



SEMMELWEIS EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar

I. sz. Belgyógyászati Klinika
Igazgató: Dr. Szathmári Miklós
1083. Budapest, Korányi Sándor u. 2/a.
Tel.: 459-1500 Fax: 313-0250



Hivatalos bíráló

dr. Kovács Gábor „Prognosztikai faktorok és a kezelés során fellépő mellékhatásokat befolyásoló tényezők vizsgálata gyermekkori akut lymphoid leukémiában és oszteoszarkómában” címmel

az MTA Doktori Tanácsának benyújtott doktori értekezéséről.

A doktori értekezés a gyermekkori akut lymphoid leukémia (ALL) és az oszteoszarkóma (OSC) prognosztikai tényezőit és a kezelés során fellépő mellékhatásokat befolyásoló tényezőket vizsgáló, értékelő óriási, igen alapos munka, a klinikai munkával és ezzel párhuzamosan kutatással eltöltött évtizedek gyümölcse.

Az értekezés terjedelme 187 oldal, az irodalomjegyzék 496 irodalmi hivatkozást tartalmaz, a munkát 56 ábra, 27 táblázat.

A munka nyelvezete jól érthető, követhető, a szerkesztés igen gondos.

A bevezetés jól tükrözi, hogy a tudományos munkásság egyik fő célja a gyermekkori hematológiai malignitások miatt kezelésben részesült és gyógyult betegeken a sokféle lehetséges szervkárosodás megelőzése, felismerése, gondozása. A másik fő cél, hogy a kezelés valóban személyre szabottan történjen és a kezelések szövődményeit azáltal előzzék meg, hogy a terápiás protokollok alkalmazásakor individuális toxicitási profilokat határozzanak meg.

Az irodalmi összefoglalásban az ALL, majd az OSC prognosztikai tényezőit elemzi (9-14. oldal). Az ALL prognosztikai tényezői tekintetében sorban értékeli az életkorra, a kezdeti fvs.-számra, a máj- lép nagyságra, a meningeális érintettségrr és a leukémia immunfenotípusára vonatkozó adatokat és hangsúlyozza, hogy mind a napig az egyik legfontosabb prognosztikai marker a kezdeti prednisolon kezelésre adott válasz: a perifériás blasztok abszolút száma a 8. napon. Elemzi a flow citometriával végzett minimális reziduális betegség meghatározást, a PCR – MRD jelentőségét és a daganatsejtek genetikai eltéréseinek klinikai következményeit. A farmakokinetika, ill. toxicitás fejezetben csak azon citosztatikumok jellemzőit mutatja be részletesebben, amelyek a dolgozatban vizsgált is (MTX, antracyclinek és glukocorticoidok). (14-31 oldalak). A világos megfogalmazású, kitűnő áttekintői ábráit Kovács Gábor dr. iskolateremtő munkásságának jeleként az általa vezetett PhD értekezésekből származó és ekként jelölt ábrákkal szemlélteti. A farmakogenetika fejezetben azokat a tényezőket mutatja be, melyek az általa vizsgálat citosztatikumok (MTX, antraciklinek, glukocorticoidok) farmakogenetikájában szerepet játszanak, így az ABC tranporterek, a metothrexat hatásmechanizmusában szerepet játszó enzimek és génjeik, többek közt az MTHFR szerepét. Vizsgálja egyes genetikai polimorfizmusok szerepét az antracyclin okozta cardiotoxicitásban és összefoglalja a glukocorticoid receptor polimorfizmusokkal kapcsolatos ismereteket. (32-47. oldal)

A célkitűzések fejezetben három fő pontba csoportosítja. Célul tűzte ki a prognosztikai tényezők vizsgálatát gyerekkori ALL-ben és oszteosarcomában, az MTX farmakokinetikájának és toxicitásának vizsgálatát gyerekkori malignitásokban és farmakogenetikai vizsgálatokat végzett gyerekkori ALL-ben és oszteosarcomában. Számos genetikai polimorfizmus és a kemoterápiás toxicitás közti asszociáció lehetőségét vizsgálta.

