

Glükokortikoid receptor gén polimorfizmusok szerepe a kortikoszteroid kezelés hatékonyságában és toxicitásában gyermekkori akut limfoid leukémiában

Doktori tézisek

Dr. Eipel Olivér

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Gábor, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Gellén Balázs, PhD, egyetemi docens
Dr. Fekete Andrea, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati Bizottság elnöke: Prof. Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár
Szigorlati Bizottság tagjai: Prof. Dr. Demeter Judit, PhD, egyetemi tanár
Prof. Dr. Masszi Tamás, PhD, egyetemi tanár

Budapest

2016

I. Bevezetés

Az akut limfoid leukémia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori malignitás. Az elmúlt évtizedekben bevezetett intenzív kemoterápiás protokolloknak köszönhetően a gyógyulási esélyek mára már 85% körül mozognak. A terápia tekintetében további célnak kell tekinteni az életminőség javítását is, melyben kiemelkedő szerepe van a kezelés alatti mellékhatások mérséklésének. Az egyik fontos fegyverünk e tekintetben a farmakogenetika.

Az ALL terápiája során a glükokortikoidok számítanak az egyik legfontosabb és legnagyobb antileukémiás hatással rendelkező szereknek. Ugyanakkor ezeknek a készítményeknek számos, a mindennapi gyakorlatban is gyakran tapasztalt toxikus hatása ismert. Ezek nem egyszer már önmagukban is külön kezelést igényelnek (inzulin, anxiolitikumok, hepatoprotektív szerek stb.). A szteroid mellékhatások kiküszöbölése tehát igen fontos feladat. A glükokortikoidok felelősek az ALL terápiája során a kezdeti nagyfokú blaszt redukcióért. A kemoterápia első hét napján egy intrathecalis methotrexate-on (MTX) kívül a betegek csak nagy dózisu szteroid terápiában részesülnek (prednisolon: 60mg/m²/nap). A nyolcadik napon a kezelés hatásosságát ellenőrizendő megvizsgáljuk a perifériás vérben a maradék limfoblasztok számát. Amennyiben ez az érték 1G/L alatt van, akkor kedvező prednisolon válaszról, ha ez 1G/L vagy a feletti, akkor rossz prednisolon válaszról beszélünk. A 8. napi prednisolon válasz döntő prognosztikus faktornak minősül a kemoterápia eredményessége és a túlélés szempontjából.

Az 5 éves eseménymentes túlélés (event-free survival-EFS), illetve teljes túlélés (overall survival-OS) fontos mutatói a terápia hatékonyságának.

Munkám során 3 olyan glükokortikoid receptor génben előforduló SNP-t vizsgáltam, melyek az irodalmi adatok alapján növelik: N363S, Bcl 1 vagy épp csökkentik: ER22/23EK a szteroidok iránti érzékenységet. Ezeket a polimorfizmusokat az irodalmi adatok alapján már számos kutatócsoport összefüggésbe hozta különféle glükokortikoid okozta mellékhatások kifejlődésének magasabb vagy alacsonyabb kockázatával. Ezek a megfigyelések az ALL terápiája során is relevánsak lehetnek, hiszen a betegek a kezelés bizonyos időszakában nagy dózisu szteroid adásban részesülnek. Kevés cikk vizsgálta csak azonban a fent említett SNP-k és az ALL kimenetelét befolyásoló prognosztikai faktorok, valamint az 5 éves EFS vagy OS közti kapcsolatot.

Számos kutatócsoport igazolta, hogy az N363S glükokortikoid receptor génpolimorfizmus megnövekedett glükokortikoid érzékenységet eredményez. Ez a polimorfizmus kedvezőtlenebb metabolikus profilt idéz elő, ami hiperinzulinémiában, rosszabb HDL/LDL arányban nyilvánulhat meg. Szintén a hordozók körében gyakoribb lehet a hipertenzió is. A polimorfizmust jelentő 363S genotípus esetén magasabb BMI értékeket mértek, az érintettek nagyobb mértékben voltak hajlamosak az elhízásra. A polimorfizmus esetén a koszorúér betegségek incidenciájának növekedését is megfigyelték. Igazolódott a polimorfizmus glaukómára hajlamosító szerepe is prednisolon tartalmú szemcseppel történő kezeléseknél.

