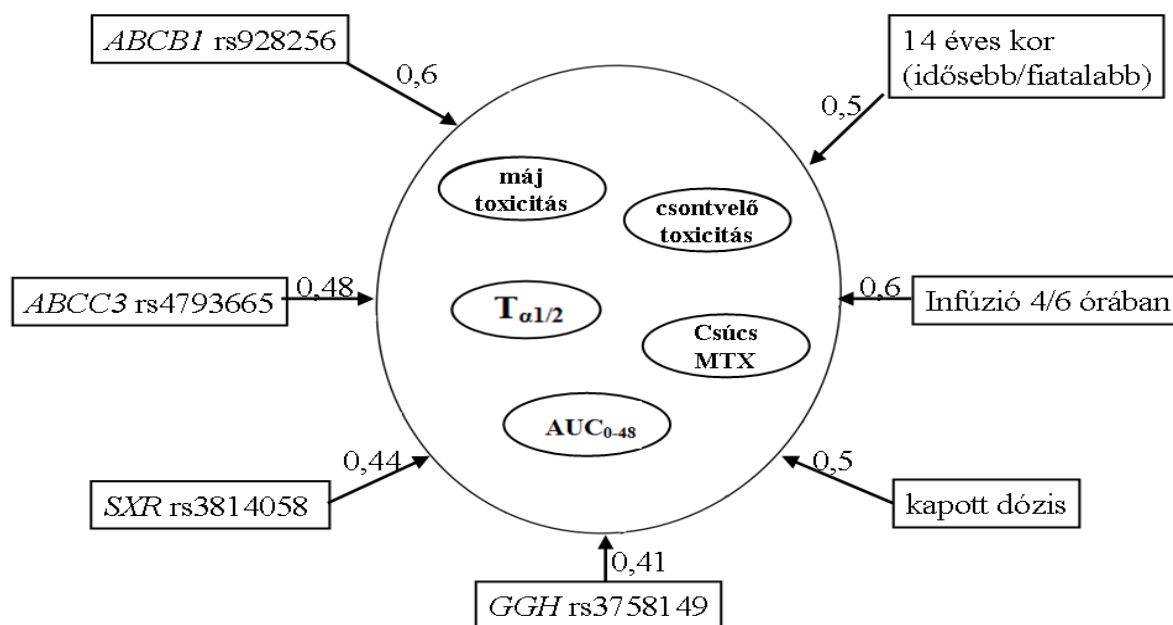
27. táblázat A MTX farmakokinetikáját befolyásoló, szignifikáns egyváltozós SNP-célváltozók „p” értékei (asszociációs vizsgálat)



- nyíl iránya meghatározza, hogy melyik változó hat melyikre
- nyílhoz tartozó szám: a két változó között az egyes éleket a modellek milyen valószínűséggel támasztják alá

55. ábra. A MTX farmakokinetikai és toxicitási paramétereit befolyásoló SNP-k különböző függőségi kapcsolatai (egy célváltozós BMLA elemzés)

A **több célváltozós BMLA** elemzésünkben a célváltozóhalmaz (MTX farmakokinetikai és toxicitási adatok) összes lehetséges kapcsolatrendszere és a magyarázó változók (életkor, nem, dózis, infúzió hossza és a 29 SNP) minden lehetséges kapcsolatrendszere mellett megvizsgáltuk, hogy mely változók relevánsak a célváltozók szempontjából (56. ábra). Az *ABCB1* rs928256 (0,6) SNP, melynek az egyváltozós elemzésben is kimutatható hatása volt a görbe alatti területre és a csúcskoncentrációra, a több célváltozós elemzésben is befolyásoló tényezőnek mutatkozott ezen paraméterekre. További hatásként kimutattuk az *ABCC3* rs4793665 (0,48) és a *GGH* rs3758149 (0,41) variánsok hatását a görbe alatti területre (hasonlóan az egyváltozós elemzésben kapott adatokhoz). Hatásosnak találtuk még az *SXR* rs3814058 (0,44) SNP-t, mely egyváltozós BMLA módszerrel a farmakokinetikai adatokkal, míg egyváltozós asszociációs módszerrel pedig a toxicitás megjelenésével mutatott összefüggést (56. ábra).



- nyíl iránya meghatározza, hogy melyik változó hat melyikre
- nyílhoz tartozó szám: a két változó között az egyes éleket a modellek milyen valószínűséggel támasztják alá

56. ábra A MTX farmakokinetikai és toxicitási paramétereit befolyásoló SNPk és egyéb magyarázó változók összefüggései (több célváltozós BMLA elemzés)

VI. Megbeszélés, következtetések

VI/1/1. Prognosztikai faktorok vizsgálata gyermekkori ALL-ben

A hagyományos prognosztikai faktorok elemzésén túl, egy egyszerű paraméter az abszolút limfocita szám (ALC) prognosztikai értékét vizsgáltuk első sorban gyermekkori ALL indukciós kezelése során. A kemoterápiás kezelés elején, különböző időpontokban mért ALC értékeket vizsgáltuk a betegek túlélésére, különböző ALC határértékek mellett.

Legfontosabb *megállapításunk*, hogy az ALC 33. napi értéke a gyermekkori ALL kifejezett prognosztikai faktora, mely a korábban ismert és a protokollok besorolásánál alkalmazott prognosztikai tényezőkhez (pl. életkor, genetika, terápiás válasz) hasonló erejű prediktív értékkel bír. Saját eredményeink alapján – az irodalomban megismert - legalacsonyabb limfocita értékek mutattak szignifikáns eltéréseket. A 350-500/ μ l ALC értékeknél kisebb vagy nagyobb limfocitaszámok szignifikáns összefüggést mutattak a túléléssel. Egy 2014-es görög tanulmány, a mienkkel gyakorlatilag megegyező BFM protokollal kezelt betegek esetén hasonló összefüggést talált (ALC 29. napi 350 sejt/ μ l értéke és a gyermekkori ALL OS között szignifikáns a kapcsolat) (Hatzipantelis *et al.*, 2014). Más határértékeket vizsgálva (1000/ μ l vagy 1500/ μ l) nem találtak összefüggést a túlélési mutatókkal. Mi is hasonló eredményt kaptunk: >500 sejt/ μ l határérték felett már nem volt szignifikáns az ALC és a mortalitás kapcsolata. Eredményeink szerint tehát 350 sejt/ μ l és 500 sejt/ μ l határértéknél a 33. napon mért ALC a gyermekkori ALL betegek teljes- és eseménymentes túlélésének szignifikáns prediktora.

Az irodalomban, az elmúlt 7-8 évből több közlemény is foglalkozott a témával. Egy texasi kutatócsoport (Rabin *et al.*, 2012) az 1500 sejt/ μ l feletti 29. napi ALC érték és a túlélés között talált szignifikáns összefüggést. Mások a 15. és 29 napon mért 1000 sejt/ μ l feletti ALC értéket találták szignifikánsnak a túlélésben (Gupta *et al.*, 2015). Egy japán kutatócsoport pedig a 29. napon mért 750 sejt/ μ l feletti ALC értéket találta szignifikánsnak (Hirase *et al.*, 2015).

Egy másik texasi kutatócsoport (De Angulo *et al.*, 2008) is azt találta, hogy gyermekekben szignifikáns összefüggés van az ALC és a betegek OS ill. EFS-e között: az indukciós terápia kezdete után bármely vizsgált időpontban (15., 21., 28. nap) mért 350 sejt/ μ l-nél magasabb érték jó terápiás választ jelzett előre mind az ALL-lel és AML-lel kezelt betegek esetében. A mi vizsgálatainkkal ellentétben, náluk különösen a 15. napi ALC bizonyult a túlélés

becsléséhez legjobb prognosztikai faktornak (87 % vs 55 %). A két texasi kutatócsoport által meghatározott különböző ALC határértékek háttérében a betegpopulációk és protokollok különbözősége lehet (idősebb betegek és sok aszparagináz) az alacsonyabb (350 sejt/ μ l) határértékű tanulmányban.

Egy kubai kutatócsoport (Anoceto Martinez *et al.*, 2012) tanulmányában hasonló eredményre jutott 1000 sejt/ μ l határértéket tekintve. Univariáns analízis során az 1000 sejt/ μ l-nél mért magasabb 15. és 28. napi ALC szignifikáns összefüggést mutatott a betegek túlélésével (86 % vs 66 %), míg a multivariáns analízis során csak a 15. napi ALC bizonyult szignifikáns faktornak.

Egy kínai munkacsoport (Shen *et al.*, 2013) is hasonló eredményekre jutott gyermek betegek esetében. A 22. napi ALC, mint folyamatos változó mutatott összefüggést a túléléssel.

Egy jordán kutatócsoport (Alkayed *et al.*, 2012) viszont nem talált összefüggést az ALC, mint folyamatos változó vagy az 1500 sejt/ μ l határértékkel, mint nominális változó és a túlélési eredmények között.

Egy memphisi kutatócsoport (Rubnitz *et al.*, 2013) közel 400 ALL-lel kezelt gyermek adatait elemezte egy 2013-as tanulmányában. Az 500 sejt/ μ l feletti ALC értékek szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a 10 év alatti korcsoportban, az indukciós terápia végén negatív MRD-vel rendelkező betegeknél ill. pre-B ALL esetében. Egy gyenge, de szignifikáns összefüggést találtak az OS és az ALC értéke között (EFS tekintetében a különbség már nem volt szignifikáns). Az MRD negatív betegekben az OS szignifikánsan jobb volt >500 sejt/ μ l ALC érték esetén (97 % vs 84 %). Az MRD pozitív gyermekekben az ALC nem volt kapcsolatba hozható a túléléssel.

Saját vizsgálataink alapján is megállapítható, hogy a rosszabb túlélést, fokozott relapsus rizikót jelentő alacsony ALC33 értékek elsősorban 10 évnél idősebb életkorban, a közepes vagy magas rizikóval bíró betegek esetén fordulnak elő. Fontos megállapítás, hogy a MR betegek nagy csoportjában (ahol egyébként abszolút értékben a legtöbb relapszus jelentkezik), meg lehetett különböztetni az ALC33 értékek alapján egy alacsonyabb és egy magasabb kockázatú csoportot, melyekben a túlélési adatok szignifikánsan különböztek. A HR betegek esetében is megfigyelhető volt egy tendencia, viszont - valószínűleg a kis esetszám miatt - itt a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

További eredményként elmondhatjuk, a 33. napon MRD negatív (flow) betegek esetében elkülöníthető egy rossz prognózisú betegcsoport, ahol az ALC érték is alacsony. Az MRD pozitív betegcsoportban egyelőre statisztikailag szignifikáns összefüggéseket nekünk nem

sikerült kimutatnunk, de további vizsgálatokkal és nagyobb esetszámmal talán fontos következtetéseket tudunk majd levonni a jövőben.

Az irodalomban találunk arra vonatkozó adatokat, hogy a különböző MRD státuszú betegekben az ALC-nek prognosztikai szerepe lehet. Rabin és munkatársai vizsgálata szerint (Rabin *et al.*, 2012) az MRD pozitív és negatív betegek esetén is lényegesen rosszabb a túlélés alacsony ALC esetén (29. napon). Az MRD negatív betegek csoportjában (ALC határérték 1500sejt/ μ l) az OS 81 % és 98 % volt, míg MRD pozitív betegeknél 41 % vs 92 %. Egy másik tanulmányban ezzel szemben csak MRD negatív betegeknél volt az ALC-nek prognosztikai jelentősége (Rubnitz *et al.*, 2013).

A kezelés során bekövetkező késések túlélésre gyakorolt hatása vizsgálatunkban gyengének bizonyult. A 33. napi kezelés 5 nap feletti és a 64. napi terápia 8 napnál hosszabb késése esetén a magas rizikójú betegek körében ugyan meg lehetett különböztetni egy rosszabb teljes túléléssel bíró betegcsoportot, ám ez az eseménymentes túlélést nem befolyásolta. Továbbá nem lehet meghatározni, hogy a késés önmagában összefüggésben áll-e a magasabb mortalitással, vagy az valamely más tényező (mely a késedelmet is okozza) hatására következik be. Minden esetre az irodalomban találunk arra utalásokat, hogy a kezdeti intenzív terápia elnyújtása kedvezőtlenül befolyásolhatja a túlélést (Pillon *et al.*, 2015). A végső következtetések levonásához további – nagy számú beteg adatainak elemzésén alapuló – adatok szükségesek.

A többi, ma már klasszikusnak számító prognosztikus tényező, a nemzetközi adatokhoz hasonlóan, saját vizsgálatainkban is igazolta szerepét. Az életkor, az immunfenotípus, a rizikó besorolás a túlélés erős prediktorainak bizonyultak. Ugyanakkor más hagyományos prognosztikai elemek, mint a kezdeti fvs.szám és a 8. napi prednizolon válasz a vizsgált betegekben nem mutattak szignifikáns összefüggést a túléléssel. Ennek döntően az lehet az oka, hogy ezek a tényezők a protokoll besorolási faktorai és ezáltal a különböző betegcsoportok különböző intenzitású kezelést is kapnak. A terápiás protolloknak éppen az a célja, hogy a korábban bizonyítottan rosszabb prognózisú betegek kezelésének intenzifikálásával a gyógyulási eredmények javuljanak. Valószínűleg a kezdeti fvs.szám és a 8. napi szteroid válasz vonatkozásában tudtunk az elmúlt években eredményeket elérni, ennek köszönhetőek a jobb túlélési adatok.

Vizsgáltuk a viszonylag új módszereknek számító MRD eredményeket is. Saját adataink alapján is a 15. és 33. napi FC-MRD szoros kapcsolatot mutatott a túléléssel. A PCR-MRD

csak a 33. napon volt szignifikáns változó, de ezen időpontban a legerősebb faktornak bizonyult a terápiás hatás szempontjából. Talán elmondható, hogy az áramlási citometria korábban (már a 15. napon) jelzi a terápiás választ és a prognózist, viszont a PCR talán pontosabb és megbízhatóbb a 33. napon vizsgálva, vagyis a két eljárás jól kiegészíti egymást. Megjegyzendő, hogy még a molekuláris biológia korában is, a hagyományos fénymikroszkópos MRD meghatározás minden időpontban szignifikáns prognosztikai tényezőnek mutatkozott.

A rizikóbecslés során alkalmazott változók közvetve vagy közvetlenül a daganatos sejtek biológiai tulajdonságaival vagy farmakológiai érzékenységevel kapcsolatosak. Az abszolút limfocita szám pedig a betegek immunrendszerének és immunfunkcióinak indikátorai. A magasabb ALC értékek hasznos védekező szerepet játszhatnak a különböző daganatok elleni küzdelemben, és utal a limfociták általános daganattellenes funkciójára. Másrészt pl. az ALL indukciós kezelés alatt és után mért alacsonyabb ALC értékek utalhatnak a csontvelő csökkent regenerációs képességére, a tumorsejtek inváziójára is. Számos adat van a nemzetközi irodalomban, ami felnőtt betegek vagy transzplantáltak esetén emeli ki a limfociták regenerációjának, számának szerepét a túlélésben (Siddiqui *et al.*, 2006) (Porrata *et al.*, 2002) (Ishaqi *et al.*, 2008) (Tedeschi *et al.*, 2011) (Sun *et al.*, 2012).

A gyermekkori ALL-lel kapcsolatos ismereteink bővülése, a betegség biológiájának, prognosztikai tényezőinek és kezelési módjainak egyre jobb megismerése lehetővé teszi a terápia individualizálását, az egyéni igényeknek és érzékenységeknek leginkább megfelelő terápia megválasztását. Bár ma már a gyermekkori daganatos betegek több mint 70 %-a tartós túlélő, sőt hematológiai malignitásokban a túlélés már 80-90 %, továbbra is törekednünk kell ismereteink folyamatos bővítésére.

Az abszolút limfocita szám egy egyszerű, olcsó és könnyen hozzáférhető vizsgálat és egy új prognosztikai marker. Retrospektív analízisünkben a gyermekkori ALL jó prognosztikai értékkel bíró változójának bizonyult, főleg a kezelés 33. napján vizsgálva. Eredményeinket *összefoglalva* megállapítható, hogy az ALC33 értéke alapján lehetőség nyílt egy különösen jó, a teljes populáció kumulált túlélését megközelítő, és egy rendkívül rossz, a HR betegeknél is alacsonyabb prognózissal bíró csoport elkülönítésére, főleg a tíz évnél idősebb betegek között. Elképzelhető, hogy a jövőben az ALC értékek alapján a rizikó besorolások tovább pontosíthatók, a kezelések tovább finomíthatók, és így könnyebben meg lehet majd találni azon betegeket, akik intenzívebb kemoterápiás kezelésre szorulnak. Másrészt, természetesen, elkülöníthetők nagyon jó prognózisú betegek, akiknél a kezelések intenzitása

és így a mellékhatások előfordulása csökkenthető. Mindezek az adatok hozzájárulhatnak a gyermekek jobb túléléséhez és a gyógyultak jobb életminőségéhez.

VI/1/2. Prognosztikai faktorok vizsgálata gyermekkori OSC-ban

Saját adatainkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy ma Magyarországon az oszteoszarkómás betegek kétharmada tartósan meggyógyítható intenzív kemoterápia és radikális műtét segítségével. Az esetek nagy részében az érintett végtag is megtartható, és így a betegek életminőségében jelentős javulást lehet elérni. Nagyon rossz azon betegek prognózisa, akiknél primeren tüdő metasztázis vagy multiplex csont áttét igazolható, illetve akiknél a radikális tumor eltávolítás nem kivitelezhető. Nincs szignifikáns különbség a túlélésben a nem, a szövettani altípus, a diagnózis felállításának ideje, az alkalmazott protokoll, illetve a műtét típusa szerint, bár a végtagmegtartó műtétek esetében valamivel magasabb a lokális recidíva aránya. Ugyanakkor a 14 év alatti, áttét nélküli, végtagi elhelyezkedésű OSC betegek túlélése eléri a 80%-ot. A magyarországi eredmények megegyeznek a legjobb nemzetközi adatokkal (Jaffe, 2009) (Bramer *et al.*, 2009).

A kezdeti **tumor volumen** egy fontos prognosztikai tényező oszteoszarkómában. Sajnos, saját adataink nagyon hiányosak voltak e tekintetben (kórlapok károsodása, hiányzó dokumentumok), így mi nem tudtuk kiértékelni ezt a paramétert. Ugyanakkor a nemzetközi irodalomban számos adat ismert arra vonatkozólag, hogy nagyobb daganat esetén a radikális műtét nehezebb, a lágyszövet érintettség kifejezettebb, a távoli metasztázis esélye nagyobb, így a túlélés rosszabb (Bacci *et al.*, 2006a) (Rodriguez-Galindo *et al.*, 2007) (Xing *et al.*, 2014).

A következő fontos rizikófaktor az **áttétek** megléte a diagnóziskor vagy megjelenésük recidíva kapcsán. Az osteosarcomás betegek 30–40 %-ában van metasztázis, melyeknek 80%-a a tüdőre lokalizálódik, a többi pedig távoli csont vagy nyirokcsomó áttét (Bielack2008). Eredményeink azt mutatják, hogy a diagnóziskor áttétet nem mutató betegek túlélése 80 % . A korai, már a diagnózis vagy a recidíva idején meglévő áttétek esetén a túlélés nagyon rossz kb. 20 % (3/15 beteg él), míg a később kialakuló metasztázisok esetén a túlélés jobb 42 % (5/13 beteg él).

Az irodalmi adatok szerint a metasztázis vagy lokális recidíva jelenléte kb. háromszorosára emeli a halálozás esélyét, míg kb. ötszörösére egy újabb metasztázis kialakulásának esélyét

(Pakos *et al.*, 2009). Tüdő metasztázisok esetén a torakotómiás metasztazektómia javasolt, esetleg kiegészítő kemoterápiával, így az átlagos túlélés kb. 30 % (Briccoli *et al.*, 2005) (Bacci *et al.*, 2000).

A törzsi **lokalizációjú** daganatok prognózisa sokkal rosszabb, mint a végtagi tumoroké. Ennek oka, hogy a törzsön lokalizált tumorokat általában nem lehet kellő radikalitással megoperálni. Radikális műtét nélkül, csak kemoterápiával, a betegeknek mindössze kb. 10%-a gyógyul meg (Bielack *et al.*, 2002) (Jaffe *et al.*, 2002). A mi betegeinkben a törzsre lokalizált daganatok esetén az EFS 22 %-os volt.

A radikális **tumoreltávolítás** talán a legfontosabb prognosztikai faktor OSC-ban (és egyéb lágyrész daganatokban is) (Grimer *et al.*, 2005). Az elmúlt évtizedekben az amputációt felváltották a különböző végtagmegtartó műtétek. Leginkább az endoprotézisek terjedtek el, van már a gyermek növekedését követő ún. „növekedési protézis” is. Ezen kívül egyéb csontpótló módszerek (pl. saját fibula beültetés, csontbankból származó csont vagy artrodézis) is léteznek. A lokális relapszus aránya a végtagmegtartó műtétek után magasabb (5-10 %), mint amputáció után (1-2 %), a halálozásban azonban nincs jelentős különbség (Rozeman *et al.*, 2006). Ez a mi betegeinkben is megfigyelhető volt. A végtagmegtartó műtétekkel a túlélés még kicsit jobb is volt, mint amputációkor. Ez annak tudható be, hogy ma már kb. 85 %-os a végtagmegtartó műtétek aránya, és amputációra csak rossz prognózisú, igen nagy kiterjedésű daganatok esetén kerül sor. A lokális recidivák aránya a mi betegeinkben egyébként 14 % volt. Ezen betegeink túlélése csak kb. 20 % (5/23 beteg él). A nemzetközi adatok szerint is lokális recidák esetén a túlélés rossz (Takeuchi *et al.*, 2014), mindössze 10-30 %-os túlélésről számolnak be. A lokális kiújulás esetén döntő a radikális sebészi kimetszés, a kemoterápiának már csak marginális szerepe van. Természetesen itt is különösen rossz a nagy lokális recidivák (>5 cm) és az áttétes betegek túlélése (10 % vs 30 %) (Grimer *et al.*, 2005).

A **neoadjuváns kemoterápiára** adott szövettani válasz a nemzetközi adatok nagy része alapján jól korrelál a recidíva vagy áttét megjelenésének rizikójával és a túléléssel (Pakos *et al.*, 2009) (Lewis *et al.*, 2007). Nálunk a kezelésre jól reagáló betegcsoport 5 éves OS-e 84%, EFS-e 77,3% volt, míg a rosszul reagálók OS-e csak 55,3% , EFS-e csak 50% volt.

Bár nem minden tanulmány tartja a kemoterápiára adott választ minden beteg esetén fontos prognosztikai faktornak (Xing *et al.*, 2014), a most zajló klinikai tanulmányok továbbra is besorolási tényezőnek tekintik a neoadjuváns kezelésre adott tumorválaszt.

A nemzetközi irodalom nem egyértelmű abban a kérdésben, hogy az **életkor** a diagnóziskor fontos prognosztikai faktor-e oszteosarkóma esetén.

Mi azt találtuk, hogy szignifikánsan jobb az 5 éves eseménymentes túlélés a 14 évesnél fiatalabb betegcsoportban, mint a 14 éves és annál idősebb betegek között (74 % vs 48 %). Hasonló eredményeket közölt a német és az amerikai munkacsoport is, de ők a felnőtt (idősebb) betegekben számoltak be rosszabb túlélésről (40 éves kor alatt jobb túlélés, (Harting *et al.*, 2010) (Bielack *et al.*, 2002). A magyar munkacsoport korábban a 30 éves kor alatti betegekben mutatott ki jobb túlélést (Szendroi *et al.*, 2000). Pakos és munkatársai azt találták, hogy élet-évtizedenként 7%-ot nő a halálozás relatív rizikója (Pakos *et al.*, 2009). Ezzel szemben jelentek meg olyan tanulmányok is, melyekben a fiatalabb (14 év alatt) betegek gyógyulási eredményei voltak rosszabbak (Sugalski *et al.*, 2014) (Bacci *et al.*, 2006a)

VI/2. Farmakokinetikai vizsgálatok

A gyermekkori daganatos betegségek (így az ALL és OSC esetében is) az egyre intenzívebb terápiás protolloknak köszönhetően a túlélési eredmények is javulnak. Ugyanakkor nagyon súlyos, akár életet veszélyeztető vagy maradandó károsodásokat okozó toxicitással is számolni kell. Különösen igaz ez a HD-MTX kezelésekre, melyeket gyermekkorban grammos nagyságrendben ($2-12 \text{ g/m}^2$) alkalmazunk. Ismert, hogy a HD-MTX kezelések igen nagy intra- és interindividuális különbségeket mutatnak (Holmboe *et al.*, 2012) (Schmiegelow, 2009) (Jönsson *et al.*, 2007) (Xu *et al.*, 2007), és mind a mai napig nem teljesen tisztázott, hogy milyen betegségben, milyen betegeknek pontosan mennyit és milyen módon kell alkalmazni. Az alkalmazott kezelések monitorizálása, a toxicitások előre jelzése, a gyógyszerszintek és metabolitok követése is intenzív vizsgálatok tárgya.

VI/2/1. MTX farmakokinetikai elemzések gyermekkori ALL-ben

A farmakokinetikai vizsgálatok elengedhetetlenek a nagy dózisu kemoterápiás protollok, így például a MTX alkalmazásához. A klinikai gyakorlatban alkalmazott HD-MTX infúziók során a MTX dózisa tág határok között változik a világban ($2-33,6 \text{ g/m}^2$) (Groninger *et al.*, 2004). A különböző protollok hatékonyságát (köztük a BFM protollokét) rendszeresen vizsgálják annak érdekében, hogy az optimális MTX dózist meghatározhassák.

Saját vizsgálataink során kimutattuk, hogy az intenzív hidrálásnak nagy jelentősége van a HD-MTX kezelések vesetoxicitásának (fehérjeürítés) csökkentésében mind ALL-ben mind OSC-ban. Hasonló eredményre jutottak japán szerzők is, akik a nem megfelelő hidrálást összefüggésbe tudták hozni a vesefunkció károsodással és az emelkedettebb szérumszintekkel gyermekkori ALL-ben (Yanagimachi *et al.*, 2013).

A MTX farmakokinetikájára és toxicitására vonatkozóan számos vizsgálatot végeztünk.

Megállapítottuk, – a nemzetközi eredmények túlnyomó többségével összhangban –, hogy gyermekkori ALL-ben az 5 g/m² dózisú kezeléseket követően a szérumszintek magasabbak és az optimális terápiás szintet megbízhatóbban el lehet érni, mint a 2 g/m² esetén (76 vs 32 %). Ugyanakkor valamivel több reverzibilis toxicitást (főleg májenzim és bilirubin szint emelkedés) is detektáltunk a nagyobb MTX adagok mellett. Ezen eredmények összhangban vannak az elvárattal (nagyobb gyógyszeradag, magasabb gyógyszer-szint és több hatás ill. mellékhatás), és az irodalmi adatok többségével (Xu *et al.*, 2007) (Joannon *et al.*, 2004) (Schmiegelow, 2009). A nagyobb gyógyszeradagok sem járnak azonban feltétlenül kifejezettebb toxicitással egyes tanulmányokban, hasonlóan a mi eredményeinkhez. Általában a kiürülés sebessége nem függ az alkalmazott dózistól, de vannak olyan korábbi eredmények (Evans 1986), hogy ALL-es gyermekekben a MTX ürülése az alkalmazott dózistól függőnek mutatkozott. Az 1 g/m² alatti adagoknál gyorsabb volt a kiürülés mint a több grammos gyógyszerdózisoknál, aminek hátterében a vesében történő tubuláris szekréció telítődése állhat nagyobb gyógyszeradagok esetén (Groninger *et al.*, 2004).