Az ALL prognosztikai tényezőit 2002 december és 2011 június közti időszakban a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján ALL IC BFM 2002 protokoll szerint kezelt 133 gyermek adatait elemezve vizsgálta. A betegek 82%-ka esetében a B-lymphocita sejtvonal, 17,3 % esetén a T-lymphocytá sejtvonal volt érintett, egy esetben bifenotípusos ALL-t diagnosztáltak. A kockázati besorolás a BFM munkacsoport ajánlása alapján történt és lehetséges új prognosztikai markerként elemezték a perifériás vérben az abszolút lymphocytaszámot a 8. 15 és 33. napon. Meghatározták a csontvelőbe a 15. és 33. napon a terápiás válasz három különféle MRD módszerrel is (fénymikroszkópos morfológia, áramlási citometria és PCR). A gyerekkori OSC esetében az 1987 és 2006 közt a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinikán kezelt 122 beteg adatait elemezték, a műtét típusa, a metasztázis léte vagy hiánya, a szövettani altípus, a neoadjuváns kemoterápiára adott szövettani válasz, az életkór, valamint a COSS protokollok szerinti rizikócsoporthoz mentén. A IV/II fejezet részletesen vizsgálja a HD-MTX toxicitását és farmakokinetikáját gyerekkori ALL-ben és OSC-ben. ALL esetében a HD-MTX farmakokinetikai paramétereit, összesen 153 ALL-es beteg 583 HD-MTX kezelése során elemezték, míg az OSC csoportban 98 beteg 765 MTX blokkja (teljes adagú un. szabályos blokk) képezte a farmakokinetikai elemzés homogén adatbázisát. Vesetoxicitási vizsgálatok, szérumszint és liquor MTX mérések történtek, vizsgálták a genetikai tényezők hatását a kezelésekre immunszuppresszív mellékhatásaira ALL-ben. MTX farmakogenetikai vizsgálatok történtek 118 ALL-es beteg DNS mintáin és 62 OSC-ben szenvedő gyermek adatainak elemzése révén. A munkában az ETT-TUKEB engedély számait is pontosan feltünteti. Részletesen elemzi azokat a statisztikai módszereket, amelyeket a munka során végeztek. (Egyes elemzések a Budapesti Műszaki Egyetem Méréstechnika- és Információs Rendszerek Tanszékén történtek. (Betegek, módszerek fejezet: 50-69. oldal.)

Az eredményeket hasonló hármass csoportosításban a 70-140. oldalon találjuk. A prognosztikai tényezőkre az MTX farmakokinetikai és toxikogenetikai vizsgálatok és a farmakogenetikai vizsgálatokra történt bontás jól követhető és a részletes táblázatok mellett szemléletes ábrák mutatják a lehetséges prognosztikai faktorok szerepét a túlélésre ALL-ben és OSC-ben. Különösen szemléletes a 13. ábra, amely egy lehetséges új prognosztikai faktor, az abszolút lymphocytá szám túléléssel való összefüggését szemléletes, különböző határértékeket (350/ul, 500/ul, 1000/ul, 1500/ul) alapul véve vizsgálták a kezelés hatását és a túlélést, megállapították, hogy a 33. napon mért ALC értékek (ALC 33) szignifikáns összefüggést mutattak a betegek túlélésével ALL-ben.

A megbeszélések, következtetés fejezet (142-182. oldalak) a talált számos összefüggés, köztük több elsőként leírt összefüggést irodalmi kontextusba helyezi, a végső következtetés pedig a számos újonnan felismert összefüggés ellenére mértéktartó. Megállapítja, hogy egy-egy SNP terápiás szerepe nem lesz átütő, nem fog tudni segíteni az orvosnak a kezelés helyes megválasztásában, a továbbiakban nagylétszámú betegen végzett és sok SNP hatását vizsgáló kutatásokra van szükség. A jövőben genom szintű elemzések segíthetnek a különböző farmakokinetikai és farmakogenetikai profilok populáció szintű alkalmazásában.

A VII. fejezet (összefoglalás és az eredmények klinikai hasznosítása) tömören elemzi a munka fő eredményeit. Az intenzív kezelés végén (33. nap) mért abszolút lymphocytá szám gyerekkori ALL-ben egy potenciális új prognosztikai faktor, amely egyszerűen megjósolhatja a betegség kimenetelét, valódi gyakorlati haszonnal rendelkező újdonság. A kutatás során információkat szereztek az MTX farmakokinetikájáról, kiemelve pl. a bomlástermék 7-OH MTX fontos szerepét. Eredményeik alapján a gyerekek kezelésében több változtatást is bevezettek.