Az irodalmi adatok alapján az előző polimorfizmussal ellentétben az ER22/23EK polimorfizmus csökkent glükokortikoid érzékenységet eredményez. A kutatások többsége azt igazolta, hogy ez a polimorfizmus jótékony hatással van a cukoranyagcserére és kedvező metabolikus profilt eredményez. Az érintettekben jobb HDL/LDL arányt, magasabb inzulin szenzitivitást, valamint alacsonyabb éhomi glükóz szintet figyeltek meg. Azonban ez a relatív glükokortikoid érzéketlenség nem kedvez az olyan betegségeknek, melyek kezelésében a glükokortikoidok alapvető szerepet töltenek be (sclerosis multiplex, egyes autoimmun betegségek).

A Bcl I polimorfizmus hasonlóan az N363S-hez szintén megnövekedett glükokortikoid érzékenységet eredményez. Ennek megfelelően a hordozók körében nagyobb mértékben figyeltek meg abdominalis elhízást, magasabb BMI értékeket, hipertrigliceridémiát, valamint inzulin érzéketlenséget.

II. Célkitűzések

1. Milyen kapcsolat áll fenn az N363S glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán fellépő glükokortikoid indukálta mellékhatások között?
2. Milyen összefüggés figyelhető meg az ER22/23EK glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán fellépő glükokortikoid okozta toxicitások között?
3. Megfigyelhető-e bármilyen korreláció a Bcl I glükokortikoid receptor génpolimorfizmus és az ALL kemoterápiája kapcsán megjelenő glükokortikoidok okozta toxicitások között?
4. Hogyan változnak a fenti eredmények abban az esetben, ha a génpolimorfizmusok egymással kombinálódnak?
5. Van-e összefüggés a fenti glükokortikoid receptor génpolimorfizmusok, illetve az ALL szempontjából egy döntő fontosságú prognosztikai faktor, a 8. napi prednisolon válasz között?
6. Van-e összefüggés a vizsgált glükokortikoid receptor génpolimorfizmusok, illetve az 5 éves eseménymentes túlélés (event-free survival-EFS) és az 5 éves teljes túlélés (overall survival-OS) között?

III. Módszerek:

III.1. A vizsgált betegek

A PhD munkám során összesen 346 ALL-es gyermek adatai kerültek elemzésre retrospektív módon. Ezek a betegek 1989 és 2004 között kaptak kezelést akut limfoid leukémia miatt. Kezelési protokolljuk az ALL BFM 90/95 alapján zajlott Magyarország onko-hematológiai központjaiban (Budapest, Debrecen, Miskolc, Pécs, Szeged, Szombathely). A gyermekek közül 207 fiú, 139 lány volt. A gyermekek életkora 0,2-17,9 év közé volt tehető, a medián életkor 4,95 év volt. A vizsgált betegek közt a rizikó besorolás alapján 103 kezelődött SR ágon, 215 MR ágon és 28 HR ágon. Mindegyik gyermek egységesen az ALL BFM 90/95-ös protokoll szerinti terápiában részesült és e szerint kapták egységesen a szteroid kezelést is. Ezen protokollok szerint a nagy dózisú glükokortikoid terápiát a protokoll I. fázis 1-ben (prednisolon: 60mg/m²/nap), valamint a protokoll II. fázis 1-ben (dexamethason: 10mg/m²/nap) kapták. A protokoll alapján prednisolon kezelés a végső dózis 25%-ával kezdődik, melyet a 8. napig a maximális dózissal emelünk. A 8. nap után a 28. napig ez marad a napi dózis, utána pedig elhagyásáig folyamatosan csökken 9 napon át. A dexamethason 1-21 napig kerül alkalmazásra maximális dózisban, majd a 22. naptól 9 napon át fokozatosan csökken, majd leáll.

A glükokortikoid toxicitásokat ezek alatt a fázisok alatt vizsgáltuk.