A nagyobb gyógyszeradagoknál több toxikus 48 órás MTX szintet figyelhattunk meg (33,2 vs 12,6 %), ami nyilván összefügg a toxicitások kissé magasabb arányával, amint az az irodalomban is ismert (Schmiegelow, 2009) (Plard *et al.*, 2007). A gyógyszer hatékonyságát és mellékhatásait egyébként az alkalmazott dózis mellett a beadás módja is alapvetően meghatározza. A BFM munkacsoport adatai alapján B-sejtes limfómás/leukémiás gyermekekben a 4 órás 1 g/m² MTX infúzió ugyanolyan hatékonyság mellett kevesebb toxicitással járt, mint a 24 órás infúzió. Ugyanakkor az előrehaladott stádiumú, nagy rizikójú betegek esetében 5 g/m²-es adagra és 24 órás infúzióra volt szükség a maximális terápiás hatáshoz és a jobb túléléshez (szignifikánsan több toxicitás mellett) (Woessmann *et al.*, 2005).

Saját vizsgálatainkban a betegek egy részében módunk volt a MTX legfőbb bomlástermékének a **7-OH-MTX** szintnek a mérésére is. A metabolit esetében is hasonló adatokat kaptunk, mint a szérumszintek esetén, vagyis a nagyobb gyógyszeradagoknál magasabb szinteket mértünk.

A **likvor** MTX szintek is nagy egyéni és egyének közötti változatosságot mutatnak és nem teljesen egyértelmű, hogy milyen gyógyszerszintek szükségesek az optimális terápiás hatáshoz (meningeális recidiva kivédése).

Saját klinikai gyakorlatunkban a HD-MTX kezeléshez tartozó intratekális gyógyszeradás a HD-MTX 24 órás infúzió végén történik. Így van lehetőségünk arra, hogy a központi idegrendszerben is meghatározzuk, hogy a vénásan beadott MTX-ból mennyi jut be a liquorba és milyen MTX szinteket mérhetünk a központi idegrendszerben. Az 5 g/m²-es kezeléseket követően szignifikánsan magasabb likvor MTX szinteket mértünk, mint a 2 g/m² dózisos kezeléseket után. Az 5 g/m² MTX adagok esetén a kezelések döntő részében (72 %) el lehetett érni a terápiásnak (citotoxikusnak) tekintett 1 µmol/l koncentrációt a likvorban a HD-MTX kezelés 24. órájában, ezzel szemben a 2 g/m² dózisos kezeléseket mellett csak alig több, mint 26 %-ban értük el ezt az értéket. Az irodalomban is találunk hasonló eredményeket (Wysocki *et al.*, 1992) (Jonsson *et al.*, 2007). Az irodalmi adatok alapján, továbbá, a likvor MTX szintek általában szintén szoros összefüggést mutatnak a MTX szérumszintekkel és az AUC-val (Borsi *et al.*, 1987) (Seidel *et al.*, 2000). Mások nem találtak ilyen összefüggést korábbi vizsgálataikban (Lippens *et al.*, 1988; Milano *et al.*, 1990). A legújabb vizsgálati eredmények agytumoros betegekben azt találták, hogy a központi idegrendszeri aktív betegség befolyásolja a likvor MTX szintet (nagyobb MTX likvor szintek központi idegrendszeri érintettségénél) (Shkalim Zemer *et al.*, 2016).

A mi adataink alapján a 24 órás szérum és likvor MTX szintek szignifikáns korrelációt mutattak. Vizsgálatainkban arra is kerestük a választ, hogy a központi idegrendszerbe történő penetráció aránya függ-e az alkalmazott MTX dózistól. Az általunk vizsgált két csoportban (5 g/m² és 2 g/m²) ez az arány közel azonos volt (2,3% vs 2,8%), vagyis a likvorba történő bejutási aránya a MTX-nak az alkalmazott dózistól függetlennek bizonyult. Az irodalmi adatok alapján a szérumból likvorba történő MTX penetráció aránya körülbelül 1-3% között változik MTX dózistól és az alkalmazott mérési módszertől függően (Lippens *et al.*, 1988) (Milano *et al.*, 1990; Seidel *et al.*, 2000; Jonsson *et al.*, 2007).

Amennyiben összességében értékeljük saját adatainkat, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy kisebb MTX adagoknál ugyanolyan arányban kerül be a gyógyszer a központi idegrendszerbe, vagyis kisebb szérumszintek és alacsonyabb likvorszintek várhatók a 2 g/m² MTX adag mellett és az optimálisnak gondolt gyógyszerszintek nem minden esetben érhetők el. Természetesen nagy betegpopuláción végzett további elemzések szükségesek, hogy a kisebb MTX adag elegendő-e a maximális terápiás hatás érvényesítéséhez. Jelenleg zajlik egy nagy nemzetközi tanulmány (Magyarország vezetésével), ahol több ezres leukémiás

betegpopulációban, randomizált módon próbáljuk ezt a kérdést (is) megválaszolni (BFM-ALLIC-2009 tanulmány).

A HD-MTX kezeléseket követően **toxikus** hatásokkal is számolni kell. Munkánk során elemeztük a főbb toxicitási paraméterek és a szérumszintek összefüggéseit is. **Csontvelői károsodást** a kezelést követő első 2 napban alacsony arányban találtunk mindkét dózis esetén és nem tudtunk kimutatni szignifikáns eltéréseket sem a két különböző gyógyszeradag között, sem a szérumszintekkel összefüggésben. Viszont egy hét elteltével az 5 g/m² adagot kapott betegek esetén nagyobb arányban észleltünk GrIII/IV mielotoxicitást (granulopénia) (37 vs 15 %). Az irodalmi adatok szerint a HD-MTX kezelés leukovorin rescue-val általában csak enyhe csontvelő-toxicitást okoz, de trombopénia és/vagy leukopénia alakulhat ki (10-30 %). Mindhárom sejtvonal érintettsége (anémiával) ritka és általában 1 hét-10 nap után alakul ki (Saravana *et al.*, 2003) (Yoon *et al.*, 2001) (Levinsen *et al.*, 2015). A legújabb irodalmi adatok alapján a kezelés elindítása előtti szérumszinteknek is lehet jelentősége a MTX hematológiai toxicitásában (Roy Moulik *et al.*, 2015). Több citopéniát találtak alacsonyabb kezdeti folsav szintek mellett. Súlyos orális mukozitist mi csak alacsony számban találtunk, és az adataink nem voltak egyértelműek, így az elemzésből kihagytuk ezt a fajta toxicitást. Az irodalmi adatok szerint a súlyos (GrIII, IV) mukozitis kb. 5-10 %-ban fordul elő (Lima *et al.*, 2014b) (Tsukada *et al.*, 2013) (Buitenkamp *et al.*, 2010).

Ugyanakkor mind a két csoportban megfigyelhető volt a **transzamináz enzimek** (főleg GPT) és a szérumbilirubin emelkedése a HD-MTX kezelés utáni napokban (első héten). Az irodalmi adatok alapján enyhe, reverzibilis májkárosodás gyakran előfordul MTX kezeléseket után, de ez általában nem vezet krónikus májbetegséghez (fibrózis, cirózis) (Holmboe *et al.*, 2012) (Wiela-Hojenska *et al.*, 2001) (Schmiegelow, 2009). A patomechanizmus hátterében a máj metabolikus enzimeinek és oxidáz rendszereinek gátlása állhat. Hasonlóan az OSC gyermekek esetén kapott eredményekhez, ahol összefüggéseket találtunk a MTX szérumszintek és clearance valamint a hepatotoxicitás között, jelen vizsgálatunkban, ALL-s betegekben is, a hepatotoxicitás szignifikáns asszociációt mutatott az AUC_{MTX} értékével a 2 g/m² MTX-ot kapott betegek között. Ugyanezen összefüggés nem volt szignifikánsan kimutatható az 5 g/m²-t kapó betegek között, ami talán az eredmények viszonylag nagy szórásának tulajdonítható. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy az 5 g/m² adagot kapott betegeknél szignifikánsan több esetben fordult elő releváns májkárosodás, mint a 2 g/m²-t kapottak között.

Vannak olyan irodalmi közlések, melyek alapján a 7-OH-MTX szorosabb összefüggést mutat a májtoxicitással (szérumszulfotranszamináz emelkedés), mint a MTX szint (Holmboe *et al.*, 2012). Jelen munkánkban mi nem találtunk szignifikáns korrelációt a májtoxicitási paraméterek és a 7-OH-MTX szintek között.

Ugyanakkor jelen vizsgálatainkban szignifikáns összefüggéseket tudtunk kimutatni a szérumszulfotranszamináz **7-OH-MTX**, az AUC_{7-OH-MTX} és a kezeléseket követő szérumszulfotranszamináz emelkedés között, amely arra utal, hogy szoros kapcsolat állhat fent a 7-OH-MTX és a vesekárosodás között. Adataink alapján a 7-OH-MTX szint mérés fontos kiegészítője lehetne a klinikai gyakorlatnak, hiszen pl. a nefrotoxicitást valószínűleg pontosabban jelzi, mint a szérumszulfotranszamináz szint. A nefrotoxicitás hátterében döntően glomeruláris funkciózavar áll, és a legtöbb irodalmi közlés összefüggést ír le a MTX adagok és gyógyszerszintek és a szérumszulfotranszamináz emelkedés ill. elhúzódó gyógyszerürülés között (Skarby *et al.*, 2003). A HD-MTX kezelésnek általában nincs kimutatható direkt tubulotoxikus hatása. A glomeruláris funkciózavar dóziszfüggően alakult ki, és a proteinuria mértékének fokozódásával valamint a GFR csökkenésével jár, és az esetek >99 %-ában reverzibilis (Hempel *et al.*, 2003). A 7-OH-MTX szintekről viszonylag kevés irodalmi adat áll rendelkezésre (Joerger *et al.*, 2006) és korábbi vizsgálatok pl. nem találtak összefüggést a 7-OH-MTX szintek és a vesefunkciós értékek (pl. kreatinin clearance) között (Joannou *et al.*, 2004) (Skarby *et al.*, 2003).

Az általunk vizsgált MTX gyógyszeradagok mellett a szérumszulfotranszamináz szintek jelentős csökkenését mutattuk ki mindkét vizsgált csoportban (már a kezelése előtt is és főleg a kezeléseket utáni 2. napon), de a két dózis között nem volt szignifikáns különbség.

Az alacsony szérumszulfotranszamináz szint csökkenti a MTX kötődését, rontja a kiürülést, és így elhúzódó MTX hatáshoz és a toxicitás fokozódásához vezethet (Abolmaali *et al.*, 2013) (Braun *et al.*, 2009). Sok olyan gyógyszer (pl. sulfametoxazol, nem szteroid gyulladáscsökkentők, ampicillin, amoxicillin, piperacillin, probenecid) ismerünk, amely kötődik a szérumszulfotranszaminázhoz, kompetitív módon gátolja a különböző citosztatikumok, köztük a MTX szulfotranszamináz kötődését, növeli a plazma szabad MTX koncentrációját, csökkenti a vesében történő kiválasztódást és így fokozhatja a toxikus mellékhatásokat (Yamamoto *et al.*, 1997) (Liegler *et al.*, 1969; Paxton, 1984; Evans *et al.*, 1985; Gewirtz *et al.*, 1985; Takeda *et al.*, 2002; Sani *et al.*, 2010).

További vizsgálatokra van szükség, hogy pontosan tisztázzuk a szérumszulfotranszamináz szintek csökkenése és a MTX hatásai, toxicitása közötti összefüggéseket. Ugyanakkor a klinikai gyakorlatban már egyértelműen arra törekszünk, hogy HD-MTX adásakor lehetőleg más gyógyszert, ami potenciálisan befolyásolhatja a májműködést, albuminkötést és MTX

metabolizmust, ne adjunk. Főleg toxikus gyógyszerszintek és alacsony szérumszfehérje/albumin szintek esetén javasolható lehet albumin infúziók adása.

Eredményeink alapján, a szérums MTX és 7-OH-MTX szintek az **ismételt** kezelések során nem változtak szignifikánsan, vagyis az első és az utolsó MTX kezelések között nem voltak különbségek a farmakokinetikai paraméterek tekintetében. Leukémiás betegeken végzett korábbi tanulmányok eredményei megegyeznek az általunk tapasztaltakkal (Borsi *et al.*, 1990; Sterba *et al.*, 2006). Oszteoszarkómás betegek esetén azonban, az irodalmi adatok alapján, a 7-OH-MTX szintek inkább csökkenő tendenciát mutatnak a kezelések sorszámanak növekedésével (Holmboe *et al.*, 2012) (Erttmann *et al.*, 1985). A jelenség háttérében az állhat, hogy OSC esetén lényegesen nagyobb MTX dózisokat adnak, ami a máj és a vese metabolikus aktivitásának és transzport rendszereinek változásához vezethet.

Az ismételt kezelések és a toxicitási paraméterek között szintén nem találtunk szignifikáns összefüggéseket. Az irodalmi adatok alapján leukémiás betegeken hasonló eredményeket kaptak (Borsi *et al.*, 1990). Oszteoszarkómás betegeken az ismételt HD-MTX kezelések májtoxicitása alacsonyabb szérums 7-OH-MTX szintekkel járt (Erttmann *et al.*, 1985). Az ismételt MTX kezelések másoknál sem jártak kifejezettebb nefrotoxicitással (Hempel *et al.*, 2003).

Vizsgálataink alapján az idősebb adolezcens betegeken (>14 év) magasabb szérums MTX szinteket és gyakoribb mellékhatásokat lehet kimutatni (szemben a 6 év alattiakkal). Korábbi vizsgálatok során <4 éves gyermekeken alacsonyabb szérums és likvors MTX koncentrációt és gyorsabb MTX clearance-t lehetett kimutatni (Borsi *et al.*, 1987; Plard *et al.*, 2007). Az életkor előre haladtával egyre lassabb MTX elimináció volt megfigyelhető ALL-es és OSC-s gyermekeken (Groninger *et al.*, 2004). Vannak adatok arra vonatkozólag is, hogy a fiatalabb betegeknél magasabb 7-OH-MTX koncentrációt mértek (Borsi *et al.*, 1990). Saját vizsgálatainkban a >14 évesek között gyakrabban fordult elő hepatotoxicitás és nefrotoxicitás. Oszteoszarkómás betegeken viszont az emelkedett ALT értékek a fiatalabb életkorral (<15 év) mutattak összefüggést (Holmboe *et al.*, 2012).

A 2 g/m² dózisú kezeléseket követően magasabb 24 órás MTX szinteket és AUC_{MTX} értékeket regisztráltunk lányokban, mint fiúkban. A többi MTX szintek esetén, valamint az 5 g/m² dózisú kezeléseket követően nem találtunk különbséget a nemek között. Van olyan közlés az irodalomban, ami a mienkhez hasonló eredményt kapott (Ramsey *et al.*, 2013), más adatok viszont nem találtak különbséget a nemek között (Plard *et al.*, 2007).

VI/2/2. MTX farmakokinetikai elemzések gyermekkori OSC-ban

Saját vizsgálataink következő szakaszában 98 osteosarcomás gyermek HD-MTX-kezelése során összefüggéseket kerestünk és találtunk a MTX farmakokinetikai paramétereit, a toxicitást és a túlélés között.

A nagyobb rizikójú (HR) és rosszabbul gyógyuló gyermekek esetében alacsonyabb görbe alatti területet, magasabb MTX clearance-t és kisebb toxicitást (máj) észleltünk, mint a sztandard rizikócsoporthoz. Valószínűleg ezen betegekben a MTX hatékonysága rosszabb, ami rossz terápiás választ és rosszabb túlélést eredményez. Saját adataink alapján, bár nem találtunk szignifikáns összefüggést a MTX csúcskoncentráció vagy a MTX AUC és a túlélés között, azonban a 48 órás MTX-szintek szignifikáns, pozitív korrelációt mutattak a túléléssel. Az irodalomban meglehetősen ellentmondásosak az adatok. Többen összefüggést találtak a MTX csúcskoncentráció vagy a 24 ill. 48 órás MTX szintek és a szövettani válasz között (Delepine *et al.*, 1995) (Smeland *et al.*, 2003) (Comandone *et al.*, 2005). Mások nem találtak hasonló összefüggést (Graf *et al.*, 1994) (Zelcer *et al.*, 2005) (Bacci *et al.*, 2006b).

Saját eredményeinkben a csúcskoncentráció és a szövettani válasz között szintén nem volt szignifikáns összefüggés. A szignifikancia határán lévő összefüggést találtunk viszont a MTX dózis intenzitás (időegység alatt beadott MTX mennyiség) és a túlélés (EFS) között, hasonlóan más adatokhoz (Aquerreta *et al.*, 2004). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az általános túlélés esetén a különbség már nem volt szignifikáns, így további, nagyobb esetszámú vizsgálatok szükségesek a kezelés intenzitásának meghatározásához.

Több vizsgálat kimutatta ugyanakkor, hogy jobb az EFS nagyobb MTX csúcskoncentrációk esetén (ált. $>1000 \text{ umol/l}$) (Delepine *et al.*, 1995) (Graf *et al.*, 1994), míg mások a MTX AUC és a túlélés között mutattak ki kapcsolatot (Aquerreta *et al.*, 2004).

Saját tanulmányunkban részletesen analizáltuk a különböző farmakokinetikai és toxicitási paraméterek összefüggéseit. A MTX csúcskoncentráció, a 24 és 48 órás MTX-szint, a 48 órás AUC és a MTX clearance is szignifikáns összefüggést mutatott a súlyos **májtoxicitás** (GrIII/IV GPT ill. GrI-IV Sebi emelkedés) fellépésével, vagyis a májkárosodás a szisztémás gyógyszer-expozíció nagyságával lehet összefüggésben (Schmiegelow *et al.*, 1990).

A kezelések előre haladtával a májtoxicitás inkább csökkenő (nem szignifikáns) tendenciát mutatott. Az okok között szerepelhet, hogy több betegnél is jelentős dózismódosításra, vagy a MTX kezelések elhagyására került sor korábbi súlyos toxicitás miatt, ill. a szervezet bizonyos adaptációs mechanizmusai is aktiválódhattak, ami jobb toleranciát eredményezett.

Vizsgálatainkban **vesekárosodás** (Sekreat emelkedés) gyakrabban fordult elő magasabb 24 órás MTX szérumszintek után, ill. az emelkedett Sekreat értékű gyermekeknél magasabbak voltak a szérum MTX szintek. Itt említendő meg, hogy a hidrálásnak és a vizelet alkalizálásának jelentős szerepe van a MTX nefrotoxicitásában (Ferrer *et al.*, 2004) (Widemann *et al.*, 2004). Kimutattuk, hogy intenzívebb hidrálással és alkalizálással, a MTX kezeléseket követő proteinuria és így a vesekárosítás csökkenthető. A kezelések előre haladtával a vesetoxicitás előfordulása esetében éppen ellentétes tendencia volt megfigyelhető, mint a májénál. A kezelések sorszámanak emelkedésével a vesetoxicitás is emelkedni látszott (ez a változás sem szignifikáns). Valószínűleg az idő előre haladtával a potenciálisan nefrotoxikus gyógyszerek (pl. platina, ifosfamid, antibiotikumok) hatása kumulálódik (Crews *et al.*, 2004).

A **csontvelő-toxicitást** (fvs csökkenés) kifejezettebbnek észleltük a magasabb 24 illetve 48 órás MTX szérumszintek esetén. Mások is találtak hasonló eredményt a MTX AUC és a csontvelő károsító hatás között (Comandone *et al.*, 2005). A csontvelő-toxicitás azon blokkokat követően volt kifejezettebb, melyeket a protokollban a ciszplatin-ifoszfamid blokkok előznek meg. Nagyon valószínű, hogy itt a kemoterápiás szerek mieloszuppresszív hatásai összeadódtak. Hasonlóan az irodalmi adatokhoz, a mi vizsgálatainkban sem mutattak szignifikáns összefüggést a különböző (máj, vese, csontvelő) toxicitási paraméterek a nemmel, az életkorral, a metasztázis jelenlétével és a szövettani válasszal (Schmiegelow *et al.*, 1990).

Végezetül megnéztük, hogy a különböző toxicitási értékek és a túlélés között kimutatható-e összefüggés. Bár a farmakokinetikai eredményeink miatt (volt összefüggés a kinetikai paraméterek és a toxicitás, ill. a kinetikai paraméterek és a túlélés között), fokozottabb toxicitás esetén jobb túlélést várnánk, vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a toxicitás fellépése és a terápia kimenetele között. Ezen megfigyelésünkre nem tudjuk a választ, de feltételezhető, hogy a kifejezett toxicitások miatt alkalmazott dózisredukciók és halasztások ronthatták a MTX kezelés hatékonyságát és torzíthatták az analízist.

Összefoglalva, saját eredményeink alapján megállapítható, hogy magasabb MTX szérumszinteknél és elhúzódó kiválasztásnál fokozott a máj-, csontvelő- (és vese-)toxicitás fellépésének a veszélye, de jobb a betegek gyógyulási aránya. Eredményeink alapján a MTX AUC meghatározása és a MTX egyéb farmakokinetikai paramétereinek figyelembe vétele fontos kiegészítője lehet az oszteosarkómás betegek rizikó besorolásánál.

A továbblépés útja lehet a populációs farmakokinetika modellek megalkotása, mely a gyógyszer-koncentráció interindividuális különbségeit vizsgálja sztandard dózírozású protokollok esetében. Fontos a hagyományos farmakokinetikai elemzés is, amikor az adott egyén farmakokinetikai paramétereiből vonunk le következtetéseket az illető számára. A populációs farmakokinetika pedig a farmakokinetikai információk tendenciáira koncentrálnak (Dupuis *et al.*, 2008) (Aarons, 1991). A cél, a minél egyedibb, minél inkább betegre, egyénre szabott gyógyszerelés. Ez alapvetően kétféle módon valósulhat meg: *apriori* és *aposteriori* módszerekkel. Az *apriori* módszereknél a beteg anatómiai és élettani jellemzői (testsúly, testmagasság, kor, nem, laboratóriumi paraméterek) alapján, a populációban korábban már megismert adatok birtokában becsüljük meg a szükséges gyógyszeradagot.

Az *aposteriori* módszerek során a kezdeti szérumkoncentrációkhoz igazítva határozzuk meg a gyógyszeradagot Bayes-i módszerrel (Rousseau *et al.*, 2002). A Bayes-i közelítés populációs farmakokinetikai modellekre épül, és így a szükséges farmakokinetikai paramétereket előre tudja jelezni a korábbi populációs adatok és a kezelések alatt gyűjtött szérumkoncentrációk alapján. Az elkövetkező időkben ilyen és hasonló modellek elterjedése várható.

VI/3. Farmakogenetikai vizsgálatok

Munkánk során először az ALL-ben alkalmazott citosztatikus szerek és kombinációk korai és késői toxicitásának genetikai hátterét vizsgáltuk. Arra voltunk első sorban kíváncsiak, hogy milyen genetikai tényezők felelősek a károsodások kialakulásáért, ill. megtalálhatók-e azon betegcsoportok, akik valamilyen toxicitás szempontjából különösen veszélyeztetettek.

Munkánk következő szakaszában OSC-s gyermekekben vizsgáltuk a MTX farmakokinetikáját és toxicitását befolyásoló potenciális genetikai eltéréseket, összefüggéseket keresve a hatékonyság és a mellékhatások valamint az egyéni genetikai eltérések között.

VI/3/1. Az ABCC1 szerepe az antraciklinek kardiotoxicitásában ALL-ben

Az intenzív kemoterápiás kezeléseknek köszönhetően, a gyermekkori ALL betegek több mint 80 %-a tartós túlélő. Ugyanakkor az agresszív citosztatikus kezeléseknek számos korai és késői mellékhatása lehet. A késői, sokszor évtizedek múlva jelentkező károsodások közül talán a legfontosabb a szívkárosító hatás. Az már régóta ismert, hogy elsősorban az antraciklinek okoznak kardiotoxicitást. A kardiotoxicitás idővel gyakoribbá válik és

súlyosbodhat, és első sorban a bal kamra funkciójának károsodásában, congestív kardiomiopatiában nyilvánul meg (Lipshultz *et al.*, 2008). A szívkárosító hatások hátterében álló genetikai tényezőket viszonylag kevesen vizsgálták még, de feltételezhető, hogy az egyes betegek között meglévő különbségek egy részéért bizonyos genetikai hajlamosító tényezők is szerepet játszhatnak.

Jelen vizsgálatunkban mi az *ABCC1* gén egy pontos nukleotid polimorfizmusainak és a bal kamra funkciójának az összefüggését vizsgáltuk ALL miatt kemoterápiás kezelésben részesült gyermekekben.

Az *ABCC1* transzporter leginkább a különböző sejtek basolaterális membránján helyezkedik el és elsődleges feladata a sejtek védelme a károsító hatásoktól (Bakos *et al.*, 2007).

Oxidatív stressz esetén is védelmi feladatot tölt be, részt vesz a glutation szint fenntartásában és így az antraciklinek által okozott oxidatív stressz elleni védekezésben is (Kruh *et al.*, 2003) (Wojtacki *et al.*, 2000) (Cole, 2014).

A mi eredményeink alapján is az *ABCC1* gén fontos szerepet játszik az antraciklinek szívkárosító hatásában ill. a kardiomiociták védelmében.

Az rs246221 T alléllal rendelkező betegek pumpafunkciója átlag 6 évvel a kezelés befejezése után szignifikánsan alacsonyabb volt, ami potenciális kardiotoxikus hatásra utal. További összefüggésként megfigyeltük, hogy a citosztatikus (antraciklin) kezelések befejeztével az *ABCC1* rs3743527TT genotípusú és különösen az rs3743527TT-rs246221TC/TT kombinált genotípusú betegeknél csökkent balkamra funkciós értékek (linEF) mutathatók ki. Ezen összefüggéseket mások még nem közölték.

Az irodalomban fellelhető hasonló témájú publikációk alapján elmondható, hogy bizonyos SNP-knek lehet szerepe az antraciklinek kardiotoxicitásában (főleg akut hatások) (Wojnowski *et al.*, 2005) (Visscher *et al.*, 2012). A mi adatainkhoz hasonlóan felnőtt emlőrákos betegekben kapcsolatot írtak le az *ABCC1* rs246221 polimorfizmus (T allél) és a balkamra funkció között (Vulsteke *et al.*, 2015).

Felnőtt NHL betegekben továbbá összefüggést találtak a NAD(P)H-oxidáz multienzim-komplex két különböző alegységében található SNP-k jelenléte (*CYBA* rs4673 és *RAC2* rs13058338) és az akut kardiotoxicitás között, valamint az *ABCC1* rs45511401 SNP és az *ABCC2* rs8187694-rs8187710 haplotípusa is kapcsolatba volt hozható az antraciklinek korai szívkárosító hatásával. A NAD(P)H-oxidáz multienzim-komplex NFC4 alegységének egy másik polimorfizmusa (rs1883112) és a krónikus antraciklin-indukálta kardiotoxicitás kialakulása között is szignifikáns kapcsolatot találtak (Wojnowski *et al.*, 2005).

Mi viszont nem találtunk asszociációt az *ABCC1* rs45511401 SNP és a késői kardiotoxicitás között. A különbség hátterében a vizsgált betegcsoportok különbözősége (eltérő diagnózis, eltérő életkor), az eltérő vizsgáló módszerek és az SNP kicsi minor allélfrekvenciája is állhatnak. A lengyel kutatócsoport is csak gyengén szignifikáns összefüggést talált és csak a korai kardiotoxicitás vonatkozásában.

Egy másik tanulmányban antraciklinnel kezelt gyermekkori daganatos betegségekben az *ABCC1* rs4148350 polimorfizmusa és az antraciklin-indukálta kardiotoxicitás (csökkent linEF) közötti összefüggést írtak le (Visscher *et al.*, 2012).