Rendszeresen vizsgálják az ALL-ben az intenzív kezelés során az abszolút lymphocyta számot, mint a kezelés hatékonyságának egy potenciális új markerét. Ma már minden gyermek intenzív hidrálást és alkalizálást kap a nagyadagú MTX kezelés során, hogy a potenciális vesefunkció károsodást megelőzzék. Amennyiben a szérumszintje jelentősen alacsony és a HD-MTX kezelést követően a szérumszintek a toxikus tartományban vannak, akkor humán albumin infúzióval csökkentik a toxicitást és segítik elő az MTX kiürülését. A liquor MTX szintek meghatározása céljából az intratekális MTX kezelést az infúzió 24. órájában adják be rendszeres, hogy az iv. kezeléssel elért liquor MTX szinteket meg tudják határozni. Sem a vizsgálati eredményeik, sem 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 multinacionális vizsgálat indult az optimális MTX adag kiválasztására. A vizsgálat tervezésében és irányításában Magyarország döntő szerepet játszik: (BFM ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood **non-B** Acute Lymphoblastic Leukemia), Dr Kovács Gábor pedig a vizsgálat 10 tagú steering committee-jének egyikeként a vizsgálat ezen albizottságában képviseli Magyarországot. A fentiekben túlmenően egységes országos ajánlást állítottak össze a különböző gyerekkori daganatos betegségből gyógyultak hosszú távú követésére.

A kérelmező számos eredménye közül az alábbiakat emelem ki:

I. Prognosztikai faktorok gyermekkori ALL-ben és OSC-ban

1. A legújabb nemzetközi adatoknak megfelelően megerősítették, hogy gyermekkori ALL-ben a 33. napon mért abszolút limfocita szám egy új és szignifikáns prognosztikai faktor lehet, különösen közepes kockázatú (MR) és nagy kockázatú (HR) betegekben. Saját eredményeik alapján a 350 sejt/ μ l és az 500 sejt/ μ l feletti ALC értékek voltak a jobb túléléssel szignifikánsan összefüggésbe hozhatóak.

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 a nagy kockázatú (HR) ALL-es betegekben.

II. MTX farmakokinetika és toxicitás

1. Bebizonyították, hogy intenzív hidrálással és alkalizálással a HD-MTX kezeléseket vesetoxicitása OSC-ban és hematológiai malignitásokban egyaránt csökkenthető.
2. A központi idegrendszerbe az alkalmazott dózistól független arányban jut be a MTX (kb. 2,5-3 %). A nagyobb gyógyszeradaggal megbízhatóbban és nagyobb arányban lehet elérni a likvorban a citotoxikusnak (terápiásnak) vélt 1 μ mol/l szintet (ALL-ben).
3. A 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.

III. Farmakogenetika

1. Az ABCC1 gén egyes polimorfizmusai szignifikáns összefüggést mutattak az antraciklinek által okozott kardiotoxicitással ALL-ben. Elsőként írták le, hogy az rs246221 T allél jelenléte esetén a betegek késői kardiotoxicitásra vonatkozó kockázata nagyobb.
2. 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.

3. Szignifikánsan több súlyos encefalopátia fordult elő az ALL intenzív kemoterápiás kezelés alatt az ABCB1 3435 TT genotípus esetén. Ezen kívül meghatároztak egy kis betegcsoportot (ABCB1 3435TT és ABCG2 421AA/CA genotípusúak), akik idegrendszeri mellékhatás szempontjából rendkívül veszélyeztetettek.
4. Elsőként igazolták, hogy az ARID5B gén egyes polimorfizmusai (rs4948502, rs4948496) összefüggést mutatnak a szérum MTX és 7-OH-MTX szintekkel gyermekkori ALL-ben.
5. Többféle statisztikai módszert, köztük Bayes-i elemzést használva, vizsgálták 12 gén 29 releváns polimorfizmusát OSC-ban. A nemzetközi irodalomban elsőként összefüggéseket találtak a MTX farmakokinetikai paraméterei, valamint a következő SNP-k között: ABCB1 rs928256, ABCC3 rs4793665, GGH rs3758149, SXR rs3814058.

A kérelmező művének és főbb közleményeinek részletes tanulmányozása, elemzése alapján megállapítom, hogy a mű hiteles adatokat tartalmaz. A következő kérdésekre várok választ a jelölttől:

1. A 10. oldalon szereplő megállapítás „Magyarországon a T-sejtes betegségek túlélése még szignifikánsan kissé rosszabb, mint a B-sejteseké”. Kérdésem, hogy melyek az utolsó évek, amelyre vonatkozólag megállapítását statisztikai adatokkal alá lehet támasztani.
2. Megállapítja (26. oldal), hogy a hosszabb (akár 24-48 órás infúziók a kardiotoxicitás jelentős csökkenésével járnak, míg a tumorelles hatása és a túlélés nem csökken). Kérdésem, hogy a napi klinikai gyakorlatban milyen hosszú az antracyclin infúziók ideje és ezt az ALL miatt kezelt gyermekek életkora befolyásolja-e.
3. A 30. oldalon szinte általánosságnak tűnhet az a megállapítás, hogy a szteroid kezelés gastrointestinális mellékhatásainak megelőzésére savcsökkentő gyógyszereket és nyálkahártya bevonók adása javasolt. Kérdésem, hogy a savcsökkentő szerek közül melyik az, amit a vélhetően számos infekción és antibiotikus kezeléssel átesett betegek esetében a legbiztonságosabbnak tart. Lát-e különbséget a H2 blokkolók és a proton-pumpa gátlók alkalmazásában pl. *Cl. difficile* fertőzés kialakulása ill. ennek kockázata tekintetében.
4. A human ABCG2 G polimorfizmusai közül a 421C>A polimorfizmusról Kurose et al., 2012. összefoglaló közleményét idézi, amennyiben ez a polimorfizmus egyes daganatos betegségek túlélésében és bizonyos betegségek kialakulására való hajlamában is szerepet játszik (köszvény, vesesejtes rák, diffúz nagy B-sejtes lymphoma). A fenti idézet alapját Hu LL és mtsai *Carcinogenesis* című lapban publikált munkája képezi (BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of DLBCL, 2007, 28: 1740-4). Ismert, hogy a CD-20 ellenes monoklonális antitest alkalmazása a DLBCL-ben szenvedő betegek életkilátását nagymértékben megnövelte és a DLBCL egyes, genetikailag különböző alcsoportjai közti különbséget prognózis szempontjából nagymértékben tompította. Ismer-e olyan adatot, ami a fenti ABCG-2 gén hatását, az ún. rituximab érában, tehát a modern kezelési lehetőségek birtokában újraz vizsgálta volna?
5. Megállapítja, hogy a 7-OH-MTX szint mérés fontos kiegészítője lehetne a klinikai gyakorlatnak, hiszen pl. a nephrotoxicitást valószínűleg pontosabban jelzi, mint a szérum MTX szint. Hogyan látja ezen módszer bevezetésének lehetőségét a mindennapi klinikai gyakorlatban?
6. A dexrazoxan alkalmazásával saját klinikai tapasztalata és publikációja van. Ezt követően az EMA visszavonta a szert a gyermekek kezeléséből. Ennek kapcsán kérdezem, hogy az általa vizsgált gyerekcsoport hosszú túlélői közt találtak-e késői daganatot.
7. Megállapítja (163. oldal), hogy Ferrari és mtsai 2014. összefüggést találtak a statinok mellékhatásai (creatin-kinase emelkedés, és bizonyos membrán transzporterek és az

SLCO1B1 genetikai variánsai közt). A jelölt és mtsai által is vizsgált 2 gén SNP-i pedig szerepet játszatnak CML-ben a TKI-ra (imatinib) adott terápiás válaszban (Au et al. 2014.). Az imatinib kezelésnek is lehetséges mellékhatása a creatin-kinase szint emelkedése (Gordon JK et al, Elevations of creatine kinase in patients treated with imatinib mesylate (Gleevec) *Leuk Res* 2010, 34:827-9). Kérdésem, hogy ismer-e olyan munkát, amely CML-es betegekben a membrán transzporterek és a creatin-kináz szint kóros növekedése közti lehetséges összefüggést vizsgálná?

8. Az ALLIC 2009 protokoll megvalósításában és vezetésében betöltött magyar szerep valamennyiünket büszkeséggel kell, hogy eltöltsön. Kérdésem, hogy interim munkamegbeszélés formájában körvonalazódott-e már a methotrexat kezelés optimális adagjára vonatkozó megfigyelés.

A munka részletes áttekintése és értékelése alapján a nyilvános vita kitűzését, és a mű elfogadását javaslom. Bizonyítottnak látom, hogy a mű a korábbi tudományos fokozat megszerzését követően jelentős tudományos eredményekkel gyarapította a tudomány-szakot. Kiemelem, a jelölt iskolateremtő képességét, a tudományos munkában pedig a laboratóriumi-kutatási, és a klinikai-kutatási eredmények igen kedvező ötvöződését. A számos felismert összefüggés és publikált eredmény ellenére a következtései mértéktartóak és ezáltal időtállóak is.



Dr. Demeter Judit
egyetemi tanár
az MTA doktora

Budapest, 2018. május 9.