Technikai okok miatt csak 257 gyermeknél tudtuk elvégezni a polimorfizmussal kapcsolatos genetikai vizsgálatokat. Köztük 140 fiú és 117 lány volt.

III.2. Genetikai módszerek

III.2.1. A génpolimorfizmusok vizsgálata

III.2.2.1. DNS izolálás

A DNS izolálást a remisszióba került betegek perifériás véréből végeztük a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit segítségével, annak gyári előírása alapján.

III.2.2.2. Az N363S génpolimorfizmus vizsgálata

Az N363S polimorfizmust allél-specifikus PCR-ral azonosítottuk. A módszer lényege, hogy a PCR termék képződése attól függ, hogy a mintában a mutáns vagy a normál allél van-e jelen. Minden beteg esetében párhuzamosan 2 PCR csőben történt a vizsgálat. Az egyik PCR-csőbe a mutáns allél-szekvenciának megfelelő primer, míg ugyanazon beteghez tartozó másik PCR-csőbe pedig a normál allél-szekvenciának megfelelő primer került. A PCR folyamatot kontroll primerekkel ellenőriztük, melyek minden esetben képeztek terméket, ha maga a munkafolyamat megfelelő volt. Kontroll primerek: E2/4 forward primer: 5'-CCA GTA ATG TAA CAC TGC CCC-3', E2/4 reverz primer: 5'-TTC GAC CAG GGA AGT TCA GA-3'. Normál allélnak megfelelő reverz primer (363W): 5'-ATC CTT GGC ACC TAT TCC AAT-3', mutáns allélnak megfelelő reverz primer (363MR): 5-ATC CTT GGC ACC TAT TCC AAC-3'. A polimeráz enzimet, puffereket, magnézium-kloridot és dNTP-eket tartalmazó reakcióelegybe (ImmoMix, Bionline) bemértük a fenti kontroll primereket, illetve a mutáns vagy normál allélszekvenciának megfelelő reverz primert, végül hozzáadtuk a betegektől izolált DNS mintát. A PCR program első lépéseként: 95°C-on 7 percig előinkubáltunk, majd ezt követte az amplifikáció. A PCR kondíciók a következők voltak: 1 perc 95°C denaturáció, 1 perc 63°C anellálás, végül 1 perc 72°C elongáció. 34 ciklus után utóinkubálást végeztünk 72°C-on 10 percig. A kiértékelés gélelektroforézissel történt. A polimorfizmusra jellemző termék csak abban a csőben keletkezett, ahol a DNS mintában vagy a normál, vagy a mutáns primernek komplementer szekvenciája jelen volt.

III.2.2.3. A Bcl I génpolimorfizmus vizsgálata

A Bcl I polimorfizmus detektálása szintén allél-specifikus PCR-ral történt. Ebben az esetben a normál és a mutáns allél szekvenciát tartalmazó primert is ugyanabba a PCR csőbe tettük, és a polimorfizmust a keletkező termékek száma és mérete alapján azonosítottuk gélelektroforézissel. Forward primer: 5'-AGA GCC CTA TTC TTC AAA CTG, reverz primer: 5'-GAG AAA TTC ACC CCT ACC AAC, normál reverz primer: 5'-CAA TTC CTC TCT TAA AGA GAT TG, mutáns forward primer: 5'-GAC AAG TTA TGT CTG CTG ATG. A reakcióelegybe (ImmiMix, Bionline) bemértük a primereket, majd a betegektől izolált DNS mintát. PCR: előinkubálás 95°C-on 7 percig, majd 34 ciklusban (1 perc 95°C, 1 perc 56°C, 1,5perc 72°C) amplifikáció. A 34 ciklus után utóinkubálást végeztünk 72°C-on 10 percig. A kiértékelés gélelektroforézissel történt.