Mindezek alapján feltételezhető, hogy az *ABCC1* génvariánsai és az antraciklinek által okozott kardiotoxicitás között összefüggés lehet.

Az rs4148350 variáns T alléljának jelenlétében több hematológiai toxicitást és lázas neutropéniát írtak le emlőrákos nőkben (Vulsteke *et al.*, 2013).

Az irodalomban nem találunk sok adatot az általunk szignifikánsnak talált rs3743527 és rs246221 polimorfizmusok szerepét illetően.

Az rs246221 az *ABCC1* L0 régiójában található (szinonim polimorfizmus). A minor allél-lal rendelkezőkben csökkent átlagos mRNS szintet írtak le (Conrad *et al.*, 2001), de nem feltételeznek különösebb funkciót (Wang *et al.*, 2006). Ugyanakkor érdekes, hogy abban a régióban, ahol ez az SNP is található (L0), több különböző, aminosavcserét is okozó mutáció (W222L, K267M) esetén leírták, hogy károsodik az *ABCC1* glutationt és glukuronid konjugátumokat szállító funkciója. Vagyis feltételezhető, hogy az általunk talált eltérések is talán ezen mechanizmus útján okozhatnak fokozott kardiotoxicitást. A legújabb adatok szerint összefüggés lehet az rs246221 és a kemoterápia okozta lázas neutropénia között. A C allélt hordozó variáns esetekben nagyobb volt a rizikója a lázas neutropéniának felnőtt emlőrákos esetekben (Pfeil *et al.*, 2014).

Az rs3743527 SNP szerepét vizsgálva azt találták, hogy a polimorfizmus a kínai populációban a tüdőrák kialakulásában nem játszott szerepet. Ugyanakkor megint csak érdekes, hogy egy közeli másik SNP (rs212090) fokozta a tüdőrák rizikóját. Ismételten azt feltételezhetjük, hogy bizonyos kapcsolt gének, kapcsolt polimorfizmusok inkább szerepet játszhatnak bizonyos hatások kifejlődésében, mint az egy pontos SNP-k önmagukban (Wang *et al.*, 2009) (Fukushima-Uesaka *et al.*, 2007). Valószínűleg további haplotípus elemzésre van szükség.

Az rs3743527 SNP az *ABCC1* gén 3' nem átíródó régiójában (3' UTR) van, és feltételezik, hogy ezen régióknak szabályozó funkciója lehet. Mikro-RNS kötőhelyek vannak az SNP környékén és más szabályozó régiókat is leírtak az SNP körül.

Az elmúlt évek irodalmi adatai alapján az antraciklinek által okozott kardiomiopátiában a karbonil reduktáz (CBR) gén polimorfizmusai is szerepet játszhatnak. Az enzim az antraciklinek alkoholos átalakításában játszik szerepet. A COG adatai alapján a CBR1:GA/AA és a CBR3:GA/AA alacsony-dózisú antraciklin adagok mellett (<250 mg/m²) nem játszottak szerepet a kardiotoxicitásban, de a CBR3:GG genotípus esetén fokozódott a kardiomiopátia rizikója (Blanco *et al.*, 2012). Mások az *SLC28A3* szinonim variánsa (rs7853758) ill. az *SLC22A17* és *SLC22A7* genetikai variánsai valamint az antraciklinek által okozott kardiotoxicitás között találtak összefüggést (Visscher *et al.*, 2012; Visscher *et al.*, 2015). Gyermekkori daganatos betegségekben vizsgálták külön csoportként a kardiotoxicitást mutató betegeket és a kontrollokat, és legfontosabb, protektív tényezőnek találták az rs7853758-at. Ugyanebben a tanulmányban az *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCC*, és az *SLC28A1*, *SLC28A2* valamint néhány más gén (*UGT1A6*, *HNMT*, *FMO2*, *SPG7*) bizonyos genetikai variánsai is összefüggéseket (védő vagy rizikó tényezőként) mutattak a kardiotoxicitással (összesen 2977 SNP vizsgálata alapján). Ők az *ABCC1* gén rs4148350 polimorfizmusát találták a kardiotoxicitás szempontjából rizikó tényezőnek. Meg tudták határozni továbbá egy olyan SNP modellt (4 rizikót fokozó és 5 rizikót csökkentő variáns), melynek segítségével egyrészt kb. 75 %-os valószínűséggel meg tudták mondani, hogy kinek lesz különös kockázata a szívkárosító hatás kifejlődésére, másrészt, egy másik genetikai mintázat alapján 96 %-os valószínűséggel meg lehetett mondani, hogy kinek nem lesz szignifikáns kardiotoxicitása. A kardiotoxicitás súlyossága és a szívkárosodás idővel történő halmozódása is kifejezettebb volt a genetikai szempontból nagy-rizikójú csoportban. Ugyanez a kutatócsoport egy másik tanulmányban 2100 SNP-t vizsgált kardiovaszkuláris rizikó irányában. Találtak egy SNP-t, a hialuron szintetáz 3 génben (*HAS3*), mely szignifikánsan befolyásolta az antraciklinek dózis-függő módon létrehozott kardiotoxicitását. Az AA genotípus nagy kumulatív antraciklin adagok mellett kifejezett kardiotoxicitási kockázattal járt. A hialuron az extracelluláris mátrix része, a szöveti regenerációban és a reaktív oxigén gyökök által kiváltott szívkárosodás kivédésében játszik szerepet (Wang *et al.*, 2014). Az AA genotípus esetén valószínűleg ezen folyamatok károsodnak és így az antraciklinek is fokozottabb szívkárosító hatással bírhatnak.

Mások az összejt transzplantáció túlélői között keresték azon faktorokat, melyek hajlamosítanak kardiotoxicitásra (Armenian *et al.*, 2013). Azt találták, hogy a TPL előtti mellkasi besugárzásban részesülők, a nők, magas vérnyomásúak és bizonyos genetikai tényezők játszanak szerepet a szívkárosító hatásban. A genetikai tényezők közül a NAD(P)H-

oxidáz *RAC2* alegységének polimorfizmusát (rs13058338), a humán hemokromatózis (*HFE*) gén egyik SNP-jét (rs1799945) és az *ABCC2* egyik polimorfizmusát (rs8187710) találták szignifikánsnak.

Egy 2016-os összefoglaló kanadai tanulmányban (Aminkeng *et al.*, 2016) főleg 3 gén bizonyos variánsait találták szignifikáns prognosztikai tényezőnek (*RARG* rs2229774, *SLC28A3* rs7853758 *UGT1A6**4 rs17863783), de több más, köztünk az általunk is vizsgált *ABCC1* génnek is szignifikáns jelentőséget tulajdonítanak.

A legújabb eredmények alapján továbbá az *ABCC1* overexpresszió szerepet játszhat bizonyos daganatok rosszabb prognózisában is (a citosztatikumok sejtéből való kipumpálása révén) (Kunicka *et al.*, 2014b). A hatásmechanizmusban az intracelluláris folát koncentrációnak döntő szerepe van, ha megemelkedik a szintje, az fokozza az *ABCC1* aktivitást és így gyógyszer rezisztenciához vezet (Hooijberg *et al.*, 2014). Ezen felül már vannak olyan adatok is, melyek szerint bizonyos anyagokkal (pl. triterpének) lehet szenzitizálni a daganatsejteket és ebben a mechanizmusban az *ABCC1* által modulált intracelluláris glutation anyagcsere is szerepet játszhat (Rocha Gda *et al.*, 2014). Ugyanakkor mások nem találták a túlélésben (felnőtt fej-, nyaki daganatok) döntő tényezőnek ezen transzporter genetikai variánsait (Warta *et al.*, 2014).

Új irodalmi adatok alapján a NADPH oxidáz génpolimorfizmusai is összefüggést mutattak a kardiotoxicitással felnőtt betegekben (Reichwagen *et al.*, 2015).

Egy most megjelent összefoglaló tanulmányban pedig, ahol 28 study meta-analízisét végezték el, három génpolimorfizmust találtak szignifikánsnak az antraciklinek kardiotoxicitásával összefüggésben: *ABCC2* rs8187710, *CYBA* rs4673, *RAC2* rs13058338 (Leong *et al.*, 2017).

Eredményeink alapján az antraciklin dózis nem befolyásolta a bal kamra funkciót (linEF). Ennek oka valószínűleg az, hogy a kumulatív antraciklin dózis nem érte el a 300 mg/m²-t a betegek döntő többségében. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy főleg a fiatalabb betegek és a nagyobb összdózist kapó leányok a különösen veszélyeztetettek. A fiatalabb betegek ejekciós frakciói a mi vizsgálatainkban is szignifikánsan különböztek az idősebb betegekhez képest, de ez megfelel annak a biológiai jelenségnek, hogy az FS értékek az életkorral változnak.

Továbbá, meg kell említeni, hogy a polimorfizmusokkal asszociáló csökkent lineáris ejekciós frakciós értékek mind a normális tartományban (>30 %) voltak. Természetesen nem kizárt, hogy az alacsonyabb FS értékek a későbbiekben klinikai jelentőséggel is bírhatnak majd. Erre vonatkozólag is találunk irodalmi adatokat (Kremer *et al.*, 2002) (Lipshultz *et al.*, 2008).

Jelen munkánkban nem találtunk összefüggést a dexrazoxan alkalmazása és a kardiotoxicitás között. Korábbi adataink és közleményünk alapján a dexrazoxan alkalmazása szignifikánsan csökkentette a késői kardiotoxicitás előfordulását. Erre vonatkozólag több nemzetközi publikáció is megjelent (Lipshultz *et al.*, 2008) (Adams *et al.*, 2005) (Barry *et al.*, 2008) (van Dalen *et al.*, 2011). A különbség oka lehet a különböző betegpopulációk és a különböző antraciklin dózisok a két tanulmányban. A dexrazoxan védő hatása különösen nagyobb antraciklin összdózisok ($>300\text{-}400\text{ mg/m}^2$) felett érvényesül, főleg szolid tumoros betegekben lehet kifejezett. A leukémiás betegcsoport nem a legveszélyeztetettebb a kardiotoxicitás szempontjából. A dexrazoxant néhány évvel ezelőtt az EMA (Európai Gyógyszerügyi Hatóság) visszavonta a gyermekek kezeléséből, mert több késői daganatot véltek felfedezni a hosszú távú alkalmazás és követés után.

Saját és a nemzetközi adatok alapján is úgy tűnik, hogy a jelenleg az ALL kezelésére alkalmazott antraciklin adagok általában nem jelentenek nagy veszélyt a gyógyult betegek késői életkilátásaira vonatkozólag. Ugyanakkor a rizikóbetegeknek (genetikai kockázati tényezők, társbetegség, besugárzás, nagy antraciklin adagok) gyakori szívUH ellenőrzések, kardioprotektív szerek használata és elnyújtott (pl. 24 órás) antraciklin adagolási mód ajánlott a kardiotoxikus hatások csökkentésére (Aminkeng *et al.*, 2016).

Most folyik egy multicentrikus, multinacionális nemzetközi vizsgálat, melyben több ezres mintaszámon próbáljuk felderíteni a különböző citosztatikus szerek toxicitásának hátterében álló genetikai tényezőket. A vizsgálatban Magyarország tölti be a vezető szerepet, nálunk van a biobank, és remény van arra, hogy néhány éven belül az antraciklinek kardiotoxicitása terén is megbízható, új információkat nyerhetünk.

VI/3/2. Az ABCB1 és az ABCG2 szerepe a kemoterápiás szerek által okozott immunszuppresszióban, enkefalopátiában és túlélésben gyermekkori ALL-ben

Elsőként az **immunszuppresszió** (fertőzések) és a genetikai háttér összefüggéseit elemeztük. Az ABCB1 3435TT genotípusú betegek esetén az intenzív kemoterápia alatt (főleg indukció/ProtI és reindukció/ProtII) gyakrabban és hosszabb ideig kaptak vénás antimikróbás (antibiotikum és/vagy antimikotikum) kezelést, mint a 3435C allélt hordozók. A különbség különösen jelentős volt, ha azon betegek körében vizsgáltuk (felső kvadráns), akiknél a legsúlyosabb és leghosszabb ideig tartó (közel 30 napos) antimikróbás kezelésre volt szükség. A kemoterápiás kezelések ideje is hosszabb volt (a komplikációk miatti csúszások miatt) a 3435TT-t hordozók között. Ugyanakkor – annak ellenére, hogy a fertőzőes állapotok

háttérben ebben a betegcsoportban jórészt a súlyos leukopénia és következményes immunszuppresszió áll - nem találtunk különbséget az *ABCB1* 3435T>C genotípus és a reindukciós fázisban kialakult súlyos leukocitopénia (GrIII/IV) előfordulása között. Ezen különbség magyarázatát nem tudjuk pontosan. Előfordulhat, hogy a fehérvérsejtek mennyiségi károsodásán túl a fvs. és/vagy granulocita funkciók különböző fokú károsodása is szerepet játszik. Másrészt pedig elképzelhető, hogy a vizsgált periódusban (reindukció) a vizsgált transzporterek (főleg *ABCB1*) szubsztrátjai egymással ellentétes módon hatnak a leukocitaszámmra. Ismert, hogy a vincrisztin és a doxorubicin gátolja a csontvelő működését, így a fvs-ek képzését, míg a szteroidok (így a dexametazon is) emelheti a fvs-számot, elsősorban a raktár poolokból az érett granulociták mobilizálása révén (a limfoid sejtekre apoptotikus hatást fejtenek ki). Ugyanakkor a szteroid kezelések mellett az infekciók előfordulása gyakoribb, vagyis különböző, hol szinergista, hol antagonistá hatásokról van szó, és talán ezért nem egyértelmű az immunszuppresszióra kifejtett hatások összessége.

A kezelés elején (indukció) nem is vizsgáltuk a leukopénia hatását, hiszen ebben a szakaszban a csontvelő a blasztos infiltráció miatt beteg elsősorban és nem csak, sőt nem elsősorban a citosztatikus szerek befolyásolják a normál csontvelői vérképzést, hanem a leukémiás sejtek inváziója.

A másik általunk vizsgált gén (*ABCG2*) 421C>A polimorfizmusa nem mutatott összefüggést az immunszuppresszív hatásokkal. Az alacsony esetszám miatt itt a kapcsolt SNP-k szerepét nem tudtuk vizsgálni. Mint ahogy nem tudtuk vizsgálni az *ABCG2* gén másik (34G>A) polimorfizmusa klinikai jelentőségét sem a fertőzések, antimikrobiális kezelések vonatkozásában.

Az irodalomban némileg ellentmondó közlemények ismeretesek az általunk is vizsgált polimorfizmusok hatásairól. Egy viszonylag nagy létszámú (240 fő) USA-ban végzett vizsgálatban (Kishi *et al.*, 2007) leukémiás gyermekek esetében nem találtak összefüggést az *ABCB1* 3435T>C és 2677G>T polimorfizmusok és a súlyos/életveszélyes fertőzőes epizódok előfordulása között (más *ABCB1* polimorfizmus, az *ABCB1*-haplotípus vagy az *ABCG2* 421C>A szerepét nem vizsgálták). A különbség oka lehet, hogy az amerikai tanulmányban a jóval intenzívebb kezelést kapó HR betegeket is bevonták (mi csak a közel azonos kezelést kapó SR és MR betegeket vizsgáltuk). Az ő munkájukban a kezelések ill. a fertőzések hossza nem szerepelt, csak az életveszélyes fertőzések előfordulási gyakorisága. a kezelési protokoll is kissé más (pl. kevesebb antraciklin, több etoposid és kisebb adagú MTX), mint a BFM protokoll és etnikai különbségek is lehetnek a kezelt betegekben. Mások a VCR farmakokinetikáját és mellékhatásait elemezték, de nem találtak összefüggéseket a

3435T>C és 2677G>T polimorfizmusokkal (Plasschaert *et al.*, 2004). Egy másik tanulmány a középsúlyos, elsősorban szteroidok által okozott infekciók tekintetében talált összefüggést többek között az *ABCB1* C3435T polimorfizmussal (Marino *et al.*, 2009). Ebben a tanulmányban a *GST-M1* genotípus befolyásolta legerősebben az infekciók súlyosságát gyermekkori ALL-ben. Faganel és munkatársai sem találtak összefüggést ezen gén polimorfizmusai és az infekciók ill. csontvelő károsodás között (találtak viszont kapcsolatot az *MTHFR* 677TT és az *SLC19A1* genetikai variánsaival) (Faganel Kotnik *et al.*, 2011). Reumatoid artritiszes betegekben a 3435T allél fokozott metotrexát-toxicitással függött össze (Bohanec Grabar *et al.*, 2008), valamint összefüggést lehetett kimutatni vesetranszplantációt követően a 3435TT genotípus és a szteroid-indukálta femurfej-nekrózis között (Kuribayashi *et al.*, 2008). Egy másik tanulmányban sem találtak kapcsolatot a kemoterápia okozta leukopénia és az *ABCB1* 3435T>C polimorfizmus között (Tsuchiya *et al.*, 2008). Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy az *ABCB1* membrántranszporternek azért lehet szerepe a különböző gyógyszerek által okozott toxicitásokban. Egy nemrégiben megjelent meta-analízis pl. a tacrolimus farmakokinetikájában mutatta ki a C3435T SNP szerepét (Liu *et al.*, 2013). A hasonló témában megjelenő közlemények száma is jelentős.

Az *ABCG2*-vel kapcsolatban a közlemények száma viszonylag csekély. Egy felnőttkori közleményben NHL betegek között az *ABCG2* 421A allél hordozók közt gyakoribbnak találták a lázas epizódokat és a hasmenést, de nem találtak összefüggést a leukopéniával (Kim *et al.*, 2008). Az *ABCG2* egy intron SNP-je az rs2622604 szignifikáns összefüggést mutatott az irinotecán által okozott mielosuppresszióval (Cha *et al.*, 2009). Mások az irinotecán gastrointestinalis toxicitásával találtak összefüggést felnőtt betegekben (Di Martino *et al.*, 2011). Több más gyógyszer metabolizmusában is szerepet játszhat ez a gén (ill. az általa kódolt membrántranszporter). Így pl. egy nemrég megjelent közleményben az allopurinol húgysav csökkentő hatásában mutatták ki szerepét (Wen *et al.*, 2015) valamint kimutatták szerepét a köszvény kialakulásában is (Lv *et al.*, 2014). Mások a sztatinok mellékhatásaiban (kreatin-kináz emelkedés) találtak szignifikánsnak bizonyos membrán transzporterek és az *SLCO1B1* genetikai variánsait (Ferrari *et al.*, 2014). Az általunk is vizsgált 2 gén SNP-i továbbá szerepet játszhatnak CML-ben a TKI-ra (imatinib) adott terápiás válaszban (Au *et al.*, 2014). Mások a glutation metabolizmusban szerepet játszó gén (*GST-M1*) polimorfizmusai és a szteroid kezelésekkel összefüggésbe hozható infekciók közötti kapcsolatot írtak le (Marino *et al.*, 2009).

Saját anyagunkban vizsgáltuk az előbb említett polimorfizmusok és a kemoterápiás kezelések központi idegrendszeri mellékhatásainak kapcsolatát. Az *ABCB1* 3435TT

csoportban gyakoribb volt a heveny toxikus **központi idegrendszeri** szövődmények előfordulása is. Az összefüggés szintén kimutatható volt, bár gyengébben, ha az *ABCB1* 3435T>C genotípus helyett a leggyakoribb kapcsolt haplotípus (*ABCB1* 1236T-2677T-3435T homozigóta) hatását elemeztük.

Itt sem találtunk összefüggést, ha az *ABCG2* 421C>A polimorfizmust önmagában próbáltuk kapcsolatba hozni az idegrendszeri szövődményekkel. Az akut enkefalopátia tekintetében azonban megfigyelhető volt egy tendencia, mely szerint a 421A allélt hordozók között gyakoribb lett volna e komplikáció (kétszeres, de nem szignifikáns rizikó). Az *ABCG2* 34G>A polimorfizmus szerepét az alacsony variáns allélfrekvencia miatt itt sem tudtuk egyértelműen értékelni. Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy azon 20 beteg esetén, akik a ritka 34A allélt hordozták, toxikus idegrendszeri mellékhatás nem jelentkezett. Nagyobb esetszámú vizsgálatok kellene (és vannak is folyamatban), hogy ezen SNP szerepét tisztázni tudjuk.

Az enkefalopátia esetén külön tudtuk elemezni az *ABCB1* és az *ABCG2* polimorfizmusok géninterakcióit, a kombinált genotípusok hatásait. Az *ABCB1* 3435TT genotípusú és az *ABCG2* 421A allélt együttesen hordozók között nagy valószínűséggel (28%) fordult elő súlyos idegrendszeri mellékhatás (szemben azon csoportokkal, akik csak az egyik potenciális genetikai hajlamosító tényezőt hordozták). Vagyis a két polimorfizmus között szinergisztikus hatás állapítható meg a neurotoxicitás szempontjából. E géninterakciót elsőként írtuk le az irodalomban.

Az irodalmi adatok szerint a korábban már említett Kishi tanulmány (Kishi *et al.*, 2007) az idegrendszeri mellékhatások tekintetében sem talált szignifikáns összefüggést a polimorfizmusokkal. Itt is az eltérés oka lehet, hogy más protokollt, más gyógyszeradagokkal alkalmaztak az amerikai tanulmányban (kevesebb *ABCB1*-szubsztrát szer alacsonyabb dózissal).

Az *ABCB1* nem-konjugált molekulákat transzportál, míg az *ABCG2* szubsztrátjai gyakran glukuronil vagy szulfát konjugátumok. Az általunk is alkalmazott potenciálisan neurotoxikus kemoterápiás szerek közül a fenti transzporterek közül mindkettő szubsztrátja a doxorubicin, a daunorubicin és a MTX, míg az *ABCB1* szubsztrátja a vinkrisztin, és a glukokortikoidok. Továbbá, ismert tény, hogy a dexametazon az *ABCB1* induktora és az *ABCG2* inhibitora (Zhou *et al.*, 2008) (Polgar *et al.*, 2008). A gyógyszerek konjugációjában szerepet játszó enzimek megtalálhatók a vér-agy gáton, valamint a glia- és idegsejtekben is (Gherzi-Egea *et al.*, 1994) (Miksys *et al.*, 2002). A két membrántranszporter polimorfizmus interakcióját magyarázhatná, hogy esetleg csak mindkettőjük működésének csökkenése esetén érhetne el a neurotoxikus gyógyszerek koncentrációja egy kritikus szintet az agyban (a mi

vizsgálatainkban ugyanakkor, kevés betegben, nem találtunk különbséget a likvor MTX szintekben a különböző genetikai háttérű betegekben). További lehetséges mechanizmus, hogy bizonyos *ABCG2* szubsztrátok az *ABCB1* induktorainként is szerepelhetnek. Elképzelhető továbbá, hogy egymást kiegészítő vagy erősítő neurotoxikus hatású szerek által jön létre interakció a két gén között. Több mostanában megjelent összefoglaló alapján az *ABCB1* és az *ABCG2* sok gyógyszer hatásmechanizmusában játszhat szerepet (Durmus *et al.*, 2015) (Lee *et al.*, 2015) (Stacy *et al.*, 2013).

Saját vizsgálataink utolsó részében egy nagyobb betegcsoportban (n=403) tudtuk elemezni a fenti két gén polimorfizmusainak hatását a gyermekkori ALL **túlélésére**. Az *ABCB1* 3435CC genotípusú betegek eseménymentes túlélése szignifikánsan rosszabb volt a CT vagy TT genotípus-csoporténál. Az *ABCG2* polimorfizmusok nem befolyásolták a túlélést a mi vizsgálatunkban. Az irodalomban megint csak találunk olyan közléseket, melyek nem találtak szignifikáns összefüggést a genetikai alcsoportok és a túlélés között gyermekkori ALL-ben (Rocha *et al.*, 2005). Mások viszont a miénkhez hasonló eredményre jutottak (gyakoribb ALL rizikó az *ABCB1* 3435T alléllal összefüggésben és rosszabb túlélés a CC genotípus esetén) (Jamroziak *et al.*, 2004b) (Stanulla *et al.*, 2005) (Ma *et al.*, 2015). Továbbá, az *ABCB1* 3435T allél talán védelmet jelent az ALL idegrendszeri relapszusával szemben. Ez összhangban van a mi eredményeinkkel is, hogy a T allél esetén több az idegrendszeri mellékhatás, de ennek háttérében valószínűleg nagyobb likvor gyógyszer koncentrációk állhatnak, ami viszont jobb gyógyulási eredményekhez vezethet.

Más hematológiai malignitásokban is hasonló eredményeket találhatunk (Illmer *et al.*, 2002) (Buda *et al.*, 2007) (Dulucq *et al.*, 2008).

Ugyanakkor az *ABCG2* és a gyermekkori leukémia túlélésének viszonyáról nincs irodalmi adat. Imatinibbel kezelt gastrointestinalis stroma tumorban viszont kimutatták ezen polimorfizmus hatását a túlélésre. A 421 AA genotípus szignifikánsan jobb túlélést mutatott mint az AC vagy CC variáns (Koo *et al.*, 2015).

A gyermekkori ALL túlélésével összefüggésbe hozható lehetséges polimorfizmusokról több irodalmi adat jelent már meg (Stocco *et al.*, 2013) (Dulucq *et al.*, 2014) (Lopez-Lopez *et al.*, 2014) (Pui, 2015). Több potenciális SNP ill. genetikai eltérés összefüggésbe hozható a leukémia prognózisával vagy a kezelés hatékonyságával (pl. *MTHFR* rs1801131, *FPGS* rs1544105, *DPYD* polimorfizmusok, *CDKN2A/B* génstátusz etc.) (Radtko *et al.*, 2013) (Huang *et al.*, 2016) (Zhao *et al.*, 2016).

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy hasonlóan az irodalmi adatok többségével, az *ABCB1* 3435T>C és az *ABCG2* 421C>A polimorfizmusok valószínűleg

funkcionális jelentőségük (Mizuarai *et al.*, 2004) (Robey *et al.*, 2009) (Durmus *et al.*, 2015). Az *ABCB1* 3435T>C polimorfizmus önmagában felelős lehet a funkcionális következményekért (Wang *et al.*, 2005) (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Mindezek alapján erősen felvetődik, hogy a jövőben az ABC polimorfizmusok (talán a leginkább az *ABCB1*) hasznosíthatók lesznek a kemoterápia individualizálására. Ez még akkor is így van, ha a génexpressziókban megnyilvánuló nagy variabilitást egyedül nem magyarázzák (Cascorbi, 2006). Ismételten adott, számtalan gyógyszer kombinációjából álló, intenzív és összetett kemoterápiás protokollok esetén, főleg ha figyelembe vesszük az egyidejűleg adott kiterjedt szupportív kezeléseket is, a viszonylag kis funkcióeltérések az egymásra épülő barriereken létrejövő felerősödő koncentrációgrádiens miatt jelentős farmakokinetikai különbségekhez vezethetnek, és így a kezelések hatékonyságát és mellékhatás profilját jelentősen befolyásolhatják. Ez különösen igaz lehet bizonyos zárt kompartmentekben ill. különleges barriereken (mint pl. a vér-agy gát). Ugyanakkor tudni kell, hogy ezen polimorfizmusok többsége csak gyenge összefüggést mutat a különböző klinikai változókkal, hiszen olyan géneket kódolnak, melyek csak módosítják a kódolt gén expresszióját és/vagy funkcióját, és a hatás kifejlődéséhez számos más transzporter vagy metabolikus folyamat is hozzájárul. Eredményeink mégis egy kis cseppet képezhetnek a genetikai információk tengerében és segíthetik a jövőben a kemoterápiás protokollok tervezését. Eddigi munkánk segített a korábban leírt polimorfizmusok klinikai jelentőségének felmérésében, és sikerült meghatároznunk egy olyan kicsi, de különösen veszélyeztetett betegcsoportot (*ABCB1* 3435TT+*ABCG2* 421A), akikben az idegrendszeri szövődmények veszélye különösen nagy.

A nemzetközi irodalomban egyre elfogadottabb az a nézet, hogy a különböző efflux transzporterek csökkent funkciója a karcinogén hatású szerek és ugyanakkor a kemoterápiás szerek lassabb ürüléséhez és így magasabb szervezeten belüli koncentrációjához vezethetnek. Ez egyrészt fokozhatja a daganatok kialakulásának kockázatát, másrészt jobb kemoterápiás hatékonysághoz és esetleg több toxicitáshoz vezethet (Szakacs *et al.*, 2008) (Stanulla *et al.*, 2005). A mi eredményeink is megerősíteni látszanak ezen elképzeléseket.

Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a mi vizsgálatainknak is, ahogy a legtöbb hasonló témájú közleménynek is, megvannak a gyenge pontjai. Különösen a retrospektív adatgyűjtés jelent nehézségeket, mert sokszor technikai okok miatt (pl. árvíz, beázás), elvesznek korábbi dokumentációk, ill. megsemmisülnek biológiai anyagok. A korán meghaltak pl. alulreprezentáltak a mintánkban (az indukcióban elvesztett gyermekek egy részétől nincs genetikai minta). Így aztán a túlélési görbék pl. csak egymáshoz viszonyítva értékelhetők, mert a görbék jobb eredményeket mutatnak a valóságnál. Másrészt azt kell

feltételeznünk, hogy a hiányzó adatok viszonylag egyenletesen oszlanak meg a különböző genotípusok között, így azért bizonyos következtetések levonására van lehetőségünk. Nagy jelentősége van a jelenleg is zajló prospektív nemzetközi adatgyűjtésünknek, mert reményeink szerint nagyszámú és megbízhatóbb mintán tudjuk majd a feltett kérdéseket a jövőben vizsgálni.

VI/3/3. GCR polimorfizmusok hatása a toxicitásra és a terápiás válaszra

Az irodalomban szinte alig van vizsgálat arra vonatkozóan, hogy az általunk vizsgált, a GCR érzékenységét megváltoztató polimorfizmusok hogyan befolyásolják ALL-ben a szteroidok terápiás hatásait és mellékhatásait. Ez annál is inkább meglepő, hiszen más betegcsoportokban és más betegségekben a különböző GCR farmakogenetikai eltéréseknek széles irodalma van (l. irodalmi összefoglaló).

Saját vizsgálatainkban két, potenciálisan a szteroidok iránti érzékenységet fokozó (N363S és BCL1), valamint egy, a szteroid érzékenységet csökkentő (ER22/23EK) polimorfizmust tudtunk vizsgálni gyermekkori limfoid leukémiás betegekben. A talált allélfrekvenciák megfeleltek az irodalomban leírtakkal és Hardy-Weinberg eloszlást mutattak.

A polimorfizmusok összefüggései a toxicitással

A polimorfizmusok közül 363S/1220G heterozigóta genotípust 9,2 %-ban (homozigóta nem volt) ER22/23EK heterozigótát 3,5 %-ban (homozigóta nem volt), és BCL1:CG heterozigótát 41 %-ban, míg *BCL1:GG* homozigótát közel 12 %-ban találtunk. A BCL1 polimorfizmus esetén olyan nagy volt a G-allél gyakorisága, hogy így akadtak olyan betegek is, akik nemcsak homozigóták voltak a G-allélra, de egyidejűleg N363S polimorfizmus hordozók is voltak, így ezt az SNP kombinációt külön is elemeztük.

Vizsgálatunkban, az irodalomban először mutattuk ki, hogy a 363S polimorfizmus hordozása esetén szignifikánsan nagyobb valószínűséggel fordul elő a májkárosodás (GrIII/IV GPT, GGT vagy bilirubin emelkedés), mint a nem hordozókban (31% vs 11%).

Eredményünk összhangban áll azon irodalmi adatokkal, melyek szerint ez a polimorfizmus megnöveli a receptor transzaktivációs kapacitását (Jewell *et al.*, 2007) és így a glukokortikoidok iránti érzékenységet (Cellini *et al.*, 2010) (Roussel *et al.*, 2003).

Az ER22/23EK polimorfizmus és a hepatotoxicitás között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot. Irodalmi adatok sincsenek ezen polimorfizmus és a májfunkciók kapcsolatáról.

Ez az SNP csökkent transzaktivációs kapacitást eredményez a glukokortikoid receptorban, mely a szervezet szteroidok iránti érzékenységének csökkenését eredményezi.

A mi adataink alapján is az ER22/23EK polimorfizmus tendencia-szerűen inkább a mellékhatások szempontjából protektív hatást mutat.

A BCL1 polimorfizmus vizsgálata során (a G allélra heterozigóta, homozigóta vagy 363S polimorfizmussal kombinálva) nem mutatkozott szignifikáns korreláció a hepatotoxicitással. A GG homozigóta betegek esetén ugyan nagyobb valószínűséggel fordult elő hepatotoxicitás mint a nem homozigótákban (30% vs. 16%), de a különbség nem volt szignifikáns.

Az irodalmi adatok alapján a BCL1 polimorfizmus megnövekedett glukokortikoid érzékenységgel járhat, de a patomechanizmus egyelőre tisztázatlan (Manenschijn *et al.*, 2009). A szteroidok a májkárosító hatást úgy hozhatják létre, hogy fokozzák a lipolízist, emelik a vér zsírsavszintjét és így zsírmájat és emelkedett transzamináz értékeket idézhetnek elő (Shpilberg *et al.*, 2012).

A glukokortikoidok, természetesen a cukorháztartás befolyásolása révén is hatnak a máj metabolikus folyamataira. A szteroidok talán legismertebb mellékhatása a zsír- és szénhidrát anyagcserében bekövetkező kóros állapotok (emelkedett zsír és vércukor szintek, hiperinzulinizmus), elhízás, diabetes (Anil *et al.*, 2014).

Saját eredményeink azt mutatták, hogy a mutáns 363S genotípus esetén szignifikánsan gyakrabban jelentkezett magasabb éhomi vércukorszint, glukozúria vagy inzulin terápiát igénylő diabétes (19% vs 4%), ami megfelelhet az SNP szteroid érzékenységet fokozó hatásának.

Az irodalmi adatok jó része is igazolja a polimorfizmus okozta kifejezettebb glukokortikoid mellékhatásokat és kedvezőtlen metabolikus profilt (Roussel *et al.*, 2003) (Lin *et al.*, 2003b).

Az ER22/23EK esetén azt találtuk, hogy a hordozók között cukor anyacserezavarra utaló eltérés egyetlen esetben sem mutatkozott, de a hordozókban is csak 4 %-ban fordult elő.

Az irodalmi adatok alapján azt várhatnánk, hogy a hordozók esetében alacsonyabbak az éhomi inzulinszintek, nagyobb az inzulin érzékenység (van Rossum *et al.*, 2002), és ezen adatok alapján kedvezőbb metabolikus állapot és csökkent szteroid érzékenység feltételezhető (van Rossum *et al.*, 2004) (Manenschijn *et al.*, 2009) (van Winsen *et al.*, 2007).

Saját vizsgálatainkban mi nem találtunk kapcsolatot a BCL1 G allélra homozigóta vagy heterozigóta esetekben sem a szénhidrát anyagcsere paramétereivel. Vannak ehhez hasonló közlések az irodalomban (Kuningas *et al.*, 2006) (Clement *et al.*, 1996). Kutatások egy része viszont arról számol be, hogy a BCL1 G-allélja megnövekedett BMI értékekkel jár és obesitásra hajlamosít (Tremblay *et al.*, 2003).

Szintén nem mutatkozott szignifikánsan pozitív összefüggés az N363S és a BCL1:GG kombinált genotípus és a toxicitások között. Az a tendencia talán megfigyelhető, hogy a

kombinált genotípus esetén nagyobb a valószínűsége a szénhidrát anyagcserezavarának (22% vs 6%).

A magas vérnyomás hajlamosító tényezőit vizsgálva, egyik polimorfizmus esetén sem találtunk szignifikáns összefüggést. Egyedül egy olyan tendencia mutatkozott, hogy a 363S genotípus esetén valamivel nagyobb arányban fordult elő hipertónia (28% vs 18%), de ez a különbség sem volt szignifikáns.

Az irodalmi adatok ezen a téren meglehetősen ellentmondóak. Van olyan közlés, ahol találtak összefüggést a magasvérnyomás, a szív-érrendszeri károsodások és az N363S polimorfizmus között, és van olyan, ahol viszont nem (Lin *et al.*, 2003b) (Lin *et al.*, 2003a).

Az ER22/23EK esetén nem találtunk hipertóniás beteget, míg a polimorfizmust nem-hordozók körében viszont 20 %-ban volt átmeneti kezelést igénylő magas vérnyomás.

Az irodalmi adatok nagyobb része kedvező metabolikus hatást ír le ezzel az SNP-vel kapcsolatban (van Rossum *et al.*, 2004) (Koeijvoets *et al.*, 2006) (Manenschijn *et al.*, 2009) (Kuningas *et al.*, 2006). A mi adataink is inkább ezen kedvező hatások irányába mutatnak.

A BCL1 génpolimorfizmus egyik csoportja sem volt összefüggésbe hozható az emelkedett vérnyomás értékekkel. Korábbi kutatások találtak pozitív összefüggést a magasvérnyomás, a magasabb inzulin szint és a BCL1 G-allél között (Watt *et al.*, 1992).

A glukokortikoidok egy másik lehetséges mellékhatása, az encefalopátia/neuropátia tekintetében eredményeink nem mutattak összefüggést az GCR N363S és a BCL1 polimorfizmusai és az idegrendszeri hatások között (valamivel több mellékhatást észleltünk a variáns allélt hordozókban, de a különbség nem volt szignifikáns)

Az irodalomban találunk pozitív és negatív közléseket egyaránt. Egyes kutatások a 363S genotípus esetén gyakrabban találtak depresszióra utaló magatartásbeli változásokat (Brouwer *et al.*, 2006) (van Rossum *et al.*, 2006), azonban mások hasonló eredményeket nem találtak (Szczepankiewicz *et al.*, 2011).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ER22/23EK SNP-re heterozigóta gyermekek körében a nagy dózisu szteroid terápia mellett nem fordult elő idegrendszeri toxicitás, míg a vad típust hordozókban közel 9 %-ban fordult elő encefalopátia vagy neuropátia.

Ez az eredmény talán párhuzamba vonható azon irodalmi adattal, mely a polimorfizmus kedvező idegrendszeri és pszichés hatásait hangsúlyozza (van Rossum *et al.*, 2008).

Saját vizsgálatainkban elemeztük a potenciálisan szteroidok által okozott toxicitások halmozódását is egyes betegeknél. A N363S polimorfizmus esetén a mutáns allélt hordozók között szignifikánsan több olyan beteget találtunk, akinek volt valamilyen toxicitása vagy

többszörös toxicitása volt. A másik két vizsgált polimorfizmus esetén ilyen összefüggéseket nem találtunk.

VI/3/4. A polimorfizmusok összefüggései a terápiás hatással és a túléléssel

Az irodalomban nem találtunk még olyan közleményt, mely összefüggést talált volna a 8. napi prednizolon válasz és a különböző *GCR* polimorfizmusok között gyermekkori ALL-ben.

Az N363S polimorfizmus az irodalmi adatok megnövekedett glukokortikoid iránti érzékenységgel volt összefüggésbe hozható, így nem volt meglepő, hogy minden variáns allélt hordozó betegünkben jó szteroid választ kaptunk (100 %), szemben a másik csoporttal, ahol csak 92 %-ban volt jó a terápiás válasz. Másrésről, a hordozók szignifikánsan jobb túlélést mutattak (EFS és OS egyaránt), vagyis az 363S/1220G SNP hordozás kedvező prognosztikai faktor lehet.

Meglepő módon, az ER22/23EK polimorfizmus esetén sem jelentkezett egyik hordozónál sem rossz prednizolon válasz. Itt az irodalmi adatok alapján épp ellenkező eredményt várnánk (bár az esetszám nagyon alacsony).

A potenciálisan csökkent glukokortikoid hatással kapcsolatba hozható ER22/23EK polimorfizmus esetében nem találtuk szignifikáns összefüggést a túlélésben. A hordozók esetén egy kedvezőtlenebb tendenciát figyelhattunk meg (megint csak valószínűleg a kis esetszám miatt nem szignifikáns eltérés), mely jelezhet esetleg relatív glukokortikoid rezisztenciát.

A *BCL1* polimorfizmus esetén érdekes megfigyelés volt, hogy a polimorfizmusra heterozigóta betegek (CG) körében nem, de homozigóta esetben (GG) már nem jelentkezett rossz prednizolon válasz. Ez azt valószínűsíti - ahogy az N363S polimorfizmusnál is -, hogy a megnövekedett glukokortikoid érzékenységgel jár a polimorfizmus. A *BCL1*-N363S együttes előfordulása esetén sem találtunk rossz szteroid választ, ami talán összefüggésbe hozható azzal, hogy mindkét polimorfizmus növeli a glukokortikoidok iránti érzékenységet.

Nem találtunk korrelációt a túlélés (5 éves EFS vagy OS) és a *BCL1* G-allélja között.

Az irodalomban egyetlen szignifikáns összefüggést találunk a vizsgált polimorfizmusok és a gyermekkori ALL túlélése között. Érdekes módon kedvezőtlen összefüggést találtak *BCL1*:GG homozigóta esetek és a túlélés között (Fleury *et al.*, 2004). Más irodalmi adatok nem találtak összefüggést az általunk is vizsgált polimorfizmusok és a túlélés között (Namazi *et al.*, 2011) (Labuda *et al.*, 2010) (Tissing *et al.*, 2005). Egy frissen megjelent tanulmányban a *GCR* nem-kódoló régiójában találtak 2 SNP-t (rs41423247 és rs7701443), melyek a

prednizolon válasszal összefüggésbe voltak hozhatók gyermekkori ALL-ben (Xue *et al.*, 2015). Egy nemrégiben megjelent közleményben a szerzők arról számolnak be, hogy az ER22/23EK polimorfizmust hordozókban a szteroid kezelést követő mellékvese elégtelenség rövidebb volt, mint a vad típust hordozókban, és ez csökkent érzékenységet jelethet mellékvesekéreg elégtelenségre glukokortikoid terápia után (de Ruiter *et al.*, 2014). Ugyanebben a munkában a BCL1 homozigóta variánsok esetében viszont fokozott érzékenységet feltételeznek, mivel a homozigóta variáns hordozókban a mellékvesekéreg elégtelenség szignifikánsan hosszabb volt az egyéb genotípusú egyénekhez képest.

Azok az eredmények, miszerint az ER22/23EK SNP esetén szignifikáns összefüggéseket nem találtunk sem a toxicitás, sem a terápiás válasz esetén (csak esetleg tendenciákat figyelhettünk meg), valószínűleg azzal hozható összefüggésbe, hogy a variáns allélt hordozó betegek száma nagyon alacsony volt ($n=10$). Nagyobb betegszámú vizsgálat szükséges (és egy nemzetközi együttműködés keretein belül ez folyamatban is van), hogy egyértelműen meg tudjuk mondani ezen SNP potenciális hatásait gyermekkori ALL-ben.

A BCL1 esetén sem kaptunk szignifikáns eltéréseket, bár itt a különböző genetikai variációk nagyobb számban fordultak elő. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy csak kb. 80 beteggel kevesebb adatunk volt a BCL1 polimorfizmusai esetén, ami főleg technikai problémáknak volt betudható. Ugyanakkor feltételezni lehet, hogy a két betegpopuláció (a 336 fő és a 257 fő) nem teljesen összehasonlítható. Hibaforrás lehet, hogy esetleg a meghalt, vagy több toxicitással rendelkező, rosszabb túlélést mutató betegek estek ki a vizsgálatból (rajtunk kívülálló okok miatt), mert a kisebb betegcsoport túlélési eredményei és a 8. napon mutatott terápiás válasz eredményei jobbak az átlagnál és a nagyobb betegszámú minta adatainál is. Vagyis nem kizárt, hogy a negatív eredmények a minta hibáiból származnak. Itt is ismételt, egy időszak teljes betegpopulációját magában foglaló, vizsgálat szükséges a végső következtetések levonásához.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a GCR N363S polimorfizmus fennállása esetén szignifikánsan több szteroid toxicitással kell számolni, ugyanakkor a terápiás válasz jobbnak tűnik és így potenciálisan jobb túléléssel járhat együtt gyermekkori ALL-ben. Ezen összefüggéseket elsőként mutattuk ki az irodalomban. Az ER22/23EK polimorfizmus esetén kevesebb toxicitást észleltünk, ugyanakkor a terápiás válasz mégis inkább kedvezőnek mutatkozott (nem szignifikáns eltérések valószínűleg a kis esetszám miatt). Végül a BCL1 polimorfizmusai tekintetében jelen vizsgálatban nem találtunk igazán egyértelmű összefüggéseket sem a toxicitásra, sem a szteroidok hatékonyságára vagy a túlélésre vonatkozólag (az irodalmi adatokkal ellentétben).

VI/3/5. MTX kezelések háttérében álló genetikai tényezők lehetséges szerepe ALL-ben

Munkánk következő fázisában a folsav/metotrexát anyagcserét potenciálisan befolyásoló genetikai tényezőket vizsgáltuk (14 gén 63 polimorfizmusát).

Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy az *ARID5B* gén polimorfizmusai közül kettő (*rs4948502*, *rs4948496*) szignifikáns összefüggést mutat a szérumban MTX és 7-OH-MTX szintekkel. Ez az összefüggés különösen a kisebb adag (2 g/m^2) esetén volt egyértelmű. Az *rs4948496* CC genotípussal rendelkezőkben magasabbak voltak a szérumban MTX szintek. A másik polimorfizmus (*rs4948502*) esetén csak a 7-OH-MTX szintekkel és az $\text{AUC}_{7\text{-OH-MTX}}$ értékekkel kaptunk szignifikáns, de nem egyértelmű eltéréseket (2 g/m^2 esetén a CC genotípus magasabb 7-OH-MTX szintekkel, míg 5 g/m^2 -esetén ugyanez a genotípus alacsonyabb 7-OH-MTX szintekkel mutatott összefüggést). A különbség oka lehet a vese (és az epe) kiválasztó képességének különbsége, a szekréció telítődése ill. indukciója kisebb és nagyobb gyógyszeradagok esetén. Minden esetre a jelenleg folyó nagy nemzetközi tanulmányban több ezres betegszámon vizsgáljuk ugyanezt a kérdést és reményeink szerint néhány év múlva pontos választ kapunk a különböző, általunk feltárt, genetikai variánsoknak a MTX metabolizmusában betöltött pontos szerepére.

Korábbi irodalmi adatok alapján az *ARID5B* gén polimorfizmusai kapcsolatba voltak hozhatók az ALL egyes altípusainak (pl. pre-B/hiperdiploid) kialakulásával, és az ALL incidenciájára jellemző rasszbeli különbségekkel (Trevino *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2012). Ráadásul még az is feltételezhető, hogy a malignitás (leukémia) kialakulása és a kezelésre adott válasz kapcsolatba hozhatók egymással. Leírták ugyanis, hogy az *ARID5B* gén azon genetikai variánsai (*rs10821936*, *rs10994982*), amelyek a B-hiperdiploid ALL-re való hajlammal mutattak összefüggést, magasabb MTX-PG akkumulációval is jártak HD-MTX kezelések során. Ismert továbbá, hogy pre-B-sejtes ALL hiperdiploid alcsoportja jobban reagál a MTX kezelésekre és jobb túléléssel jár (Trevino *et al.*, 2009b). Mások viszont azt találták, hogy azon polimorfizmusok, melyek a leukémia kialakulására hajlamosítanak, nagyobb relapsus rátával és így rosszabb túléléssel is járnak (Xu *et al.*, 2012). Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálat során kimutatta, hogy az *ARID5B* gén bizonyos polimorfizmusai (*rs10821936*, *rs7089424*, *rs4506592*) összefüggést mutatnak a gyermekkori ALL kialakulásával (Lautner-Csorba *et al.*, 2012). Ezt több más közlemény is megerősíti (Linabery *et al.*, 2013) (Emerenciano *et al.*, 2014) (Evans *et al.*, 2014). Egy nem régen megjelent meta-analízis alapján pedig az *ARD5B* *rs10994982* és *rs7089424* polimorfizmusai

hozhatók szignifikáns összefüggésbe a gyermekkori ALL kialakulásával (Zeng *et al.*, 2014). Jelen vizsgálatainkban is ezen polimorfizmusok a változó szelekciók során összefüggést mutattak a szérumszintekkel, viszont más statisztikai módszerekkel (döntési fák, lineáris modellek) ezen eredményeket nem tudtuk megerősíteni. Mi, ezektől eltérő SNP-k esetén találtunk egyértelműbb szignifikáns összefüggéseket (rs4948502, rs4948496). Minden esetre ezen gén (*ARID5B*) ill. ezen gén variánsai nagy valószínűséggel komoly szerepet játszhatnak a MTX metabolizmusában, így a jövőben rendszeres vizsgálatuk javasolt.

Az *SLCO1B1* gén rs4149056 polimorfizmusa is összefüggést mutatott – eredményeink szerint - a szérumszintekkel. Itt is a 2 g/m² MTX adagok mellett figyeltünk meg összefüggést. A C allél megléte esetén magasabb MTX szinteket mértünk, mint a TT genotípus esetén, és ez arra utalhat, hogy a C allél meglétekor csökkent MTX clearance-szel és elhúzódó MTX hatással lehet számolni. Hasonló adatokat találunk az irodalomban is (Trevino *et al.*, 2009a; Ramsey *et al.*, 2013) (Radtke *et al.*, 2013). Mások az *SLCO1B1* gén egyéb polimorfizmusai (rs11045879, rs4149081) és a magasabb szérumszintek között találtak kapcsolatot (Lopez-Lopez *et al.*, 2011; Lopez-Lopez *et al.*, 2013). A legfrissebb adatok szerint a gén polimorfizmusai összefüggést mutattak bizonyos szérumszintcsökkentők (sztatinok) gyógyszer-szintjeivel (nagyobb AUC egyes SNP-k esetén) (Birmingham *et al.*, 2015). Mások a nem-szteroid gyulladásgátlók (aszpirin) által okozott ulcus és gyomorvérzés valamint az *SLCO1B1*1b* haplotípus (rs2306238) között találtak kapcsolatot (Shiotani *et al.*, 2014).

A mi adataink szerint az *SLCO1B1* gén rs4149056 polimorfizmusa a MTX ürülésének prediktora lehet.

Vannak adatok arra vonatkozólag, hogy az *SLC19A1* gén variánsai és a MTX szintek között összefüggés lehet (Laverdiere *et al.*, 2002; Lopez-Lopez *et al.*, 2013) (Niedzielska *et al.*, 2013). Mi nem találtunk kapcsolatot a vizsgált genotípusok és a MTX vagy 7-OH-MTX szintek között.

A legújabb irodalmi adatok alapján az *ABCC2* gén egyes polimorfizmusai is kapcsolatban állhatnak a szérumszintekkel akut limfoid leukémiában (Liu *et al.*, 2014b) (Sharifi *et al.*, 2014).

Elemeztük a HD-MTX kezeléseket követő **mellékhatások** lehetséges genetikai kapcsolatait is. Az irodalmi adatok (és saját adataink is) meglehetősen szerteágazóak és ellentmondásosak e tekintetben.

Eredményeink alapján elsőként írtuk le, hogy az *ARID5B* gén rs4948502 és az *SLC19A1* gén rs7499 polimorfizmusa korrelációt mutat a MTX kezelést követő májkárosodással.

Ugyanakkor találtunk egy kis csoportot, ahol súlyos májkárosodást (emelkedett bilirubin szintet) nem észleltünk (rs7499 AA + rs4948502 TT). A már megjelent közlemények alapján az rs7499 polimorfizmus (több másik mellett) összefüggést mutatott reumatoid arthritisben a MTX kezelés (kis adagú orális) és a gasztrointesztinalis toxicitás között (Lima *et al.*, 2014a) (Lima *et al.*, 2014b). Az irodalomban más polimorfizmusokról is találunk adatokat. Az rs1051266 polimorfizmus gasztrointesztinalis, máj-, és csontvelői toxicitással is kapcsolatba volt hozható (Kishi *et al.*, 2007; Gregers *et al.*, 2010; Yee *et al.*, 2010). Mások viszont csökkent leukopénia rizikót találtak ezen polimorfizmus mellett hematológiai malignitásokban (Faganel Kotnik *et al.*, 2011). Saját adatainkban mi nem találtunk összefüggést az rs1051266 és a MTX szintek vagy a toxicitás között. Léteznek olyan vizsgálatok, amelyek nem találtak korrelációt a MTX kezelések toxicitása és az *SLC19A1* gén polimorfizmusai között (Kishi *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Faganel Kotnik *et al.*, 2010). Mások az *SLCO1B1* rs2306238 genotípus és az antituberkulotikus gyógyszereknél észlelt májkárosodás között találtak összefüggést (Chen *et al.*, 2015). Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az *SLC19A1* és az *SLCO1B1* szerepet játszhat a MTX metabolizmusában és toxicitásában.

A **nefrotoxicitás** tekintetében saját vizsgálatainkban szignifikáns összefüggést találtunk az 5 g/m² MTX kezeléseket követő nefrotoxicitás és az ***SLC22A8* gén rs4149183** polimorfizmusa között (CART elemzés). Az idősebb (9 év feletti) és CC genotípusú betegek mindegyikében kialakult a vesekárosító hatás, míg a fiatalabbak egyikében sem volt vesefunkció eltérés. Mindez valószínűleg egyrészt azzal magyarázható, hogy az *SLC22A8* genetikai variánsai hatással lehetnek a MTX clearance-re (Lopez-Lopez *et al.*, 2013), másrészt ismert adat – mi is kimutattuk –, hogy az idősebb gyermekekben lassabb a MTX ürülése és több a mellékhatás (Groninger *et al.*, 2004; Plard *et al.*, 2007; Csordas *et al.*, 2013).

A hematológiai toxicitást vizsgálva, a következőket találtuk. A MTX kezeléseket (2 g/m²) követő **granulocitopénia szignifikáns összefüggést mutatott az *MTR* gén rs3768142 polimorfizmusával** (kevesebb toxicitás a T allél hordozása esetén). Hasonló adat az **irodalomban ezidáig nem volt ismeretes**. A gén egy másik SNP-jéről, az rs1805087-ről viszont kimutatták, hogy OSC betegekben kapcsolatba hozható a hematológiai és/vagy gasztrointesztinális károsodással (Patino-Garcia *et al.*, 2009). Mások viszont ALL-ben nem találtak összefüggést a genotípusok és a mellékhatások között (Faganel Kotnik *et al.*, 2011).

Saját tanulmányunkban az *ARID5B* gén polimorfizmusa (rs4948487) szignifikáns kapcsolatba volt hozható a 36 órás 7-OH-MTX szintekkel, valamint a MTX kezelések utáni

hipoproteinémiával is. A hipoproteinémia jelentősen gyakrabban fordult elő az rs4948487 AA genotípusa esetén.

Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az ***MTHFD1* gén rs1076991 polimorfizmusa is kapcsolatot mutat a hipoproteinémia kialakulásával** (a GG genotípus esetén több alacsony összfehérje szint 2 g/m^2 MTX-nál). **Ezt az összefüggést is elsőként írtuk le HD-MTX kezeléseket követően.** Ezen polimorfizmust a velőcső záródási rendellenességekkel hozták összefüggésbe (Greene *et al.*, 2009). Az *MTHFD1* gén másik gyakran vizsgált rs2236225 polimorfizmusa az eddig rendelkezésre álló irodalmi adatok szerint inkább csökkent hepatotoxicitással, de emelkedett anémia rizikóval volt kapcsolatba hozható (Erculj *et al.*, 2012; Windsor *et al.*, 2012).

Munkánk során a még vizsgált *SLCO1B1* rs4149056 a kialakult mellékhatásokkal nem állt szignifikáns kapcsolatban.

További vizsgálatokat igényel az a megfigyelés is, amely több esetben volt észlelhető, miszerint bizonyos farmakogenetikai összefüggések csak 2 g/m^2 , míg mások csak 5 g/m^2 vagy mindkét dózis esetén voltak kimutathatóak. Tekintettel arra, hogy a nemzetközi gyakorlat nagyon széles skálán használja a MTX-ot, és már régóta alkalmazott protokollok esetén sem egyértelmű az evidencia, hogy milyen betegségben, milyen betegnek, mekkora adagot kell kapnia, a jövőben induló és már zajló tanulmányoknak prospektív módon kell a kérdéseket megválaszolni (pl. ALLIC 2009 protokoll Magyarország vezető szerepével). Saját vizsgálatainkkal számos eddig nem ismert tényezőre irányítottuk rá a figyelmet.

Összefoglalásul elmondható, hogy a MTX kezelések hatékonysága és toxicitása mögött számos genetikai tényező állhat (Kodidela *et al.*, 2014), de az adatok nem koherensek, ellentmondásosak, egyértelmű következtetések nehezen vonhatók le. Valószínűleg nagy biostatistikai elemzésekre, ismételt, nagy betegszámú vizsgálatokra és hosszú időre van még szükség, hogy a klinikai gyakorlatban hasznosítható és a terápiás döntéseket elősegítő információkhoz jussunk.

VI/3/6. MTX kezelések háttérében álló genetikai tényezők potenciális szerepe OSC-ban

Az akut leukémiához képest egy teljesen más betegcsoportban, oszteoszarkómás betegekben is tanulmányoztuk a HD-MTX farmakogenetikai összefüggéseit. A gyógyszeradagolás módja és a dózis itt alapvetően más, mint leukémiás betegek esetén (12 g/m^2 4-6 órán keresztül) és a potenciális egyéb károsító, befolyásoló tényezők is mások (más citosztatikumok, más szupportív szerek, műtétek stb.).

A farmakokinetika és toxicitási jellemzők egyedi sajátosságait itt is befolyásolják természetesen „külső” tényezők úgymint a párhuzamosan adott egyéb gyógyszerek, hidrálás, pH, vese- és májfunkciók, egyéb kórélettani és anatómiai sajátosságok, valamint ún. „belső” tényezők is, melyek a gyógyszerek egyénre jellemző sorsát befolyásoló genetikai faktorok (Suthandiram *et al.*, 2014). Mi első sorban a MTX anyagcseréjét potenciálisan befolyásoló gének polimorfizmusait vizsgáltuk: *ABC transzporterek*, *GGH*, *SLC19A1*, *SXR*.

Eredményeink első csoportját összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *GGH* -401TT genotípusú betegekben a MTX-eliminációja gyorsabb és a súlyos mellékhatások előfordulása ritkább, mint a -401CC/CT genotípust hordozóknál. Az *SLC19A1* 80AA genotípusú esetekben a súlyos mellékhatások előfordulása gyakoribb volt. A legkifejezettebb toxicitást az *SLC19A1* 80AA és a *GGH* -401CC/CT kombinációja mellett észleltük, vagyis azokban az esetekben, ahol a toxikus hatásokért felelős *SLC19A1* 80A allél van jelen és ugyanakkor hiányzik a *GGH* -401TT genotípus, mely csökkent toxicitással és bizonyos „védő” hatással hozható összefüggésbe. Mindezek alapján az *SLC19A1*-nek a MTX kinetika kezdeti fázisában lehet szerepe, míg a *GGH*-nak az ún. celluláris eliminációs fázisban.

A *GGH* a MTX sejtből történő eltávolításában vesz részt. A -401TT genotípus esetén a génexpressziós aktivitás fokozódását, a MTX-PG szint csökkenését, gyorsabb MTX eliminációt, illetve kevesebb súlyos mellékhatást figyeltek meg (Dervieux *et al.*, 2004).

A mi vizsgálataink megerősítették a nemzetközi adatokat. A -401TT esetén a 48 órás MTX szérumszintek és a májtoxicitás szignifikánsan alacsonyabbak voltak a C allélt hordozókhoz képest. Asszociációs és BMLA elemzésünkben is összefüggést találtunk a variáns allél hordozás és a MTX farmakokinetikai paraméterei és toxicitása között. Ugyanakkor azonban a fokozott *GGH* aktivitás miatt gyorsabban szabadul fel a folsav is, melynek eredményeképpen megnőhet az antifolátokra való érzékenység (Cole *et al.*, 2001) (Schneider *et al.*, 2006) (Galivan *et al.*, 2000), vagyis a *GGH* egyértelmű hatását az antifolátok hatékonyságában nehéz megmondani.

Az *SLC19A1* (korábbi nevén: redukált folát karrier, RFC1) a MTX sejtmembránon keresztüli transzportjában játszik szerepet. Az *SLC19A1* AA genotípus esetén több MTX áramlik be a sejtbe, mely jobb terápiás választ eredményez (Chango *et al.*, 2000) (Kung *et al.*, 2014) (Krajinovic *et al.*, 2004a), ugyanakkor a toxicitás előfordulása is gyakoribb (Gregers *et al.*, 2010) (Faganel Kotnik *et al.*, 2011) (Suthandiram *et al.*, 2014) (Krajinovic *et al.*, 2004a). Továbbá az *SLC19A1* 80 AA genotípusú ALL-es gyermekek 50%-kal nagyobb eséllyel maradnak remisszióban, mint G allélt hordozó betegtársaik és ugyanebben a csoportban

szignifikánsan több csontvelő károsodás fordult elő, mint a G allélt hordozó genotípus csoportban (Gregers *et al.*, 2010). Pszoriázisban szenvedő betegeknél figyelték meg, hogy az *SLC19A1* 80A allél jelenléte összefüggésbe volt hozható a MTX-indukálta hepatotoxicitás kialakulásával (Campalani *et al.*, 2007).

Fordítva vizsgálva, az *SLC19A1* alacsony szintű expressziója és a csökkent MTX felvétel között kapcsolat mutatható ki (Chango *et al.*, 2000). A MTX sejtbe áramlásáért felelős transzportáló mechanizmusok defektusa fontos tényező a MTX-rezisztencia kialakulásában ALL-es gyermekek esetében (Longo-Sorbello *et al.*, 2001). Összefüggést találtak a relapszus aránya ill. plazma MTX szintje és az SNP között.

Ugyanakkor a St. Jude Gyermekkórház tanulmányában nem tudtak szignifikáns kapcsolatot kimutatni az *SLC19A1* 80 AA genotípus és a plazma MTX koncentráció között gyermekkori ALL-es betegeknél (Kishi *et al.*, 2007). Egy kínai munkacsoport is hasonló negatív eredményekre jutott (He *et al.*, 2014).

Egy frissen megjelent tanulmányban oszteoszarkomás betegeken a *RFC1* gén rs1051266 polimorfizmusa (GG) jobb túléléssel volt összefüggésbe hozható (Jabeen *et al.*, 2015).

Ugyanebben a tanulmányban a *DHFR* rs1053129 GG genotípusa emelkedett metasztázis rizikóval járt együtt, míg az *MTHFR* 677C allél a májtoxicitással asszociált.

Mások 5 olyan gént találtak (*FasL*, *MSH2*, *ABCC5*, *CASP3*, *CYP3A4*), melyek összefüggésbe voltak hozhatók az OSC túlélésével (Hagleitner *et al.*, 2015).

A DNS repairben szerepet játszó gének és a glutation-S-transzferáz gének szintén szerepet játszhatnak az oszteoszarkomás betegek túlélésében (Goricar *et al.*, 2015a). Ugyanezen munkacsoport az *SLCOB1* és a DNS polimeráz *REV1* gének bizonyos SNP-i és az OSC túlélése között is asszociációt írt le (Goricar *et al.*, 2014) (Goricar *et al.*, 2015b).

Újabb vizsgálatok arra utalnak, hogy a mikroRNS-ek szabályozásában szerepet játszó gének polimorfizmusai és a túlélés között szintén lehet kapcsolat (Bilbao-Aldaiturriaga *et al.*, 2015) (Weng *et al.*, 2015).

Mi azt találtuk, hogy az *SLC19A1* 80AA genotípusú betegcsoportban alacsonyabb volt a 24 órás MTX clearance, míg a 48 órás gyógyszerszintekben nem volt különbség a különböző genotípus csoportok között. Az *SLC19A1* 80G>A polimorfizmusát egyváltozós asszociációs, illetve egyváltozós és többváltozós BMLA vizsgálatunkban nem találtuk releváns hatásúnak a MTX farmakokinetika rendszerére. Ugyanakkor a súlyos akut májkárosodás előfordulása gyakoribb volt az *SLC19A1* 80AA homozigóta betegeknél, mint a G allélt hordozóknál. A különbség erősödött azoknál a betegeknél, akik *SLC19A1* 80AA + *GGH* -401CC/CT

genotípusúak voltak. A túlélés vonatkozásában mi nem tudtunk szignifikáns különbségeket kimutatni.

Vizsgálataink következő szakaszában a MTX hatásmechanizmusában potenciálisan szerepet játszó 12 gén 46 polimorfizmusát vizsgáltuk. A kizárások után 9 gén 29 polimorfizmusára vonatkozólag tudtunk releváns adatokat nyerni. Több olyan polimorfizmust is találtunk, melyek összefüggésbe voltak hozhatók a MTX farmakokinetikai paramétereivel és/vagy toxicitásával. Ezek közül több olyan is akadt, amit a MTX-szal összefüggésben még nem írtak le.

A gyógyszerek anyagcseréjében alapvető szerepet játszó ABC transzporterek (Suthandiram *et al.*, 2014) közül 6 ABC gén 21 SNP-jét tudtuk vizsgálni. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a talán legtöbbet vizsgált *ABCB1* rs1045642 és rs1128503 SNPk jelenléte és a MTX farmakokinetikai ill. toxicitási paraméterei között.

Az irodalmi eredmények alapján az rs1045642 variáns alléljának megléte esetén csökkent membrántranszport aktivitást és megváltozott szubsztrát specifitást írtak le a duodenumban (Hodges *et al.*, 2011) (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Az adatok alapján a 3435TT genotípus csökkentheti az *ABCB1* expressziót, és gyulladásos bélbetegségekre, tumorokra való fokozott hajlamot eredményezhet (Li *et al.*, 2006) (Martinelli *et al.*, 2014) (Schwab *et al.*, 2003). Mások összefüggést találtak az SNP jelenléte és a gyermekkori ALL túlélése között (Lu *et al.*, 2014).

Az rs1128503 SNP-ről viszonylag kevés eredmény jelent meg az irodalomban. Hatása bizonytalan, 1236CC genotípus esetén jobb gyógyszer (temozolamid) hatást írtak le agytumoros betegekben (Fung *et al.*, 2009) (Schaich *et al.*, 2009). Mások a MTX által okozott neutropénia és az rs1128503 ill az rs1045642 között találtak összefüggést (Zgheib *et al.*, 2014).

A legfrissebb adatok alapján OSC-ban az *ABCB1* TT és a *GSTP1* GG genotípusok esetén rosszabb a túlélés (OS) (Liu *et al.*, 2014a). Mások adatai alapján az *ABCB1* rs4148737, rs1128503, rs10276036 és az *ABCC3* rs4148416 polimorfizmusai és az OSC túlélése között összefüggés volt kimutatható (Caronia *et al.*, 2011).

Saját vizsgálatainkban **szignifikáns** összefüggéseket találtunk ***ABCB1* rs9282564** számú SNP-je és a MTX egyes farmakokinetikai paraméterei között. Mind az egyváltozós asszociációs, mind a BMLA elemzésünkben ezen polimorfizmus variáns (C) allélja esetén magasabb volt a MTX csúskonzentráció és a MTX AUC₀₋₄₈, mint a TT genotípusú betegekben. Hasonló eredményt az irodalomban nem találtunk, vagyis **ezen SNP potenciális hatását a MTX farmakokinetikára mi írtuk le először.**

A nemzetközi irodalomban voltak, akik szignifikáns asszociációt mutattak ki a variáns SNP megléte és a kolorektális daganatok rizikója között (Sainz *et al.*, 2011). Mások különböző gyógyszerek hatékonysága és az SNP között találtak összefüggést, fokozott gyógyszerhatást és kifejezettebb mellékhatásokat kimutatva (Jordan de Luna *et al.*, 2011) (Ray *et al.*, 2014) (Sadhasivam *et al.*, 2014).

Az *ABCC1* gént érintő, általunk vizsgált, egyik SNP sem mutatott összefüggést a MTX farmakokinetikájával a saját eredményeink alapján. Ugyanakkor egyváltozós BMLA elemzésünk szerint az rs246219 SNP kapcsolatba volt hozható a májtoxicitással.

Ismereteink szerint az *ABCC1* elsősorban a MTX vörösvértestekből a vérbe való kipumpálásért lehet felelős (Gradhand *et al.*, 2008). Egyes vizsgálók összefüggést véltek felfedezni a doxorubicin által okozott kardiotoxicitás és az rs45511401 (Gly671Val) polimorfizmus között (Jungsuwadee *et al.*, 2012) (Wojnowski *et al.*, 2005). Egy másik tanulmányban az *ABCC1* különböző polimorfizmusai különbözőképpen befolyásolták a MTX hatásokat és mellékhatásokat psoriasisban (Warren *et al.*, 2008). Az rs246240 variáns polimorfizmus hordozása esetén csökkent MTX toxicitást találtak. Ugyanebben a tanulmányban az rs2238476 homozigóta vad allélokkal rendelkező betegekben több MTX toxicitást és jobb terápiás választ láttak. Az rs35592 homozigóta vad genotípus esetén szintén jobb volt a terápiás válasz. Az rs3784862 polimorfizmus pedig csak a toxicitást befolyásolta (több mellékhatás a homozigóta vad genotípus esetén). A gén és különböző polimorfizmusai daganatokban kifejtett szerepe még nem teljesen tisztázott (Kunicka *et al.*, 2014a).

A következő lépésben a MTX-ot szállító *ABCC2* gén potenciális SNP-it elemeztük.

Valamennyi általunk vizsgált polimorfizmus összefüggést mutatott a MTX kinetikájával vagy toxicitásával.

Az *ABCC2* rs3740066 homozigóta variáns genotípus esetén a MTX AUC₀₋₄₈ értéke és a csontvelő károsító hatás kisebb volt. Továbbá a csontvelő toxicitás rizikója magasabb volt az rs2273697 és az rs717620 variáns allél jelenlétében.

Az *ABCC2* rs3740066 polimorfizmusát vizsgálva egyes szerzők nem találtak kapcsolatot a variáns (T) allél jelenléte és a MTX clearance és hatékonyság között (Hilger *et al.*, 2012) (Simon *et al.*, 2012). Mások szerint a T allél esetén csökkent carbamazepim metabolizmus mutatható ki epilepszás betegekben (Puranik *et al.*, 2013), ill. a homozigóta TT genotípus esetén a kemoterápia fokozott neurotoxicitással jár kolorektális daganatokban (Cecchin *et al.*, 2013).

Az *ABCC2* rs2273697 polimorfizmusa missense változást eredményez (vanderSchoor2014). Mi kifejezettebb MTX toxicitást találtunk az SNP jelenlétében.

Simon tanulmányában ezen polimorfizmus (A allél) sem mutatott összefüggést a MTX clearance-szel (Simon *et al.*, 2012). Egy másik tanulmányban a homozigóta AA genotípus esetén több volt a MTX által okozott gasztrointesztinalis toxicitás reumatoid artritiszes betegekben (Ranganathan *et al.*, 2008). Egy meta-analízisben, összefüggéseket találtak az rs2273697 és az rs3740066 egyes polimorfizmusai és az antiepileptikus gyógyszerek hatékonysága között (Grover *et al.*, 2013).

Mi többféle statisztikai módszerrel is relevánsnak találtuk az *ABCC3* rs4793665 polimorfizmusát a görbe alatti területtel és csúskoncentrációval is és a többváltozós elemzésben is tagja volt a MTX farmakokinetika és toxicitás rendszer Markov takarójának. Kimutatták juvenilis idiopathiás artritiszes betegekben, hogy a polimorfizmus jelenléte a nukleáris faktorok kötődésére van hatással és a variáns (T) allél jelenlétében gyakrabban volt jó MTX válasz kezelésre (de Rotte *et al.*, 2012). Vannak már biztató irodalmi adatok a túlélést befolyásoló tényezőkkel kapcsolatban is OSC-ban. Összefüggéseket találtak az *ABCB1* rs4148737, rs1128503 és rs10276036 polimorfizmusai, az *ABCC3* rs4148416 polimorfizmusa és az általános túlélés, kezelésre adott válasz tekintetében (Caronia *et al.*, 2011).

Az *ABCC10* gén polimorfizmusai saját adataink alapján nem bizonyultak releváns hatásúnak a MTX farmakokinetikájára és toxicitására.

Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy ezen gén lehet a felelős bizonyos kemoterápiás szerek (taxánok, vinka alkaloidok) rezisztenciájáért (Naramoto *et al.*, 2007) (Kathawala *et al.*, 2014b) (Domanitskaya *et al.*, 2014) (Hopper-Borge *et al.*, 2004). Jelenleg biztató klinikai kísérletek folynak tirozinkináz inhibitorokkal és foszfodiészteráz-5 inhibitorokkal, hogy a gén által okozott rezisztencia mechanizmusokat ellensúlyozzák (Kathawala *et al.*, 2014a). Az *ABCG2* gént korábban BCRP-nek is nevezték. Az *ABCG2* rs2231142 polimorfizmusa egyváltozós asszociációs elemzésünkben szignifikánsnak mutatkozott, a MTX szint felezési ideje magasabb volt a polimorfizmus ritka alléljának jelenlétében. Más tanulmányok kimutatták, hogy a 421C>A cserét és ezáltal variáns fehérjét okozó SNP esetében a drogrezisztencia tizedére csökkent a vad típusú proteinhez képest és csökkent efflux volt mérhető (Imai *et al.*, 2002). MTX-tal kezelt reumatoid artritiszes betegekben a homozigóta variáns esetében kevesebb mellékhatást észleltek (Stamp *et al.*, 2010).

Mások a gén különböző variánsainak a húgysav anyagcserére vonatkozó hatásait írták le, a T allél emelkedettebb szérumsav szintekkel jár (Sakiyama *et al.*, 2014) (Lv *et al.*, 2014).

A *NR1I2*, más néven **SXR gén** több más enzim (citokrómP) és transzporter indukciójában vesz részt. **Először írtuk le az irodalomban, hogy az rs3814055 SNP variáns (T) alléljának jelenlétében hosszabb a MTX felezési ideje ($T_{a1/2}$).**

Az irodalomban nincs túl sok adat ezen SNP klinikai szerepéről. A T allél jelenléte esetén csökkent karbamazepin clearance-t figyeltek meg epilepsziában (Puranik *et al.*, 2013). Mások a C allél jelenléte esetén találtak csökkent gyógyszerhatást vesetranszplantáció utáni ciklosporin kezelések esetén (Fanta *et al.*, 2010).

Az SXR gén további polimorfizmusait vizsgálva azt találtuk, hogy **az rs3732361 és az rs6785049 variáns alléljainak jelenlétében magasabb volt a 48 órás MTX szérumszint és kisebb volt a máj és a csontvelő károsodás** (asszociációs elemzés). Ezek az összefüggések **sem voltak eddig ismertek az irodalomban.**

Az SXR, mint a nukleáris receptor szupercsalád tagja, számos, a különböző gyógyszerek metabolizmusában szerepet játszó enzim transzkripcióját indukálja, és ezzel gyorsítja a gyógyszer clearance-t, ugyanakkor májenzim szint emelkedést is okozhat.

Az rs3732361 SNP szerepéről gyakorlatilag alig találni irodalmi adatot, szerepe mindeztáig ismeretlen.

Az rs6785049 polimorfizmus az intesztinális sejtekben a CYP3A4 expresszióját növeli (Zhang *et al.*, 2001). Egyes irodalmi adatok alapján, nem alkoholos zsírmáj esetén a polimorfizmus kapcsolatba hozható a betegség súlyosságával (Sookoian *et al.*, 2010). Másrészt a kolitisz ulcerosa rizikójával és súlyosságával hozták összefüggésbe a polimorfizmust (Andersen *et al.*, 2011).

Az általunk vizsgált SXR polimorfizmusok közül az **rs3814058** tűnik a legerősebb genetikai tényezőnek a MTX farmakokinetika és toxicitás szempontjából. Az SNP ritka alléja **összefüggésbe hozható volt a MTX csúcskoncentrációval, az AUC-vel, valamint kisebb volt a máj és csontvelő károsodás mértéke is. Az általunk észlelt kapcsolatokhoz hasonló irodalmi közlések eddig nem voltak.**

A polimorfizmus lehetséges szerepéről egyébként is kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Egy skandináv tanulmány szerint az rs3814058 homozigóta variáns genotípusa esetén alacsonyabb volt a betegek medián túlélése primer szklerotizáló kolangitiszben (Karlsen *et al.*, 2006).

A genetikai eredmények óriási dömpingje alapján egyértelmű, hogy 1-1 SNP terápiás szerepe nem lesz átütő, nem fog tudni segíteni az orvosnak a helyes kezelés megválasztásához.

Egyrészt nagy létszámú betegen végzett és sok SNP hatását vizsgáló kutatásokra van szükség, másrészt pedig a kapott eredményeket halmazban ill. 1-1 betegségre jellemző genetikai hálózat formájában kell értékelni, biostatistikusok segítségével.

Számos összefoglaló tanulmány foglalkozik a pl. a gyermekkori ALL-lel, a kezeléssel, toxicitással, túléléssel összefüggésbe hozható genetikai eltérésekkel, farmakogenetikával (Pui, 2015) (Mei *et al.*, 2015) (Kim *et al.*, 2012) (Gervasini *et al.*, 2012). Egyre több információt tudunk összegyűjteni az egyénre-szabott kezelések megtervezéséhez. Ugyanakkor az egyes egyénre jellemző genetikai minták, a különböző SNP-k kapcsolata, hálózata fogja jobban szolgálni a klinikai gyakorlatot a jövőben (szemben egyes genetikai tényezők önálló hatásával).

Elterjedőben vannak a genomszintű elemzések (Shin *et al.*, 2014) (Chiaretti *et al.*, 2014), melyek segíthetnek a különböző farmakokinetikai és farmakogenetikai profilok populáció szintű alkalmazásában (Davies, 2006) (Watanabe *et al.*, 2014) ill. újfajta megközelítésekre, új, összetettebb klinikai tanulmányokra van szükség (Saumet *et al.*, 2014) (Catenacci, 2014) (Kalia, 2015). És akkor nem beszéltünk még a genetikai eltéréseken túlmutató tényezőkről, úgymint az epigenetikai, környezeti, poszt-transzlációs faktorokról és folyamatokról. Az egyénre szabott kezelés klinikai bevezetése, a genetikai eredmények klinikai interpretálása sokkal nehezebb és bonyolultabb, mint korábban gondoltuk.

Reményeink szerint, saját, szerény eredményeink is egy cseppet képeznek az információk tengerében, és adataink hozzájárulhatnak a jövőben a biztonságosabb és hatékonyabb gyógyszereléshez.

VII. Összefoglalás és eredményeink klinikai hasznosítása

Vizsgálatainkban feltérképeztük hazai ALL-s betegekben a korábban már ismert és lehetséges új prognosztikai faktorok szerepét. Az intenzív kezelés végén (33. nap) mért abszolút limfocitaszám (ALC) egy potenciális új prognosztikai faktor, mely egyszerűen megjósolhatja a betegség kimenetelét.

Az intenzív kemoterápiás kezelés hossza (a kezelés intenzitása) is fontos lehet bizonyos betegcsoportokban, bár az egyértelmű következtetések levonásához még további adatgyűjtés szükséges.

Az OSC túlélésének javítása szempontjából döntő jelentősége van a korai diagnózisnak, mert ezzel lehet a primeren metasztatikus esetek számát csökkenteni (mely esetek túlélése lényegesen rosszabb). Eredményeink alapján a korszerű végtagmegtartó ortopédiai műtétek legalább olyan hatékonyak, mint a korábbi végtag amputációk. Továbbá megfigyeltük, hogy az OSC-s betegek diagnóziskori életkorát is figyelembe lehetne venni az oszteoszarkómás betegek rizikó besorolásánál (a fiatalabb gyermekeknek jobb a prognózisa).

Kutatásaink alapján a gyermekkori kemoterápiás kezelések hatékonysága és veszélyei, toxicitása vonatkozásában is sok fontos, új információt nyertünk.

Új információkat szereztünk a MTX farmakokinetikájáról, kiemelve pl. a bomlástermék 7-OH MTX fontos szerepét.

Különböző statisztikai módszereket felhasználva új összefüggéseket tártunk fel a kemoterápiás kezelések alatt fellépő mellékhatások háttérében álló bizonyos genetikai tényezőkkel kapcsolatban és új asszociációkat írtunk le a MTX különböző farmakokinetikai paraméterei és az ezek háttérében potenciálisan szerepet játszó farmakogenetikai eltérések között gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában és oszteoszarkómában.

Eredményeink alapján a gyermekek kezelésében több változtatást is bevezettünk.

Rendszeresen vizsgáljuk ALL-ben az intenzív kezelés során az abszolút limfocita számot, mint a kezelés hatékonyságának egy potenciális új markerét.

Minden gyermek ma már intenzív hidrálást és alkalizálást kap nagy-adagú MTX kezelés során, hogy a potenciális vesefunkció károsodást megelőzzük.

Amennyiben a szérum összfehérje szint szignifikánsan alacsony a HD-MTX kezelést követően és a betegben a szérum MTX szintek a toxikus tartományban vannak, akkor humán-albumin infúzióval csökkentjük a toxicitást és segítjük elő a MTX ürülést.

Javasoltuk a 7-OH-MTX szintek rutinszerű meghatározását is MTX kezeléseket követően.

A likvor MTX szintek meghatározása céljából az intratekális MTX kezelést az infúzió 24. órájában adjuk be rendszeresen, hogy az iv. kezeléssel elért likvor MTX-szinteket meg tudjuk határozni.

Vizsgálati eredményeink és az irodalmi adatok alapján nem egyértelműen eldönthető, hogy bizonyos diagnózisok esetén milyen adagú és formájú MTX kezelés az ideális. Ennek eldöntésére, ALL betegekben, több ezer fős multinacionalis vizsgálat indult az optimális MTX adag kiválasztására. A vizsgálat tervezésében és irányításában Magyarország döntő szerepet játszik (BFM-ALL-IC 2009).

Egységes, országos ajánlást állítottunk össze a különböző gyermekkori daganatos betegségekből gyógyultak hosszú távú követésére. Meghatároztuk az elvégzendő vizsgálatok milyenségét és gyakoriságát.

Jelenleg folyik – egy nemzetközi együttműködés keretein belül – a kemoterápiás kezelések akut toxicitásának monitorizálására és ellátására szolgáló ajánlások elkészítése.

A génpolimorfizmus vizsgálataink alapján találtunk olyan betegeket, betegcsoportokat, akikben bizonyos szövődmények, mellékhatások gyakrabban fordulnak elő. A pontosabb genetikai háttér további, részletesebb feltárásával előre megelőzhetők lehetnének a súlyos, akár életveszélyes mellékhatások és tovább javíthatók a gyógyítási esélyek. A farmakokinetikai ismeretek szélesítésével pedig az optimális adagolási módokat lehetne meghatározni, mellyel a gyermekek a legnagyobb hatékonysággal és a legkevesebb szövődménnyel kezelhetők. A génpolimorfizmus vizsgálatokat fokozatosan beillesztjük a leukémiás betegek protokolljába (az anyagi és technikai lehetőségeknek megfelelően).

Mint a felsoroltakból látható, igyekszünk tudományos eredményeinket minél jobban hasznosítani a mindennapi gyakorlatban. Reményeink szerint további vizsgálatainkkal (széles nemzetközi együttműködések alapján) még több klinikailag hasznos információt tudunk szerezni, hogy a daganatos gyermekek kezelését még inkább optimalizálni tudjuk.

VIII. A dolgozat legfontosabb (új) megállapításai

1. Prognosztikai faktorok gyermekkori ALL-ben és OSC-ban

a/1, A legújabb nemzetközi adatoknak megfelelően megerősítettük, hogy gyermekkori ALL-ben a 33. napon mért abszolút limfocita szám egy új és szignifikáns prognosztikai faktor lehet, különösen MR és HR betegekben. Saját eredményeink alapján a 350 sejt/ μ l és az 500 sejt/ μ l feletti ALC értékek voltak a jobb túléléssel szignifikánsan összefüggésbe hozhatók.

a/2, Az egyéb prognosztikai faktorokat vizsgálva kiemelendő, hogy a kezdeti kemoterápiás kezelési protokollban, főleg az indukciós terápiában bekövetkező több mint 5 napos csúszás szignifikánsan rosszabb általános túléléssel járt együtt HR betegekben.

b/1, Saját adataink alapján kimutattuk, hogy a gyermekkori OSC-ban a magyar túlélési eredmények megegyeznek a legjobb nemzetközi adatokkal, és a végtagmegtartó műtétek eredményei nem különböznek a korábbi amputációk eredményeitől. Az irodalomhoz hasonlóan szignifikáns jó prognosztikai faktornak bizonyult a neoadjuváns kezelésre adott jó terápiás válasz, a kezdeti metasztázisok hiánya és a végtagi lokalizáció.

b/2, A nemzetközi irodalomban található ellentmondásos eredmények mellett, mi azt találtuk, hogy OSC-ban a fiatalabb (<14 év) gyermekek túlélése jobb, mint az idősebbeké.

2. MTX farmakokinetika és toxicitás

a, Bebizonyítottuk, hogy intenzív hidrálással és alkalizálással a HD-MTX kezelések vesetoxicitása csökkenthető OSC-ban és hematológiai malignitásokban egyaránt.

b/1, ALL-ben az 5 g/m² MTX dózisokkal lényegesen magasabb szérumszinteket lehetett elérni mint 2 g/m² adagnál és nagyobb arányban lehet elérni az optimálisnak gondolt gyógyszer szinteket, valamivel több toxicitás mellett. Szintén ALL-ben a 14 év feletti korosztályban magasabb MTX szinteket és több elhúzódó MTX ürülést mutattunk ki. Lányokban (főleg 2 g/m² MTX adag mellett) magasabb szérumszinteket mértünk, mint fiúkban.

b/2, OSC-ban a nagy-rizikójú betegekben (HR) alacsonyabb MTX AUC és nagyobb MTX clearance értékeket találtunk. OSC-ban nem volt különbség a nemek és az életkorok viszonylatában a MTX szintekben.

b/3, A központi idegrendszerbe az alkalmazott dózistól független arányban jut be a MTX (kb. 2,5-3 %), és a nagyobb gyógyszeradaggal megbízhatóbban és nagyobb arányban lehet elérni a likvorban a citotoxikusnak (terápiásnak) vélt 1 μ mol/l szintet (ALL-ben).

c/1, Kimutattuk ALL-ben, hogy a MTX dózis ugyan összefüggéseket mutatott a toxicitással (leukopénia, hipoproteinémia, májtoxicitás), de a szérumban MTX szintek nem mutattak egyértelmű (szignifikáns) összefüggést a gyógyszer toxicitásával. Ugyanakkor MTX bomlásterméke, a 7-OH-MTX szérumszintje (görbe alatti terület) korrelációt mutat ALL-ben a különböző toxicitási (máj, vese) paraméterekkel, így hasznos mutatója lehet a toxicitásnak.

c/2, OSC-ban a MTX csúcskoncentráció összefüggést mutatott a szérumban GPT és kreatinin értékekkel.

d, Megállapítottuk, hogy a sorozatos MTX kezelések nem jelentenek egyértelmű fokozódó veszélyt a toxicitás szempontjából, hiszen a farmakokinetikai paraméterek és mellékhatások nem különböztek szignifikánsan az ismételt kezelések során (ALL-ben és OSC-ben egyaránt).

e, OSC-ban kimutattuk, hogy magasabb MTX szérumszintek esetén, bár nagyobb a toxicitás kockázata, jobb a túlélés. A görbe alatti terület nagysága és a MTX clearance is összefüggést mutatott a túléléssel.

3. Farmakogenetika

a, Az **ABCC1** gén egyes polimorfizmusai szignifikáns összefüggést mutattak az antraciklinek által okozott **kardiotoxicitással** ALL-ben. Elsőként írtuk le, hogy az rs246221 T allél jelenléte esetén a betegek késői kardiotoxicitásra vonatkozó rizikója nagyobb (alacsonyabb linEF értékek). Továbbá, a kemoterápiás kezelés (és a potenciális kardiotoxikus gyógyszerek) befejezése után az rs3743527TT genotípusú betegek pumpafunkciója (linEF) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CC és CT genotípusú betegeké. A két potenciálisan kardiotoxicitásra hajlamosító SNP kombinált vizsgálata esetén meghatározható volt egy olyan kis betegcsoport, akinek a szívkárosodásra való hajlama a legnagyobb és a bal kamra funkciója a legalacsonyabb volt a kezelés végeztével a többi beteghez képest (rs3743527TT - rs246221TC/TT genotípus).

b/1, ALL-es betegekben a vizsgált membrántranszporterek (MRD1, BCRP) közül az **ABCB1 3435TT** és/vagy 1236TT-2677TT-3435TT kombinációk esetén több súlyos **fertőzés** fordult elő, több volt a felhasznált antibiotikumok aránya és az intenzív kezelés hosszabb ideig tartott.

b/2, Szignifikánsan több súlyos **enkefalopátia** fordult elő az ALL intenzív kemoterápiás kezelés alatt az **ABCB1 3435 TT** genotípus esetén. Ezen kívül meghatároztunk egy kis betegcsoportot (**ABCB1 3435TT** és **ABCG2 421AA/CA** genotípusúak), akik rendkívül veszélyeztetettek idegrendszeri adverz reakciókra.

c, Az **ABCB1 3435T>C** polimorfizmuson belül a **CC** genotípust hordozók eseménymentes **túlélése rosszabb** volt gyermekkori ALL-ben (a CT vagy TT csoportokhoz képest).

d, A „vad” típushoz képest az **N363S GCR** polimorfizmust hordozó betegekben szignifikánsan több **szteroid** toxicitást (pl. máj, cukoranyagcsere és többszörös toxicitások), ugyanakkor jobb szteroid választ találtunk gyermekkori ALL betegekben. Ugyanakkor az ER22/23EK és a BCL1 polimorfizmusai esetén, ugyanezekkel a paraméterekkel, szignifikáns eltéréseket nem találtunk.

e, Az N363S GCR polimorfizmust hordozó betegekben szignifikánsan **jobb** általános és eseménymentes **túlélést** találtunk a vad típust hordozókhoz képest szintén gyermekkori ALL-ben. A másik 2 GCR polimorfizmus és a túlélés között nem volt szignifikáns összefüggés.

f/1, Elsőként igazoltuk, hogy az **ARID5B** gén egyes polimorfizmusai (rs4948502, rs4948496) összefüggést mutatnak a szérumban **MTX** és 7-OH-MTX szintekkel gyermekkori ALL-ben.

f/2, Az **SLCO1B1** rs4149056 polimorfizmusa szerepet játszhat a MTX ürülésében és szignifikánsan befolyásolni képes a szérumban MTX szinteket (szintén ALL-ben).

f/3, A **MTX kezelések** után megfigyelhető különböző toxicitásokkal (máj, vese, csontvelő, hipoproteinémia) összefüggésben, **új, eddig kevésbé vizsgált SNP-k** lehetséges szerepét tártuk fel, az **SLC19A1** (rs7499), az **SLC22A8** (rs4149183), az **MTR** (rs3768142), a **MTHFD1** (rs1076991) és az **ARID5B** (rs4948487) gének esetén ALL-ben.

g/1, OSC-ban a GGH -401 C>T polimorfizmusa összefüggést mutatott a szérumban MTX szintekkel és a hepatotoxicitással. A **GGH -401TT** genotípus esetén a MTX kiürülése gyorsabb és a mellékhatások előfordulása ritkább.

g/2, Szintén OSC-ban az **SLC19A1** 80AA genotípusú betegcsoportban a súlyos májkárosodás előfordulása gyakoribb volt, és ez az összefüggés még kifejezettebb azon betegekben, akikben nincs jelen a **GGH -401TT** genotípus.

g/3, Többféle statisztikai módszert, köztük Bayes-i elemzést használva, vizsgáltuk 12 gén 29 releváns polimorfizmusát szintén OSC-ban. A nemzetközi irodalomban elsőként összefüggéseket találtunk a **MTX farmakokinetikai paraméterei**, valamint a következő SNP-k között: **ABCB1** rs928256, **ABCC3** rs4793665, **GGH** rs3758149, **SXR** rs3814058. A ritka allél variánsok befolyásolták a MTX AUC-t ill. csúcskoncentrációt (általában magasabb szérumszintekkel voltak kapcsolhatók). A vizsgált máj- és csontvelői **toxicitás** bizonyos SNP-k mellett kifejezettebb volt (**ABCC1** rs246219, **ABCC2** rs717620, **ABCC2** rs2273697), míg más SNP-knél kisebb mértékű volt (**SXR** rs3732361, rs3814058, rs6785049) a „vad” allélt hordozókhoz képest.

IX. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenk előtt Dr. Schuler Dezső, Dr. Fekete György és Dr Szabó András Professzor Uraknak, akik elindítottak és végigvezettek szakmai pályafutásomon, és mindvégig támogattak és szakmai tanácsokkal láttak el.

Nefrológusként és kicsit endokrinológusként indult szakmai pályafutásomon végig segített Dr. Sólyom János és dr. Rosivall László Professzor Úr, akik profilváltásom után is tiszteletbeli mentoromként segítették munkámat.

Külön nagy-nagy köszönet illeti a Genetikai Intézet vezető munkatársait, Dr. Falus András Akadémikus Urat, Dr. Szalai Csaba Professzor Urat és Félné Dr. Semsei Ágnes, akik klinikus létemre bevezettek a genetikai vizsgálatok rejtelseibe és a labormunkák nagy részét végezték ill. irányították.

Tudományos tevékenységemet, az akkor még Biológiai Intézet dolgozójaként, Dr. Csaba György Professzor Úr, Dr. Bertók Lóránt és Dr. Nagy Zsuzsa indította el, ők szeretették meg velem a tudományos munkát, külön köszönet ezért is.

Külön hálával és végtelen tisztelettel tartozom első közvetlen hematológiai főnökömnek, Dr. Koós Rozália, egyetemi docensnek, aki megtanított a szakma minden csínjára-bínjára és a szakma szeretetére.

Ez a munka nem jöhetett volna létre közvetlen munkatársaim segítségével nélkül: Dr. Erdélyi Dániel a tudományos munkámhoz is végig hozzájárult, ill. a klinikai feladatok ellátásában is segített. További oszlopos munkatársaim Dr. Csóka Monika, egyetemi docens és Dr. Müller Judit, egyetemi adjunktus, akik mindennapi tevékenységemben maximálisan támogattak és segítettek. A klinika tudományos munkatársai közül külön szeretném megemlíteni Dr. Haltrich Irént és Németh Krisztinát, akik a genetikai munkacsoport részéről nyújtottak sok segítséget.

Külön hálával tartozom Wittingerné Szabó Angelika főnővérnek, a hematológiai osztály és a hematológiai ambulancia valamennyi dolgozójának, nővérének, asszisztenseknek egyéb segítőknek, hogy lehetővé tették és segítették a magas színvonalú munkavégzést.

A disszertáció különösen 3 PhD hallgatóm munkáján alapul: Dr. Hegyi Márta, Dr. Csordás Katalin és Dr. Eipel Olivér igen magas színvonalon és hallatlan lelkesedéssel végezték a közös munkát, a szakmainál jóval szorosabb és közvetlenebb, baráti kapcsolat alakult ki közöttünk.

Meg kell említeni továbbá a több mint 60 (!) TDK hallgatót akik az elnúlt közel 20 év során a téma különböző területein fejtettek ki aktivitást és nagyban hozzájárultak az anyaggyűjtéshez és ezen munka sikeréhez.

Külön köszönöm az I. Patológiai Intézet munkatársainak, Dr. Csomor Juditnak, Dr. Barna Gábornak, Dr. Szepesi Ágotának, Dr. Tímár Botondnak, Dr. Bödör Csabának és Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy klinikai és tudományos munkámat mindvégig támogatták, folyamatos, állandó konzultációra készek voltak és magas színvonalon végezték ill. végzik a diagnosztikus és tudományos munkát.

Köszönöm a II. Gyermekklinika és a Genetika- Sejt- és Immunológiai Intézet valamennyi meg nem nevezett munkatársának is a sok-sok segítséget!

És végül, de nem utolsó sorban, szüleimnek köszönöm a támogatást és biztatást, hogy pályaválasztásomban és tudományos munkámban mindig előre lendítettek!

X. Irodalomjegyzék

Aarons L (1991). Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol* 32: 669-670.

Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R (2013). A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 1115-1130.

Adams MJ, Lipshultz SE (2005). Pathophysiology of anthracycline- and radiation-associated cardiomyopathies: implications for screening and prevention. *Pediatr Blood Cancer* 44: 600-606.

Al-Shakfa F, Dulucq S, Brukner I, Milacic I, Ansari M, Beaulieu P, *et al.* (2009). DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 15: 6931-6938.

Alkayed K, Halalsheh H, Khattab E, Abualruz AR, Ibrahim A, Madanat F (2012). Lack of prognostic significance of absolute lymphocyte count after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 59: 351.

Allen JD, Schinkel AH (2002). Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* 1: 427-434.

Aminkeng F, Ross CJ, Rassekh SR, Hwang S, Rieder MJ, Bhavsar AP, *et al.* (2016). Recommendations for genetic testing to reduce the incidence of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 82: 683-695.

Andersen V, Christensen J, Ernst A, Jacobsen BA, Tjonneland A, Krarup HB, *et al.* (2011). Polymorphisms in NF-kappaB, PXR, LXR, PPARGgamma and risk of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 17: 197-206.

Anderson B (2005). Dexrazoxane for the prevention of cardiomyopathy in anthracycline treated pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer* 44: 584-588.

Andreadis C, Gimotty PA, Wahl P, Hammond R, Houldsworth J, Schuster SJ, *et al.* (2007). Members of the glutathione and ABC-transporter families are associated with clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 109: 3409-3416.

Anil TM, Dandu A, Harsha K, Singh J, Shree N, Kumar VS, *et al.* (2014). A novel 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type1 inhibitor CNX-010-49 improves hyperglycemia, lipid profile and reduces body weight in diet induced obese C57B6/J mice with a potential to provide cardio protective benefits. *BMC Pharmacol Toxicol* 15: 43.

Anoceto Martinez A, Gonzalez Otero A, Guerchicoff de Svarch E, Arencibia Nunez A, Jaime JC, Dorticos E, *et al.* (2012). [Absolute lymphocyte count as a prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia]. *An Pediatr (Barc)* 76: 10 e11-16.

Aplenc R, Lange B (2004). Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 125: 421-434.

Aquerreta I, Aldaz A, Giraldez J, Sierrasesumaga L (2004). Methotrexate pharmacokinetics and survival in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 42: 52-58.

Armenian SH, Ding Y, Mills G, Sun C, Venkataraman K, Wong FL, *et al.* (2013). Genetic susceptibility to anthracycline-related congestive heart failure in survivors of haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 163: 205-213.

Assaraf YG (2007). Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26: 153-181.

Asselin BL, Gaynon P, Whitlock JA (2013). Recent advances in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: an expert panel discussion. *Curr Opin Oncol* 25 Suppl 3: S1-13; quiz S14-16.

Au A, Aziz Baba A, Goh AS, Wahid Fadilah SA, Teh A, Rosline H, *et al.* (2014). Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother* 68: 343-349.

Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P (2006a). Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* 106: 1154-1161.

Bacci G, Loro L, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Versari M, *et al.* (2006b). No correlation between methotrexate serum level and histologic response in the pre-operative treatment of extremity osteosarcoma. *Anticancer Drugs* 17: 411-415.

Bacci G, Picci P, Ferrari S, Orlandi M, Ruggieri P, Casadei R, *et al.* (1993). Prognostic significance of serum alkaline phosphatase measurements in patients with osteosarcoma treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 71: 1224-1230.

Bacci G, Briccoli A, Ferrari S, Saeter G, Donati D, Longhi A, *et al.* (2000). Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with synchronous lung metastases: treatment with cisplatin, adriamycin and high dose of methotrexate and ifosfamide. *Oncol Rep* 7: 339-346.

Bachmann AW, Sedgley TL, Jackson RV, Gibson JN, Young RM, Torpy DJ (2005). Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 30: 297-306.

Bains OS, Karkling MJ, Grigliatti TA, Reid RE, Riggs KW (2009). Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug Metab Dispos* 37: 1107-1114.

Bains OS, Takahashi RH, Pfeifer TA, Grigliatti TA, Reid RE, Riggs KW (2008). Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metab Dispos* 36: 904-910.

Bakos E, Homolya L (2007). Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch* 453: 621-641.

Baldwin SA, Fellingham GW (2012). Bayesian Methods for the Analysis of Small Sample Multilevel Data With a Complex Variance Structure. *Psychol Methods*.

Bao HX, Bi Q, Han Y, Zhao C, Zou H (2017). Potential mechanisms underlying CDK5 related Osteosarcoma progression. *Expert Opin Ther Targets*: 1-6.

Barry EV, Vrooman LM, Dahlberg SE, Neuberg DS, Asselin BL, Athale UH, *et al.* (2008). Absence of secondary malignant neoplasms in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with dexrazoxane. *J Clin Oncol* 26: 1106-1111.

Bates DM, M.; Bolker, B. (2012). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-0.

Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, Yang JJ, Khan RB, Panetta JC, *et al.* (2014). Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 32: 949-959.

Bielack SS, Carrle D, Harges J, Schuck A, Paulussen M (2008). Bone tumors in adolescents and young adults. *Curr Treat Options Oncol* 9: 67-80.

Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, *et al.* (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20: 776-790.

Bilbao-Aldaiturriaga N, Gutierrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Pombar-Gomez M, Zalacain-Diez M, Patino-Garcia A, *et al.* (2015). Polymorphisms in miRNA processing genes and their role in osteosarcoma risk. *Pediatr Blood Cancer* 62: 766-769.

Birmingham BK, Bujac SR, Elsby R, Azumaya CT, Wei C, Chen Y, *et al.* (2015). Impact of ABCG2 and SLCO1B1 polymorphisms on pharmacokinetics of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin acid in Caucasian and Asian subjects: a class effect? *Eur J Clin Pharmacol* 71: 341-355.

Blanco JG, Leisenring WM, Gonzalez-Covarrubias VM, Kawashima TI, Davies SM, Relling MV, *et al.* (2008). Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer* 112: 2789-2795.

Blanco JG, Sun CL, Landier W, Chen L, Esparza-Duran D, Leisenring W, *et al.* (2012). Anthracycline-related cardiomyopathy after childhood cancer: role of polymorphisms in carbonyl reductase genes--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 30: 1415-1421.

Bleyer WA (1978). The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer* 41: 36-51.

- Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V (2008). Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 64: 1057-1068.
- Boothe VL, Boehmer TK, Wendel AM, Yip FY (2014). Residential traffic exposure and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Prev Med* 46: 413-422.
- Borsi JD, Moe PJ (1987). A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5 g to 33.6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 60: 5-13.
- Borsi JD, Sagen E, Romslo I, Moe PJ (1990). Comparative study on the pharmacokinetics of 7-hydroxy-methotrexate after administration of methotrexate in the dose range of 0.5-33.6 g/m² to children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 18: 217-224.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 1295-1302.
- Bramer JA, van Linge JH, Grimer RJ, Scholten RJ (2009). Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: a systematic review. *Eur J Surg Oncol* 35: 1030-1036.
- Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F (2012). Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 12: 230-237.
- Braun J, Rau R (2009). An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol* 21: 216-223.
- Briccoli A, Rocca M, Salone M, Bacci G, Ferrari S, Balladelli A, *et al.* (2005). Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer* 104: 1721-1725.
- Brouwer CA, Gietema JA, van den Berg MP, Bink-Boelkens MT, Elzenga NJ, Haaksma J, *et al.* (2007). Low-dose anthracyclines in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): no cardiac deterioration more than 20 years post-treatment. *J Cancer Surviv* 1: 255-260.
- Brouwer JP, Appelhof BC, van Rossum EF, Koper JW, Fliers E, Huyser J, *et al.* (2006). Prediction of treatment response by HPA-axis and glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 31: 1154-1163.
- Buchbinder D, Nugent DJ, Fillipovich AH (2014). Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet* 7: 55-66.
- Buda G, Maggini V, Galimberti S, Martino A, Giuliani N, Morabito F, *et al.* (2007). MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 137: 454-456.
- Buitenkamp TD, Mathot RA, de Haas V, Pieters R, Zwaan CM (2010). Methotrexate-induced side effects are not due to differences in pharmacokinetics in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95: 1106-1113.

Bunting KD (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20: 11-20.

Busillo JM, Cidlowski JA (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 24: 109-119.

Campalani E, Arenas M, Marinaki AM, Lewis CM, Barker JN, Smith CH (2007). Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *J Invest Dermatol* 127: 1860-1867.

Campana D (2012). Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 19: 313-318.

Cannon GW (1997). Methotrexate pulmonary toxicity. *Rheum Dis Clin North Am* 23: 917-937.

Cao Y, Bender IK, Konstantinidis AK, Shin SC, Jewell CM, Cidlowski JA, *et al.* (2013). Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Blood* 121: 1553-1562.

Cario H, Smith DE, Blom H, Blau N, Bode H, Holzmann K, *et al.* (2011). Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet* 88: 226-231.

Caronia D, Patino-Garcia A, Perez-Martinez A, Pita G, Moreno LT, Zalacain-Diez M, *et al.* (2011). Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. *PLoS One* 6: e26091.

Cascorbi I (2006). Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112: 457-473.

Catenacci DV (2014). Next-generation clinical trials: Novel strategies to address the challenge of tumor molecular heterogeneity. *Mol Oncol*.

Cecchin E, D'Andrea M, Lonardi S, Zanusso C, Pella N, Errante D, *et al.* (2013). A prospective validation pharmacogenomic study in the adjuvant setting of colorectal cancer patients treated with the 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX4) regimen. *Pharmacogenomics J* 13: 403-409.

Cellini E, Castellini G, Ricca V, Bagnoli S, Tedde A, Rotella CM, *et al.* (2010). Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in Italian patients with eating disorders and obesity. *Psychiatr Genet* 20: 282-288.

Cercato C, Halpern A, Frazzatto ES, Guazzelli IC, Villares SM (2009). The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: effects on visceral fat assessed by abdominal computed tomography. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53: 288-292.

Cha PC, Mushiroda T, Zembutsu H, Harada H, Shinoda N, Kawamoto S, *et al.* (2009). Single nucleotide polymorphism in ABCG2 is associated with irinotecan-induced severe myelosuppression. *J Hum Genet* 54: 572-580.

Chai W, Zhang Z, Ni M, Geng P, Lian Z, Zhang G, *et al.* (2015). Genetic association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of osteonecrosis of the femoral head. *Biomed Res Int* 2015: 196495.

Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G, Ling V (1997). P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 89: 1706-1715.

Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, *et al.* (2000). A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 70: 310-315.

Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J (2003). Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene* 319: 167-175.

Chen R, Wang J, Tang S, Zhang Y, Lv X, Wu S, *et al.* (2015). Association of polymorphisms in drug transporter genes (SLCO1B1 and SLC10A1) and anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Chinese cohort. *Tuberculosis (Edinb)* 95: 68-74.

Chen ZS, Tiwari AK (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J* 278: 3226-3245.

Chen ZS, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Shchavaleva I, Kotova E, Kruh GD (2003). Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63: 351-358.

Chiaretti S, Gianfelici V, Ceglie G, Foa R (2014). Genomic characterization of acute leukemias. *Med Princ Pract* 23: 487-506.

Clement K, Philippi A, Jury C, Pividal R, Hager J, Demenais F, *et al.* (1996). Candidate gene approach of familial morbid obesity: linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 507-512.

Cole PD, Kamen BA, Gorlick R, Banerjee D, Smith AK, Magill E, *et al.* (2001). Effects of overexpression of gamma-Glutamyl hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Res* 61: 4599-4604.

Cole SP (2014). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem* 289: 30880-30888.

Comandone A, Passera R, Boglione A, Tagini V, Ferrari S, Cattel L (2005). High dose methotrexate in adult patients with osteosarcoma: clinical and pharmacokinetic results. *Acta Oncol* 44: 406-411.

Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Deeley RG, Cole SP, Schrenk D (2001). Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *J Hum Genet* 46: 656-663.

Conter V, Arico M, Basso G, Biondi A, Barisone E, Messina C, *et al.* (2010a). Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24: 255-264.

Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, *et al.* (2010b). Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 115: 3206-3214.

Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajcinovic M (2006). Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 91: 1113-1116.

Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, *et al.* (2011). New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117: 6267-6276.

Couture L, Nash JA, Turgeon J (2006). The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev* 58: 244-258.

Creutzig U, Zimmermann M, Bourquin JP, Dworzak MN, Fleischhack G, Graf N, *et al.* (2013). Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004. *Blood* 122: 37-43.

Crews KR, Liu T, Rodriguez-Galindo C, Tan M, Meyer WH, Panetta JC, *et al.* (2004). High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer* 100: 1724-1733.

Csordas K, Hegyi M, Eipel OT, Muller J, Erdelyi DJ, Kovacs GT (2013). Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Drugs* 24: 189-197.

Davies SM (2006). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: are we there yet? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 111-117.

De Angulo G, Yuen C, Palla SL, Anderson PM, Zweidler-McKay PA (2008). Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer* 112: 407-415.

de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, *et al.* (2005). Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106: 717-720.

de Rotte MC, Bulatovic M, Heijstek MW, Jansen G, Heil SG, van Schaik RH, *et al.* (2012). ABCB1 and ABCC3 gene polymorphisms are associated with first-year response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 39: 2032-2040.

de Ruiter RD, Gordijn MS, Gemke RJ, van den Bos C, Bierings MB, Rotteveel J, *et al.* (2014). Adrenal insufficiency during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia is

associated with glucocorticoid receptor polymorphisms ER22/23EK and BclI. *Haematologica* 99: e136-137.

Delepine N, Delepine G, Cornille H, Brion F, Arnaud P, Desbois JC (1995). Dose escalation with pharmacokinetics monitoring in methotrexate chemotherapy of osteosarcoma. *Anticancer Res* 15: 489-494.

Deng S, Wojnowski L (2007a). Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 7: 129-134.

Deng S, Kruger A, Kleschyov AL, Kalinowski L, Daiber A, Wojnowski L (2007b). Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. *Free Radic Biol Med* 42: 466-473.

Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, *et al.* (2004). Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics* 14: 733-739.

Deshpande A, Hinds PW (2006). The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Curr Mol Med* 6: 809-817.

Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, *et al.* (2003). The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59: 68-74.

Di Martino MT, Arbitrio M, Leone E, Guzzi PH, Rotundo MS, Ciliberto D, *et al.* (2011). Single nucleotide polymorphisms of ABCC5 and ABCG1 transporter genes correlate to irinotecan-associated gastrointestinal toxicity in colorectal cancer patients: a DMET microarray profiling study. *Cancer Biol Ther* 12: 780-787.

Domanitskaya N, Wangari-Talbot J, Jacobs J, Peiffer E, Mahdaviyeh Y, Paulose C, *et al.* (2014). Abcc10 status affects mammary tumour growth, metastasis, and docetaxel treatment response. *Br J Cancer* 111: 696-707.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, *et al.* (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-15670.

Dulucq S, Laverdiere C, Sinnett D, Krajcinovic M (2014). Pharmacogenetic considerations for acute lymphoblastic leukemia therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10: 699-719.

Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, *et al.* (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 112: 2024-2027.

Dupuis C, Mercier C, Yang C, Monjanel-Mouterde S, Ciccolini J, Fanciullino R, *et al.* (2008). High-dose methotrexate in adults with osteosarcoma: a population pharmacokinetics study and validation of a new limited sampling strategy. *Anticancer Drugs* 19: 267-273.

Durmus S, Hendrikx JJ, Schinkel AH (2015). Apical ABC Transporters and Cancer Chemotherapeutic Drug Disposition. *Adv Cancer Res* 125: 1-41.

Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, Maglia O, Ratei R, Veltroni M, *et al.* (2010). Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* 78: 147-153.

Ebinger M, Witte KE, Ahlers J, Schafer I, Andre M, Kerst G, *et al.* (2010). High frequency of immature cells at diagnosis predicts high minimal residual disease level in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 34: 1139-1142.

Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Pedersen O (2001). The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1563-1565.

Eden T (2010). Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev* 36: 286-297.

Ehrhart N, Dernell WS, Hoffmann WE, Weigel RM, Powers BE, Withrow SJ (1998). Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). *J Am Vet Med Assoc* 213: 1002-1006.

Emerenciano M, Barbosa TC, Lopes BA, Blunck CB, Faro A, Andrade C, *et al.* (2014). ARID5B polymorphism confers an increased risk to acquire specific MLL rearrangements in early childhood leukemia. *BMC Cancer* 14: 127.

Erculj N, Kotnik BF, Debeljak M, Jazbec J, Dolzan V (2012). Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53: 1096-1104.

Erttmann R, Bielack S, Landbeck G (1985). Kinetics of 7-hydroxy-methotrexate after high-dose methotrexate therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 15: 101-104.

Evans TJ, Milne E, Anderson D, de Klerk NH, Jamieson SE, Talseth-Palmer BA, *et al.* (2014). Confirmation of childhood acute lymphoblastic leukemia variants, ARID5B and IKZF1, and interaction with parental environmental exposures. *PLoS One* 9: e110255.

Evans WE, Christensen ML (1985). Drug interactions with methotrexate. *J Rheumatol Suppl* 12 Suppl 12: 15-20.

Evans WE, Crom WR, Abromowitch M, Dodge R, Look AT, Bowman WP, *et al.* (1986). Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. *N Engl J Med* 314: 471-477.

Faganel Kotnik B, Dolzan V, Grabnar I, Jazbec J (2010). Relationship of the reduced folate carrier gene polymorphism G80A to methotrexate plasma concentration, toxicity, and disease outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51: 724-726.

- Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, Dolzan V, Jazbec J (2011). Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma. *Eur J Clin Pharmacol* 67: 993-1006.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, *et al.* (2012). Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 5173-5180.
- Fanta S, Jonsson S, Karlsson MO, Niemi M, Holmberg C, Hoppu K, *et al.* (2010). Long-term changes in cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation in children: evidence for saturable presystemic metabolism and effect of NR1I2 polymorphism. *J Clin Pharmacol* 50: 581-597.
- Felice MS, Zubizarreta PA, Alfaro EM, Sackmann-Muriel F (2001). Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol* 23: 411-415.
- Ferrari M, Guasti L, Maresca A, Mirabile M, Contini S, Grandi AM, *et al.* (2014). Association between statin-induced creatine kinase elevation and genetic polymorphisms in SLCO1B1, ABCB1 and ABCG2. *Eur J Clin Pharmacol* 70: 539-547.
- Ferreri AJ, Guerra E, Regazzi M, Pasini F, Ambrosetti A, Pivnik A, *et al.* (2004). Area under the curve of methotrexate and creatinine clearance are outcome-determining factors in primary CNS lymphomas. *Br J Cancer* 90: 353-358.
- Fleury I, Primeau M, Doreau A, Costea I, Moghrabi A, Sinnett D, *et al.* (2004). Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pharmacogenomics* 4: 331-341.
- Forero-Castro M, Robledo C, Benito R, Abaigar M, Africa Martin A, Arefi M, *et al.* (2016). Genome-Wide DNA Copy Number Analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia Identifies New Genetic Markers Associated with Clinical Outcome. *PLoS One* 11: e0148972.
- Fuchs B, Pritchard DJ (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 40-52.
- Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Tohkin M, Maekawa K, Hasegawa R, Kawamoto M, *et al.* (2007). Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene ABCC1 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 22: 48-60.
- Fung KL, Gottesman MM (2009). A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 1794: 860-871.
- Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D (2013). Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 84: 359-369.
- Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D (2000). Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther* 85: 207-215.

Gensler LS (2013). Glucocorticoids: complications to anticipate and prevent. *Neurohospitalist* 3: 92-97.

Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, *et al.* (2006). Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100: 161-166.

Gervasini G, Vagace JM (2012). Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet* 3: 249.

Gewirtz DA, Holt SA (1985). Protein binding as a component of drug interaction in cellular pharmacokinetic studies. Effects of probenecid on transport and accumulation of methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 34: 747-754.

Gherzi-Egea JF, Leninger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A (1994). Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J Neurochem* 62: 1089-1096.

Gianni L, Cole BF, Panzini I, Snyder R, Holmberg SB, Byrne M, *et al.* (2008). Anemia during adjuvant non-taxane chemotherapy for early breast cancer: Incidence and risk factors from two trials of the International Breast Cancer Study Group. *Support Care Cancer* 16: 67-74.

Gonzalez-Covarrubias V, Ghosh D, Lakhman SS, Pendyala L, Blanco JG (2007). A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos* 35: 973-980.

Goricar K, Kovac V, Jazbec J, Zakotnik B, Lamovec J, Dolzan V (2014). Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma. *Pharmacogenet Genomics* 24: 514-521.

Goricar K, Kovac V, Jazbec J, Zakotnik B, Lamovec J, Dolzan V (2015a). Translesion polymerase genes polymorphisms and haplotypes influence survival of osteosarcoma patients. *OMICS* 19: 180-185.

Goricar K, Kovac V, Jazbec J, Zakotnik B, Lamovec J, Dolzan V (2015b). Genetic variability of DNA repair mechanisms and glutathione-S-transferase genes influences treatment outcome in osteosarcoma. *Cancer Epidemiol* 39: 182-188.

Grad I, Picard D (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275: 2-12.

Gradhand U, Kim RB (2008). Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2). *Drug Metab Rev* 40: 317-354.

Graf N, Winkler K, Betlemovic M, Fuchs N, Bode U (1994). Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 12: 1443-1451.

Greene ND, Stanier P, Copp AJ (2009). Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 18: R113-129.

Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, *et al.* (2010). The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* 115: 4671-4677.

Grimer RJ, Sommerville S, Warnock D, Carter S, Tillman R, Abudu A, *et al.* (2005). Management and outcome after local recurrence of osteosarcoma. *Eur J Cancer* 41: 578-583.

Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350: 299-309.

Groninger E, Proost JH, de Graaf SS (2004). Pharmacokinetic studies in children with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 52: 173-197.

Grover S, Kukreti R (2013). A systematic review and meta-analysis of the role of ABCC2 variants on drug response in patients with epilepsy. *Epilepsia* 54: 936-945.

Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, *et al.* (2006). Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 83: 701-707.

Gupta A, Kapoor G, Jain S, Bajpai R (2015). Absolute Lymphocyte Count Recovery Independently Predicts Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience From a Tertiary Care Cancer Center of a Developing Country. *J Pediatr Hematol Oncol* 37: e143-149.

Gutierrez PL, Gee MV, Bachur NR (1983). Kinetics of anthracycline antibiotic free radical formation and reductive glycosidase activity. *Arch Biochem Biophys* 223: 68-75.

Gwee PC, Tang K, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, Lee CG (2003). Simultaneous genotyping of seven single-nucleotide polymorphisms in the MDR1 gene by single-tube multiplex minisequencing. *Clin Chem* 49: 672-676.

Hagleitner MM, Coenen MJ, Gelderblom H, Makkinje RR, Vos HI, de Bont ES, *et al.* (2015). A first step towards personalized medicine in osteosarcoma: Pharmacogenetics as predictive marker of outcome after chemotherapy based treatment. *Clin Cancer Res*.

Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5: 21-53.

Han B, Park M, Chen XW (2010). A Markov blanket-based method for detecting causal SNPs in GWAS. *BMC Bioinformatics* 11 Suppl 3: S5.

Harting MT, Lally KP, Andrassy RJ, Vaporciyan AA, Cox CS, Jr., Hayes-Jordan A, *et al.* (2010). Age as a prognostic factor for patients with osteosarcoma: an analysis of 438 patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 561-570.

Hatzipantelis E, Pana ZD, Vlachou M, Papageorgiou T, Tragiannidis A, Athanassiadou F (2014). Peripheral blood lymphocyte recovery and overall survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 61: 181-183.

Haufroid V (2011). Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC2 and their impact on drug disposition. *Curr Drug Targets* 12: 631-646.

He HR, Liu P, He GH, Dong WH, Wang MY, Dong YL, *et al.* (2014). Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 55: 2793-2800.

Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnett D (2010). Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95: 1608-1611.

Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D, *et al.* (2003). Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol* 40: 348-354.

Hider SL, Bruce IN, Thomson W (2007). The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)* 46: 1520-1524.

Hilger E, Reinthaler EM, Stogmann E, Hotzy C, Patariaia E, Baumgartner C, *et al.* (2012). Lack of association between ABCC2 gene variants and treatment response in epilepsy. *Pharmacogenomics* 13: 185-190.

Hirase S, Hasegawa D, Takahashi H, Moriwaki K, Saito A, Kozaki A, *et al.* (2015). Absolute lymphocyte count at the end of induction therapy is a prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 102: 594-601.

Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, *et al.* (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 21: 152-161.

Hoffmann U, Kroemer HK (2004). The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* 36: 669-701.

Holmboe L, Andersen AM, Morkrid L, Slordal L, Hall KS (2012). High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol* 73: 106-114.

Hooijberg JH, Jansen G, Kathmann I, Pieters R, Laan AC, van Zantwijk I, *et al.* (2014). Folates provoke cellular efflux and drug resistance of substrates of the multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Cancer Chemother Pharmacol* 73: 911-917.

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD (2004). Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64: 4927-4930.

Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* 162: 181-191.

Hornicek FJ, Gebhardt MC, Wolfe MW, Kharrazi FD, Takeshita H, Parekh SG, *et al.* (2000). P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 11-17.

<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>.

Huang L, Tissing WJ, de Jonge R, van Zelst BD, Pieters R (2008). Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22: 1798-1800.

Huang Y (2007). Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 26: 183-201.

Huang Z, Tong HF, Li Y, Qian JC, Wang JX, Wang Z, *et al.* (2016). Effect of the Polymorphism of Folylpolyglutamate Synthetase on Treatment of High-Dose Methotrexate in Pediatric Patients with Acute Lymphocytic Leukemia. *Med Sci Monit* 22: 4967-4973.

Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabro R (2005). Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. *Paediatr Drugs* 7: 67-76.

Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, *et al.* (2002). MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 62: 4955-4962.

Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, *et al.* (2002). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* 1: 611-616.

Imanishi H, Okamura N, Yagi M, Noro Y, Moriya Y, Nakamura T, *et al.* (2007). Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J Hum Genet* 52: 166-171.

Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, Helmers RA (2000). Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. *Eur Respir J* 15: 373-381.

Inaba H, Khan RB, Laningham FH, Crews KR, Pui CH, Daw NC (2008). Clinical and radiological characteristics of methotrexate-induced acute encephalopathy in pediatric patients with cancer. *Ann Oncol* 19: 178-184.

Ishaqi MK, Afzal S, Dupuis A, Doyle J, Gassas A (2008). Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 41: 245-252.

Jabeen S, Holmboe L, Alnaes GI, Andersen AM, Hall KS, Kristensen VN (2015). Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J*.

Jaffe N (2009). Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience. *Cancer Treat Res* 152: 239-262.

Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F (2002). Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* 95: 2202-2210.

Jamroziak K, Robak T (2004a). Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology* 9: 91-105.

Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, *et al.* (2004b). Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 72: 314-321.

Jewell CM, Cidlowski JA (2007). Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3268-3277.

Joannon P, Oviedo I, Campbell M, Tordecilla J (2004). High-dose methotrexate therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of relation between serum methotrexate concentration and creatinine clearance. *Pediatr Blood Cancer* 43: 17-22.

Joerger M, Huitema AD, van den Bongard HJ, Baas P, Schornagel JH, Schellens JH, *et al.* (2006). Determinants of the elimination of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate following high-dose infusional therapy to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 62: 71-80.

Jonsson P, Hoglund P, Wiebe T, Schroder H, Seidel H, Skarby T (2007). Methotrexate concentrations in cerebrospinal fluid and serum, and the risk of central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Anticancer Drugs* 18: 941-948.

Jordan de Luna C, Herrero Cervera MJ, Sanchez Lazaro I, Almenar Bonet L, Poveda Andres JL, Alino Pellicer SF (2011). Pharmacogenetic study of ABCB1 and CYP3A5 genes during the first year following heart transplantation regarding tacrolimus or cyclosporine levels. *Transplant Proc* 43: 2241-2243.

Jönsson P, Höglund P, Wiebe T, Schröder H, Seidel H, Skärby T (2007). Methotrexate concentrations in cerebrospinal fluid and serum, and the risk of central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Anti-Cancer Drugs* 18: 941-948.

Jungsuwadee P, Zhao T, Stolarczyk EI, Paumi CM, Butterfield DA, St Clair DK, *et al.* (2012). The G671V variant of MRP1/ABCC1 links doxorubicin-induced acute cardiac toxicity to disposition of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2-trans-nonenal. *Pharmacogenet Genomics* 22: 273-284.

Kadmiel M, Cidlowski JA (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34: 518-530.

Kalia M (2015). Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 64: S16-21.

Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, *et al.* (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115: 1394-1405.

Karlsen TH, Lie BA, Frey Frosli K, Thorsby E, Broome U, Schrumpf E, *et al.* (2006). Polymorphisms in the steroid and xenobiotic receptor gene influence survival in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 131: 781-787.

Kathawala RJ, Wang YJ, Ashby CR, Jr., Chen ZS (2014a). Recent advances regarding the role of ABC subfamily C member 10 (ABCC10) in the efflux of antitumor drugs. *Chin J Cancer* 33: 223-230.

Kathawala RJ, Wei L, Anreddy N, Chen K, Patel A, Alqahtani S, *et al.* (2014b). The small molecule tyrosine kinase inhibitor NVP-BHG712 antagonizes ABCC10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical and pharmacokinetic study. *Oncotarget*.

Kawedia JD, Kaste SC, Pei D, Panetta JC, Cai X, Cheng C, *et al.* (2011). Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic determinants of osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117: 2340-2347; quiz 2556.

Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2: 51-64.

Khoury JF, Ben-Arush MW, Weintraub M, Waldman E, Futerman B, Vlodavsky E, *et al.* (2014). Alkaline phosphatase level change in patients with osteosarcoma: its role as a predictive factor of tumor necrosis and clinical outcome. *Isr Med Assoc J* 16: 26-32.

Kim H, Kang HJ, Kim HJ, Jang MK, Kim NH, Oh Y, *et al.* (2012). Pharmacogenetic analysis of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a possible association between survival rate and ITPA polymorphism. *PLoS One* 7: e45558.

Kim IS, Kim HG, Kim DC, Eom HS, Kong SY, Shin HJ, *et al.* (2008). ABCG2 Q141K polymorphism is associated with chemotherapy-induced diarrhea in patients with diffuse large B-cell lymphoma who received frontline rituximab plus cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone chemotherapy. *Cancer Sci* 99: 2496-2501.

Kim YH, Goh TS, Lee CS, Oh SO, Kim JI, Jeung SH, *et al.* (2017). Prognostic value of microRNAs in osteosarcoma: A meta-analysis. *Oncotarget* 8: 8726-8737.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, *et al.* (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315: 525-528.

Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, *et al.* (2003). Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol* 21: 3084-3091.

Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, *et al.* (2007). Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* 109: 4151-4157.

Klein I, Sarkadi B, Varadi A (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461: 237-262.

Kodidela S, Suresh Chandra P, Dubashi B (2014). Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: why still at the bench level? *Eur J Clin Pharmacol* 70: 253-260.

Koeijvoets KC, van Rossum EF, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJ, *et al.* (2006). A functional polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relation to cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4131-4136.

Kofler R (2000). The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol* 114: 1-7.

Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377-394.

Koo DH, Ryu MH, Ryoo BY, Beck MY, Na YS, Shin JG, *et al.* (2015). Association of ABCG2 polymorphism with clinical efficacy of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 75: 173-182.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, *et al.* (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 3537-3547.

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, *et al.* (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6914-6919.

Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL (2014). Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 92: 62-73.

Krajinovic M, Moghrabi A (2004a). Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics* 5: 819-834.

Krajinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A (2004b). Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 4: 66-72.

Kremer LC, van der Pal HJ, Offringa M, van Dalen EC, Voute PA (2002). Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: a systematic review. *Ann Oncol* 13: 819-829.

Krishnamurthy P, Schuetz JD (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 381-410.

Krishnamurthy P, Romagni P, Torvik S, Gold PW, Charney DS, Detera-Wadleigh S, *et al.* (2008). Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in premenopausal women with major depression. *Horm Metab Res* 40: 194-198.

Kruh GD, Belinsky MG (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22: 7537-7552.

Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, *et al.* (2001). MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr* 33: 493-501.

Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J, *et al.* (2014). RFC1 80G>A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis: a human genome epidemiologic review and meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheumatol* 66: 1111-1120.

Kunicka T, Soucek P (2014a). Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug Metab Rev* 46: 325-342.

Kunicka T, Vaclavikova R, Hlavac V, Vrana D, Pecha V, Raus K, *et al.* (2014b). Non-coding polymorphisms in nucleotide binding domain 1 in ABCC1 gene associate with transcript level and survival of patients with breast cancer. *PLoS One* 9: e101740.

Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RG, van Heemst D (2006). Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology* 7: 231-238.

Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Hirata T, Nakajima S, *et al.* (2008). Combination analysis of three polymorphisms for predicting the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci* 13: 297-303.

Kurose K, Sugiyama E, Saito Y (2012). Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet* 27: 9-54.

Labuda M, Gahier A, Gagne V, Moghrabi A, Sinnett D, Krajcinovic M (2010). Polymorphisms in glucocorticoid receptor gene and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res* 34: 492-497.

Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, Xiang X, Ang PC, Lee EJ, *et al.* (2008). Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci* 99: 816-823.

Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 85: 217-229.

Lauten M, Moricke A, Beier R, Zimmermann M, Stanulla M, Meissner B, *et al.* (2012). Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica* 97: 1048-1056.

Lautner-Csorba O, Gezsi A, Semsei AF, Antal P, Erdelyi DJ, Schermann G, *et al.* (2012). Candidate gene association study in pediatric acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance. *BMC Med Genomics* 5: 42.

Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M (2002). Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 3832-3834.

Le Guellec C, Blasco H, Benz I, Hulin A (2010). [Therapeutic drug monitoring of methotrexate after its administration in high-dose protocols]. *Therapie* 65: 163-169.

Lee CA, O'Connor MA, Ritchie TK, Galetin A, Cook JA, Ragueneau-Majlessi I, *et al.* (2015). Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions: Practical Recommendations for Clinical Victim and Perpetrator Drug-Drug Interaction Study Design. *Drug Metab Dispos* 43: 490-509.

Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, *et al.* (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch* 464: 549-559.

Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102: 1016-1023.

Lehtinen T, Lehtinen M (1998). Common and emerging infectious causes of hematological malignancies in the young. *APMIS* 106: 585-597.

Lennard L (1999). Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 47: 131-143.

Leong SL, Chaiyakunapruk N, Lee SW (2017). Candidate Gene Association Studies of Anthracycline-induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep* 7: 39.

Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR (2007). ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 7: 154-179.

Letourneau IJ, Deeley RG, Cole SP (2005). Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet Genomics* 15: 647-657.

- Levensen M, Rosthoj S, Nygaard U, Heldrup J, Harila-Saari A, Jonsson OG, *et al.* (2015). Myelotoxicity after high-dose methotrexate in childhood acute leukemia is influenced by 6-mercaptopurine dosing but not by intermediate thiopurine methyltransferase activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 75: 59-66.
- Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069: 1-9.
- Lewis IJ, Nooij MA, Whelan J, Sydes MR, Grimer R, Hogendoorn PC, *et al.* (2007). Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Natl Cancer Inst* 99: 112-128.
- Li H, Ryan TJ, Chave KJ, Van Roey P (2002). Three-dimensional structure of human gamma-glutamyl hydrolase. A class I glutamine amidotransferase adapted for a complex substrate. *J Biol Chem* 277: 24522-24529.
- Li L, Pan Q, Han W, Liu Z, Hu X (2007). Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin Cancer Res* 13: 6753-6760.
- Li S, Gao Y, Wang Y, Wang K, Dai ZP, Xu D, *et al.* (2016). Serum microRNA-17 functions as a prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncol Lett* 12: 4905-4910.
- Li YH, Wang YH, Li Y, Yang L (2006). MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao* 33: 93-104.
- Li YS, Deng ZH, Zeng C, Lei GH (2015). Role of osteopontin in osteosarcoma. *Med Oncol* 32: 449.
- Liegler DG, Henderson ES, Hahn MA, Oliverio VT (1969). The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man. *Clin Pharmacol Ther* 10: 849-857.
- Liew SC, Gupta ED (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* 58: 1-10.
- Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Monteiro J, Sousa H, Medeiros R, *et al.* (2014a). SLC19A1, SLC46A1 and SLC01B1 polymorphisms as predictors of methotrexate-related toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Toxicol Sci* 142: 196-209.
- Lima A, Bernardes M, Sousa H, Azevedo R, Costa L, Ventura F, *et al.* (2014b). SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics* 15: 807-820.
- Lin F, Juan Y, Zheng SE, Shen Z, Tang LN, Zhao H, *et al.* (2009). Relationship of serum methotrexate concentration in high-dose methotrexate chemotherapy to prognosis and tolerability: A prospective cohort study in Chinese adults with osteosarcoma. *Curr Ther Res Clin Exp* 70: 150-160.

Lin RC, Wang XL, Morris BJ (2003a). Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension* 41: 404-407.

Lin RC, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ (2003b). Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obes Res* 11: 802-808.

Linabery AM, Blommer CN, Spector LG, Davies SM, Robison LL, Ross JA (2013). ARID5B and IKZF1 variants, selected demographic factors, and childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leuk Res* 37: 936-942.

Lippens RJ, Winograd B (1988). Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction. *Pediatr Hematol Oncol* 5: 115-124.

Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE (2008). Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 94: 525-533.

Liu Q, Thorland EC, Heit JA, Sommer SS (1997). Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res* 7: 389-398.

Liu S, Yi Z, Ling M, Shi J, Qiu Y, Yang S (2014a). Predictive potential of ABCB1, ABCC3, and GSTP1 gene polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy. *Tumour Biol* 35: 9897-9904.

Liu Y, Yin Y, Sheng Q, Lu X, Wang F, Lin Z, *et al.* (2014b). Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9: e82681.

Liu YY, Li C, Cui Z, Fu X, Zhang S, Fan LL, *et al.* (2013). The effect of ABCB1 C3435T polymorphism on pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplantation: a meta-analysis. *Gene* 531: 476-488.

Longo-Sorbello GS, Bertino JR (2001). Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* 86: 121-127.

Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A (2014). Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 15: 1383-1398.

Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Pinan MA, Garcia-Miguel P, Navajas A, *et al.* (2011). Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 57: 612-619.

Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Pinan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, *et al.* (2013). Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 23: 53-61.

Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, *et al.* (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83: 965-1016.

Loukas YL, Thodi G, Molou E, Georgiou V, Dotsikas Y, Schulpis KH (2015). Clinical diagnostic Next-Generation sequencing: The case of CFTR carrier screening. *Scand J Clin Lab Invest*: 1-8.

Lu Y, Kham SK, Ariffin H, Oei AM, Lin HP, Tan AM, *et al.* (2014). Host genetic variants of ABCB1 and IL15 influence treatment outcome in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 110: 1673-1680.

Lv X, Zhang Y, Zeng F, Yin A, Ye N, Ouyang H, *et al.* (2014). The association between the polymorphism rs2231142 in the ABCG2 gene and gout risk: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 33: 1801-1805.

Ma CX, Sun YH, Wang HY (2015). ABCB1 polymorphisms correlate with susceptibility to adult acute leukemia and response to high-dose methotrexate. *Tumour Biol* 36: 7599-7606.

Majnik J, Patocs A, Balogh K, Luczay A, Torok D, Szabo V, *et al.* (2006). [Nucleotide sequence variants of the glucocorticoid receptor gene and their significance in determining glucocorticoid sensitivity]. *Orv Hetil* 147: 2107-2115.

Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF (2009). Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1179: 179-198.

Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Peters C, Hann I, *et al.* (2010). Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood* 116: 2644-2650.

Mansego ML, Solar Gde M, Alonso MP, Martinez F, Saez GT, Escudero JC, *et al.* (2011). Polymorphisms of antioxidant enzymes, blood pressure and risk of hypertension. *J Hypertens* 29: 492-500.

Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R (2004). Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 9: 422-441.

Marino S, Verzegnassi F, Tamaro P, Stocco G, Bartoli F, Decorti G, *et al.* (2009). Response to glucocorticoids and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: role of polymorphisms of genes involved in glucocorticoid response. *Pediatr Blood Cancer* 53: 984-991.

Martinelli M, Scapoli L, Cura F, Rodia MT, Ugolini G, Montroni I, *et al.* (2014). Colorectal cancer susceptibility: apparent gender-related modulation by ABCB1 gene polymorphisms. *J Biomed Sci* 21: 89.

- Marulanda GA, Henderson ER, Johnson DA, Letson GD, Cheong D (2008). Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. *Cancer Control* 15: 13-20.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75: 13-33.
- Matherly LH, Hou Z, Deng Y (2007). Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 26: 111-128.
- McNally RJ, Parker L (2006). Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47: 583-598.
- Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M (2015). Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev* 29: 243-249.
- Menconi M, Fareed M, O'Neal P, Poylin V, Wei W, Hasselgren PO (2007). Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. *Crit Care Med* 35: S602-608.
- Menna P, Recalcati S, Cairo G, Minotti G (2007). An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 7: 80-85.
- Miksys SL, Tyndale RF (2002). Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J Psychiatry Neurosci* 27: 406-415.
- Milano G, Thyss A, Serre Debeauvais F, Laureys G, Benoit Y, Deville A, *et al.* (1990). CSF drug levels for children with acute lymphoblastic leukemia treated by 5 g/m² methotrexate. A study from the EORTC Children's Leukemia Cooperative Group. *Eur J Cancer* 26: 492-495.
- Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP (1996). Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 559-565.
- Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* 115: 1531-1543.
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H (2004). Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 109: 238-246.
- Moorman AV (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* 26: 123-135.
- Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B (2009). New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem* 16: 1656-1672.
- Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, *et al.* (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 24: 265-284.

Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, *et al.* (2008). Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 111: 4477-4489.

Mueller KM, Themanns M, Friedbichler K, Kornfeld JW, Esterbauer H, Tuckermann JP, *et al.* (2012). Hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling in body growth, steatosis and metabolic liver cancer development. *Mol Cell Endocrinol* 361: 1-11.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, *et al.* (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1466-1483.

Muller P, Asher N, Heled M, Cohen SB, Risch A, Rund D (2008). Polymorphisms in transporter and phase II metabolism genes as potential modifiers of the predisposition to and treatment outcome of de novo acute myeloid leukemia in Israeli ethnic groups. *Leuk Res* 32: 919-929.

Mullighan CG (2011). Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 24: 489-503.

Mullighan CG (2013). Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 50: 314-324.

Namazi S, Zareifar S, Monabati A, Ansari S, Karimzadeh I (2011). Evaluating the effect of 3 glucocorticoid receptor gene polymorphisms on risk of relapse in 100 Iranian children with acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Clin Ther* 33: 280-290.

Naramoto H, Uematsu T, Uchihashi T, Doto R, Matsuura T, Usui Y, *et al.* (2007). Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol* 30: 393-401.

Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, *et al.* (2004). Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 934-938.

Niedzielska E, Weclawek-Tompol J, Matkowska-Kocjan A, Chybicka A (2013). The influence of genetic RFC1, MS and MTHFR polymorphisms on the risk of acute lymphoblastic leukemia relapse in children and the adverse effects of methotrexate. *Adv Clin Exp Med* 22: 579-584.

Niemann A, Muhlisch J, Fruhwald MC, Gerss J, Hempel G, Boos J (2010). Therapeutic drug monitoring of methotrexate in cerebrospinal fluid after systemic high-dose infusion in children: can the burden of intrathecal methotrexate be reduced? *Ther Drug Monit* 32: 467-475.

Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011). Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63: 157-181.

Nies AT, Keppler D (2007). The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453: 643-659.

Nussinovitch U, de Carvalho JF, Pereira RM, Shoenfeld Y (2010). Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art. *Curr Pharm Des* 16: 3574-3585.

Oakley RH, Cidlowski JA (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286: 3177-3184.

Oakley RH, Cidlowski JA (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132: 1033-1044.

Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmuller D, Schulze A, Schmid W, *et al.* (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 18: 1346-1353.

Oselin K, Mrozikiewicz PM, Gaikovitch E, Pahkla R, Roots I (2003). Frequency of MRP1 genetic polymorphisms and their functional significance in Caucasians: detection of a novel mutation G816A in the human MRP1 gene. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 347-350.

Ottaviani G, Jaffe N (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 152: 3-13.

Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W (2013). Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J* 13: 227-234.

Pakos EE, Nearchou AD, Grimer RJ, Koumoullis HD, Abudu A, Bramer JA, *et al.* (2009). Prognostic factors and outcomes for osteosarcoma: an international collaboration. *Eur J Cancer* 45: 2367-2375.

Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE (2010). Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol* 6: e1001019.

Patino-Garcia A, Zalacain M, Marrodan L, San-Julian M, Sierrasesumaga L (2009). Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J Pediatr* 154: 688-693.

Patrick K, Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman AV, Rowntree C, *et al.* (2014). Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol* 166: 421-424.

Paxton JW (1984). Interaction of probenecid with the protein binding of methotrexate. *Pharmacology* 28: 86-89.

Perry JA, Kiezun A, Tonzi P, Van Allen EM, Carter SL, Baca SC, *et al.* (2014). Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E5564-5573.

Pfeil AM, Vulsteke C, Paridaens R, Dieudonne AS, Pettengell R, Hatse S, *et al.* (2014). Multivariable regression analysis of febrile neutropenia occurrence in early breast cancer patients receiving chemotherapy assessing patient-related, chemotherapy-related and genetic risk factors. *BMC Cancer* 14: 201.

Pillon M, Arico M, Mussolin L, Carraro E, Conter V, Sala A, *et al.* (2015). Long-term results of the AIEOP LNH-97 protocol for childhood lymphoblastic lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 62: 1388-1394.

Pimenta E, Wolley M, Stowasser M (2012). Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess. *Endocrinology* 153: 5137-5142.

Pinheiro JCB, D.M. (2000). Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. *Springer*.

Plard C, Bressolle F, Fakhoury M, Zhang D, Yacouben K, Rieutord A, *et al.* (2007). A limited sampling strategy to estimate individual pharmacokinetic parameters of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 609-620.

Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, *et al.* (2005). Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 11: 8661-8668.

Plasschaert SL, Groninger E, Boezen M, Kema I, de Vries EG, Uges D, *et al.* (2004). Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 76: 220-229.

Polgar O, Robey RW, Bates SE (2008). ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 1-15.

Poonkuzhali B, Lamba J, Strom S, Sparreboom A, Thummel K, Watkins P, *et al.* (2008). Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 36: 780-795.

Poos K, Smida J, Maugg D, Eckstein G, Baumhoer D, Nathrath M, *et al.* (2015). Genomic heterogeneity of osteosarcoma - shift from single candidates to functional modules. *PLoS One* 10: e0123082.

Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Geyer SM, Markovic SN (2002). Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 117: 629-633.

Pui CH (2015). Genomic and pharmacogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Med* 9: 1-9.

Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, *et al.* (2004). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 104: 2690-2696.

Puranik YG, Birnbaum AK, Marino SE, Ahmed G, Cloyd JC, Remmel RP, *et al.* (2013). Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. *Pharmacogenomics* 14: 35-45.

Pyatt D, Hays S (2010). A review of the potential association between childhood leukemia and benzene. *Chem Biol Interact* 184: 151-164.

Quarello P, Berger M, Rivetti E, Galletto C, Masetti R, Manicone R, *et al.* (2012). FLAG-liposomal doxorubicin (Myocet) regimen for refractory or relapsed acute leukemia pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 34: 208-216.

Rabin KR, Gramatges MM, Borowitz MJ, Palla SL, Shi X, Margolin JF, *et al.* (2012). Absolute lymphocyte counts refine minimal residual disease-based risk stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 59: 468-474.

Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, *et al.* (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121: 5145-5153.

Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, *et al.* (2013). Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood* 121: 898-904.

Ranganathan P, McLeod HL (2006). Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1366-1377.

Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, *et al.* (2008). Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 35: 572-579.

Ray A, Tennakoon L, Keller J, Sarginson JE, Ryan HS, Murphy GM, *et al.* (2014). ABCB1 (MDR1) predicts remission on P-gp substrates in chronic depression. *Pharmacogenomics J*.

Reichwagen A, Ziepert M, Kreuz M, Godtel-Armbrust U, Rixecker T, Poeschel V, *et al.* (2015). Association of NADPH oxidase polymorphisms with anthracycline-induced cardiotoxicity in the RICOVER-60 trial of patients with aggressive CD20(+) B-cell lymphoma. *Pharmacogenomics* 16: 361-372.

Ren R, Oakley RH, Cruz-Topete D, Cidlowski JA (2012). Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology* 153: 5346-5360.

Richards S, Pui CH, Gayon P (2013). Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 60: 185-195.

- Rizwan AN, Burckhardt G (2007). Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 24: 450-470.
- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, *et al.* (2009). ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 3-13.
- Rocha Gda G, Oliveira RR, Kaplan MA, Gattass CR (2014). 3beta-Acetyl tormentic acid reverts MRP1/ABCC1 mediated cancer resistance through modulation of intracellular levels of GSH and inhibition of GST activity. *Eur J Pharmacol* 741: 140-149.
- Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, *et al.* (2005). Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105: 4752-4758.
- Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, *et al.* (2007). Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies. *Cancer* 110: 375-384.
- Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, *et al.* (2000). A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res* 8: 211-218.
- Rousseau A, Marquet P (2002). Application of pharmacokinetic modelling to the routine therapeutic drug monitoring of anticancer drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 16: 253-262.
- Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G (2003). The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59: 237-241.
- Roy Moulik N, Kumar A, Agrawal S, Awasthi S, Mahdi AA (2015). Role of folate status and methylenetetrahydrofolate reductase genotype on the toxicity and outcome of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 56: 1379-1384.
- Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC (2006). Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop* 30: 437-444.
- Rubnitz JE, Relling MV, Harrison PL, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, *et al.* (1998). Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 12: 1176-1181.
- Rubnitz JE, Campbell P, Zhou Y, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, *et al.* (2013). Prognostic impact of absolute lymphocyte counts at the end of remission induction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 119: 2061-2066.
- Rudant J, Orsi L, Bonaventure A, Goujon-Bellec S, Baruchel A, Petit A, *et al.* (2015). ARID5B, IKZF1 and non-genetic factors in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia: the ESCALE study. *PLoS One* 10: e0121348.

Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, *et al.* (2005). Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5804-5810.

Saag KG, Shane E, Boonen S, Marin F, Donley DW, Taylor KA, *et al.* (2007). Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 357: 2028-2039.

Sadhasivam S, Chidambaran V, Zhang X, Meller J, Esslinger H, Zhang K, *et al.* (2014). Opioid-induced respiratory depression: ABCB1 transporter pharmacogenetics. *Pharmacogenomics J*.

Sainz J, Rudolph A, Hein R, Hoffmeister M, Buch S, von Schonfels W, *et al.* (2011). Association of genetic polymorphisms in ESR2, HSD17B1, ABCB1, and SHBG genes with colorectal cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 18: 265-276.

Sakaeda T (2005). MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 391-414.

Sakiyama M, Matsuo H, Takada Y, Nakamura T, Nakayama A, Takada T, *et al.* (2014). Ethnic Differences in ATP-binding Cassette Transporter, Sub-Family G, Member 2 (ABCG2/BCRP): Genotype Combinations and Estimated Functions. *Drug Metab Pharmacokinet*.

Sandhanaraj E, Lal S, Selvarajan V, Ooi LL, Wong ZW, Wong NS, *et al.* (2008). PXR pharmacogenetics: association of haplotypes with hepatic CYP3A4 and ABCB1 messenger RNA expression and doxorubicin clearance in Asian breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 14: 7116-7126.

Sani SN, Henry K, Bohlke M, Kim J, Stricker-Krongrad A, Maher TJ (2010). The effects of drug transporter inhibitors on the pharmacokinetics and tissue distribution of methotrexate in normal and tumor-bearing mice: a microdialysis study. *Cancer Chemother Pharmacol* 66: 159-169.

Saravana S, Lalukotta K (2003). Myelotoxicity due to methotrexate - an iatrogenic cause. *Eur J Haematol* 71: 315-316.

Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A (2004). ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 567: 116-120.

Saumet A, Mathelier A, Lecellier CH (2014). The potential of microRNAs in personalized medicine against cancers. *Biomed Res Int* 2014: 642916.

Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, Robel K, Illmer T, Kramer M, *et al.* (2009). A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol* 20: 175-181.

Schmiegelow K (2009). Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol* 146: 489-503.

Schmiegelow K, Pulczynska M (1990). Prognostic significance of hepatotoxicity during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 61: 767-772.

Schneider E, Ryan TJ (2006). Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta* 374: 25-32.

Schrappé M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, *et al.* (2000). Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 14: 2205-2222.

Schrappé M, Hunger SP, Pui CH, Saha V, Gaynon PS, Baruchel A, *et al.* (2012). Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 366: 1371-1381.

Schrappé M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, *et al.* (2011). Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 118: 2077-2084.

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, *et al.* (2003). Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124: 26-33.

Seidel H, Andersen A, Kvaloy JT, Nygaard R, Moe PJ, Jacobsen G, *et al.* (2000). Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables. *Leuk Res* 24: 193-199.

Seidemann K, Book M, Zimmermann M, Meyer U, Welte K, Stanulla M, *et al.* (2006). MTHFR 677 (C-->T) polymorphism is not relevant for prognosis or therapy-associated toxicity in pediatric NHL: results from 484 patients of multicenter trial NHL-BFM 95. *Ann Hematol* 85: 291-300.

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszal PS, *et al.* (2012). ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Biol Int* 36: 79-86.

Sharifi MJ, Bahoush G, Zaker F, Ansari S, Rafsanjani KA, Sharafi H (2014). Association of -24CT, 1249GA, and 3972CT ABCC2 gene polymorphisms with methotrexate serum levels and toxic side effects in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 31: 169-177.

Shen HQ, Feng JH, Tang YM, Song H, Yang SL, Shi SW, *et al.* (2013). Absolute lymphocyte count is associated with minimal residual disease level in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 37: 671-674.

Shin D, Arthur G, Popescu M, Korkin D, Shyu CR (2014). Uncovering influence links in molecular knowledge networks to streamline personalized medicine. *J Biomed Inform* 52: 394-405.

Shiotani A, Murao T, Fujita Y, Fujimura Y, Sakakibara T, Nishio K, *et al.* (2014). Single nucleotide polymorphism markers for low-dose aspirin-associated peptic ulcer and ulcer bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 29 Suppl 4: 47-52.

Shkalim Zemer V, Toledano H, Ash S, Cohen E, Yaniv I, Cohen IJ (2016). Factors Affecting the Upper Limit of the Methotrexate (MTX) CSF Levels Achievable in Children With Brain Tumors Treated With High-dose Intravenous MTX. *J Pediatr Hematol Oncol* 38: 544-548.

Shpilberg Y, Beaudry JL, D'Souza A, Campbell JE, Peckett A, Riddell MC (2012). A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech* 5: 671-680.

Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Avrahami G, Yaniv I (2002). Methotrexate-related neurotoxicity in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Isr Med Assoc J* 4: 1050-1053.

Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, *et al.* (2006). Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br J Haematol* 134: 596-601.

Simon N, Marsot A, Villard E, Choquet S, Khe HX, Zahr N, *et al.* (2012). Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *Pharmacogenomics J*.

Skarby T, Jonsson P, Hjorth L, Behrentz M, Bjork O, Forestier E, *et al.* (2003). High-dose methotrexate: on the relationship of methotrexate elimination time vs renal function and serum methotrexate levels in 1164 courses in 264 Swedish children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 311-320.

Smeland S, Muller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Bjork O, *et al.* (2003). Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer* 39: 488-494.

Solbach TF, Konig J, Fromm MF, Zolk O (2006). ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 16: 7-15.

Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC (2003). Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 144: 1164-1174.

Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ (2010). The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet Genomics* 20: 1-8.

Srivastava N, Prakash J, Lakhan R, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B (2011). Influence of Bcl-1 Gene Polymorphism of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1, rs41423247) on Blood Pressure, Glucose in Northern Indians. *Indian J Clin Biochem* 26: 125-130.

Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR (2013). Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance. *Mol Pharmacol* 84: 655-669.

Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, Zhang M, James J, Frampton C, *et al.* (2010). Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics* 20: 367-376.

Stanulla M, Cario G, Meissner B, Schrauder A, Moricke A, Riehm H, *et al.* (2007). Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia--a perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol Dis* 39: 160-163.

Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, *et al.* (2005). Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 293: 1485-1489.

Sterba J, Dusek L, Demlova R, Valik D (2006). Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clin Chem* 52: 692-700.

Stocco G, Franca R, Verzegnassi F, Londero M, Rabusin M, Decorti G (2013). Pharmacogenomic approaches for tailored anti-leukemic therapy in children. *Curr Med Chem* 20: 2237-2253.

Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, *et al.* (2010). Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115: 4657-4663.

Strobl C, Boulesteix AL, Kneib T, Augustin T, Zeileis A (2008). Conditional variable importance for random forests. *BMC Bioinformatics* 9: 307.

Sugalski AJ, Jiواني A, Ketchum NS, Cornell J, Williams R, Heim-Hall J, *et al.* (2014). Characterization of localized osteosarcoma of the extremity in children, adolescents, and young adults from a single institution in South Texas. *J Pediatr Hematol Oncol* 36: e353-358.

Sun D, Elson P, Liedtke M, Medeiros BC, Earl M, Alizadeh A, *et al.* (2012). Absolute lymphocyte count at day 28 independently predicts event-free and overall survival in adults with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 87: 957-960.

Suthandiram S, Gan GG, Zain SM, Bee PC, Lian LH, Chang KM, *et al.* (2014). Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics* 15: 1479-1494.

Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13: 379-393.

Szczepankiewicz A, Leszczynska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarz M, Wilkosc M, *et al.* (2011). Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord* 134: 138-144.

Szendroi M, Papai Z, Koos R, Illes T (2000). Limb-saving surgery, survival, and prognostic factors for osteosarcoma: the Hungarian experience. *J Surg Oncol* 73: 87-94.

Szilvasi A, Andrikovics H, Kalmar L, Bors A, Tordai A (2005). Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clin Biochem* 38: 727-730.

Szychot E, Brodkiewicz A, Peregud-Pogorzelski J (2014). How have advances in our understanding of the molecular genetics of paediatric leukaemia led to improved targeted therapies for these diseases? *Adv Clin Exp Med* 23: 469-474.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, *et al.* (2002). Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 666-671.

Takeuchi A, Lewis VO, Satcher RL, Moon BS, Lin PP (2014). What are the factors that affect survival and relapse after local recurrence of osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res* 472: 3188-3195.

Takeuchi S, Tsukasaki K, Bartram CR, Seriu T, Zimmermann M, Schrappe M, *et al.* (2003). Long-term study of the clinical significance of loss of heterozygosity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17: 149-154.

Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC (2008). Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 466: 2114-2130.

Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147: 5549-5556.

Taub JW, Matherly LH, Ravindranath Y, Kaspers GJ, Rots MG, Zantwijk CH (2002). Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 16: 764-765.

Tedeschi SK, Jagasia M, Engelhardt BG, Domm J, Kassim AA, Chinratanalab W, *et al.* (2011). Early lymphocyte reconstitution is associated with improved transplant outcome after cord blood transplantation. *Cytotherapy* 13: 78-82.

Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Brinkhof B, van Rossum EF, van Wering ER, *et al.* (2005). Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 11: 6050-6056.

Tremblay A, Bouchard L, Bouchard C, Despres JP, Drapeau V, Perusse L (2003). Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3141-3145.

Trevino LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, *et al.* (2009a). Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* 27: 5972-5978.

Trevino LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, *et al.* (2009b). Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41: 1001-1005.

Tsai WS, Wu CP, Hsu YJ, Lin SH (2004). Life-threatening hypokalemia in an asthmatic patient treated with high-dose hydrocortisone. *Am J Med Sci* 327: 152-155.

Tsang BL, Devine OJ, Cordero AM, Marchetta CM, Mulinare J, Mersereau P, *et al.* (2015). Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr*.

Tsuchiya N, Inoue T, Narita S, Kumazawa T, Saito M, Obara T, *et al.* (2008). Drug related genetic polymorphisms affecting adverse reactions to methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in patients with urothelial cancer. *J Urol* 180: 2389-2395.

Tsukada T, Nakano T, Miyata T, Sasaki S (2013). Life-Threatening Gastrointestinal Mucosal Necrosis during Methotrexate Treatment for Rheumatoid Arthritis. *Case Rep Gastroenterol* 7: 470-475.

Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, *et al.* (2001). Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 98: 231-234.

Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL (2007). MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1172-1177.

Vagace JM, de la Maya MD, Caceres-Marzal C, Gonzalez de Murillo S, Gervasini G (2012). Central nervous system chemotoxicity during treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 84: 274-286.

Vaitkeviciene G, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Jonsson OG, Lahteenmaki PM, *et al.* (2011). High white blood cell count at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukaemia: biological background and prognostic impact. Results from the NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies. *Eur J Haematol* 86: 38-46.

Valente EM, Dallapiccola B, Bertini E (2013). Joubert syndrome and related disorders. *Handb Clin Neurol* 113: 1879-1888.

van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC (2011). Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003917.

van der Linden MH, Valsecchi MG, De Lorenzo P, Moricke A, Janka G, Leblanc TM, *et al.* (2009). Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood* 114: 3764-3768.

van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW (2015). New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 11: 273-293.

van Outryve S, Schrijvers D, van den Brande J, Wilmes P, Bogers J, van Marck E, *et al.* (2002). Methotrexate-associated liver toxicity in a patient with breast cancer: case report and literature review. *Neth J Med* 60: 216-222.

van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, *et al.* (2004). The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4004-4009.

van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, *et al.* (2006). Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry* 59: 681-688.

van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, *et al.* (2002). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51: 3128-3134.

van Rossum EF, de Jong FJ, Koper JW, Uitterlinden AG, Prins ND, van Dijk EJ, *et al.* (2008). Glucocorticoid receptor variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol Aging* 29: 716-723.

van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, *et al.* (2003). Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59: 585-592.

van Winsen LM, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Koper JW, Barkhof F, Polman CH, *et al.* (2007). Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with more aggressive disease phenotype in MS. *J Neuroimmunol* 186: 150-155.

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA, Jr., Kalyanaraman B (1997). Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* 36: 11293-11297.

Visscher H, Rassekh SR, Sandor GS, Caron HN, van Dalen EC, Kremer LC, *et al.* (2015). Genetic variants in SLC22A17 and SLC22A7 are associated with anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pharmacogenomics* 16: 1065-1076.

Visscher H, Ross CJ, Rassekh SR, Barhdadi A, Dube MP, Al-Saloos H, *et al.* (2012). Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *J Clin Oncol* 30: 1422-1428.

Vitagliano O, Addeo R, D'Angelo V, Indolfi C, Indolfi P, Casale F (2013). The Bcl-2/Bax and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways: implications in pediatric leukemia pathogenesis and new prospects for therapeutic approaches. *Expert Rev Hematol* 6: 587-597.

Vora A, Goulden N, Mitchell C, Hancock J, Hough R, Rowntree C, *et al.* (2014). Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 15: 809-818.

Vulsteke C, Lambrechts D, Dieudonne A, Hatse S, Brouwers B, van Brussel T, *et al.* (2013). 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* 24: 1513-1525.

Vulsteke C, Pfeil AM, Maggen C, Schwenkglenks M, Pettengell R, Szucs TD, *et al.* (2015). Clinical and genetic risk factors for epirubicin-induced cardiac toxicity in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 152: 67-76.

Wakeford R (2013). The risk of childhood leukaemia following exposure to ionising radiation--a review. *J Radiol Prot* 33: 1-25.

Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W (2005). Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 15: 693-704.

Wang H, Jin G, Liu G, Qian J, Jin L, Wei Q, *et al.* (2009). Genetic susceptibility of lung cancer associated with common variants in the 3' untranslated regions of the adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and ABCC1 candidate transporter genes for carcinogen export. *Cancer* 115: 595-607.

Wang X, Liu W, Sun CL, Armenian SH, Hakonarson H, Hageman L, *et al.* (2014). Hyaluronan synthase 3 variant and anthracycline-related cardiomyopathy: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 32: 647-653.

Wang Z, Sew PH, Ambrose H, Ryan S, Chong SS, Lee EJ, *et al.* (2006). Nucleotide sequence analyses of the MRP1 gene in four populations suggest negative selection on its coding region. *BMC Genomics* 7: 111.

Warren RB, Smith RL, Campalani E, Eyre S, Smith CH, Barker JN, *et al.* (2008). Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 128: 1925-1929.

Warta R, Theile D, Mogler C, Herpel E, Grabe N, Lahrmann B, *et al.* (2014). Association of drug transporter expression with mortality and progression-free survival in stage IV head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9: e108908.

Watanabe M, Fukuoka N, Takeuchi T, Yamaguchi K, Motoki T, Tanaka H, *et al.* (2014). Developing population pharmacokinetic parameters for high-dose methotrexate therapy: implication of correlations among developed parameters for individual parameter estimation using the Bayesian least-squares method. *Biol Pharm Bull* 37: 916-921.

- Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, *et al.* (1992). Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 10: 473-482.
- Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6865-6870.
- Wen CC, Yee SW, Liang X, Hoffmann TJ, Kvale MN, Banda Y, *et al.* (2015). Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response. *Clin Pharmacol Ther*.
- Weng Y, Chen Y, Chen J, Liu Y, Bao T (2015). Common genetic variants in microRNA processing machinery genes are associated with risk and survival in patients with osteosarcoma. *Mol Genet Genomics*.
- Westerhout J, van den Berg DJ, Hartman R, Danhof M, de Lange EC (2014). Prediction of methotrexate CNS distribution in different species - influence of disease conditions. *Eur J Pharm Sci* 57: 11-24.
- Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, *et al.* (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther* 92: 414-417.
- Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 11: 694-703.
- Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, *et al.* (2004). High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* 100: 2222-2232.
- Wiela-Hojenska A, Gorczynska E, Orzechowska-Juzwenko K, Golebiowski W, Hurkacz M, Boguslawska-Jaworska J (2001). Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 39: 246-250.
- Windsor RE, Strauss SJ, Kallis C, Wood NE, Whelan JS (2012). Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer* 118: 1856-1867.
- Woessmann W, Seidemann K, Mann G, Zimmermann M, Burkhardt B, Oschlies I, *et al.* (2005). The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. *Blood* 105: 948-958.
- Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, *et al.* (2005). NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 112: 3754-3762.

Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K (2000). Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit* 6: 411-420.

Wust S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH (2004). Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 565-573.

Wysocki M, Balcar-Boron A, Krzyzanowski M, Szadujkis-Szadurski L, Ozynski T, Nowaczyk-Michalak A (1992). [Cerebrospinal fluid methotrexate level in children treated with medium-high and high doses of the drug]. *Acta Haematol Pol* 23: 185-190.

Xing D, Qasem SA, Owusu K, Zhang K, Siegal GP, Wei S (2014). Changing prognostic factors in osteosarcoma: analysis of 381 cases from two institutions. *Hum Pathol* 45: 1688-1696.

Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, *et al.* (2012). ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 30: 751-757.

Xu W, Tang Y, Song H, Shi S, Yang S (2007). Retrospective study on elimination delay of methotrexate in high-dose therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia in China. *J Pediatr Hematol Oncol* 29: 688-693.

Xue L, Li C, Wang Y, Sun W, Ma C, He Y, *et al.* (2015). Single nucleotide polymorphisms in non-coding region of the glucocorticoid receptor gene and prednisone response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 56: 1704-1709.

Yamamoto K, Sawada Y, Matsushita Y, Moriwaki K, Bessho F, Iga T (1997). Delayed elimination of methotrexate associated with piperacillin administration. *Ann Pharmacother* 31: 1261-1262.

Yan T, Deng S, Metzger A, Godtel-Armbrust U, Porter AC, Wojnowski L (2009). Topoisomerase II{alpha}-dependent and -independent apoptotic effects of dexrazoxane and doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 8: 1075-1085.

Yanagimachi M, Goto H, Kaneko T, Naruto T, Sasaki K, Takeuchi M, *et al.* (2013). Influence of pre-hydration and pharmacogenetics on plasma methotrexate concentration and renal dysfunction following high-dose methotrexate therapy. *Int J Hematol* 98: 702-707.

Yee SW, Gong L, Badagnani I, Giacomini KM, Klein TE, Altman RB (2010). SLC19A1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics* 20: 708-715.

Yoon KH, Ng SC (2001). Early onset methotrexate-induced pancytopenia and response to G-CSF: a report of two cases. *J Clin Rheumatol* 7: 17-20.

Youssef G, Links M (2005). The prevention and management of cardiovascular complications of chemotherapy in patients with cancer. *Am J Cardiovasc Drugs* 5: 233-243.

Zelcer S, Kellick M, Wexler LH, Shi W, Sankaran M, Lo S, *et al.* (2005). Methotrexate levels and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 44: 638-642.

Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, *et al.* (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev* 10: 305-310.

Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD (2001). Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res* 61: 7225-7232.

Zeng H, Wang XB, Cui NH, Nam S, Zeng T, Long X (2014). Associations between AT-rich interactive domain 5B gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 6211-6217.

Zgheib NK, Akra-Ismail M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, *et al.* (2014). Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 24: 387-396.

Zhang C, Zhai S, Yang L, Wu H, Zhang J, Ke X (2010). Population pharmacokinetic study of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48: 11-21.

Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, *et al.* (2001). The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 11: 555-572.

Zhao XQ, Cao WJ, Yang HP, Yang XW, Tang P, Sun L, *et al.* (2016). DPYD gene polymorphisms are associated with risk and chemotherapy prognosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol* 37: 10393-10402.

Zhou SF (2008). Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38: 802-832.

Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, *et al.* (2008). Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* 15: 1981-2039.