III.2.2.4. Az ER22/23EK génpolimorfizmus vizsgálata

A detektálás PCR reakciót követő olvadáspont analízis segítségével történt hibridizációs próba segítségével. A módszer lényege, hogy egy, a normál szekvenciának megfelelő bázissorrendű próbapárt hibridizálunk a PCR termékhez. A polimorfizmus helyét átfedő mutációs (M) próba 5' vége gerjeszhető festékanyaggal jelölt, míg a másik anchor (A) próba 3' végén fluorescein jelölésű. A két próba a termékre hibridizálódva olyan közel kerül egymáshoz, hogy a fluorescein gerjeszti az A próbához kötött festéket, amely fluoreszcens jelet bocsát ki. A polimorfizmus jelenléte esetén a hibridizáció a két érintett két nucleotidnál nem következik be. Amikor folyamatos melegítés hatására az M próba leválik, a két próba távol kerül egymástól, és a fluoreszcencia kibocsátás hirtelen megszűnik. Ezt a berendezés (Light cycler 2.0) detektálja. Az a hőmérséklet, amelyiken ez bekövetkezik, az olvadáspont. A polimorfizmus jelenléte az olvadáspontot csökkenti a normál szekvenciához képest. PCR-hoz használt primerek: E2F (forward) primer: 5'-GAT TCG GAG TTA ACT AAA AG, E2R (reverz) primer: 5'- TAC TGA GCC TTT TGG AAA AT. M-próba: LC Red 640-ACATCTCCCCTCTCCTGAGCAA-foszfát, Anchor próba: GTAGCTCCTCCTCTTAGGGTTTATAGAAGTCCA-fluorescein. A reakció LightCycler DNA Master HybProbe segítségével történt a megadott protokoll alapján. Az értékelés az olvadáspont értékek alapján történt.

III.3. Az elemzett glükokortikoid okozta toxicitások:

Ezen toxicitásokat a nagy dózisú szteroidok alkalmazásának időszakában figyeltük (Protokoll I. fázis 1: prednisolon: 60mg/m²/nap, Protokoll II. fázis 1: dexamethason 10mg/m²/nap). A vizsgált toxicitások a következők voltak:

Hepatotoxicitás: Súlyos hepatotoxicitásról beszéltünk akkor, amikor a szérum GGT és/vagy GPT értékek magasabbak voltak, mint a normál felső határának a tízszerese, és/vagy amikor a szérum bilirubin (Sebi) szint a normális tartomány felső értékének 5-szörösénél volt emelkedettebb (CTCAE-2010).

Szénhidrát anyagcsere zavarként értékeltük azt, amikor a szteroid terápia alatt a beteg inzulinkezelést igényelt, legalább 2 napon át glükózúriája volt, vagy amikor az éhomi vércukorszintje 6,5mmol/L felett volt.

Idegrendszeri toxicitásról/magatartászavarról beszéltünk, amikor a fenti fázisokban polineuropátia, parézis, tikkék, epilepsziás görcsök léptek fel. Magatartászavarnak tekintettük

a szorongás, a pszichózis megjelenését, melyek anxiolitikumok és/vagy antipszichotikumok adását kívánták (CTCAE-2010).

Hipertónia: amikor a vérnyomásértékek az életkornak megfelelő 95 percentilis felett voltak, illetve, ahol ABPM eredmény rendelkezésre állt, ott a leletben megállapított eredményt vettük alapul.

III.3. A 8. napi prednisolon válasz, 5 éves EFS és OS

A kemoterápia nyolcadik napján perifériás vérből került elemzésre a 8. napi prednisolon válasz. Definíciószerűen akkor beszélünk jó prednisolon válaszról a terápia nyolcadik napján, amikor a perifériás vérben a limfoblasztok száma 1G/L alatt van. 1G/L vagy e feletti érték esetén rossz prednisolon válaszról van szó.

Az eseménymentes túlélést (EFS) a diagnózistól számítva az 5. évig vizsgáltuk, azaz 5-éves EFS-t néztünk. Akkor beszélünk eseménymentességről, ha relapszus, vagy halál nem következett be ezen időszak alatt. Az 5 éves teljes túlélés esetén (overall survival- OS) ugyanezen időszak alatt vizsgáltuk, hogy halál bekövetkezett-e vagy sem.

III.4. Statisztika

Az allélfrekvenciák tekintetében kritériumnak vettük azt, hogy a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyban legyen. Az allélfrekvenciákat chi-négyzet teszttel vagy Fisher-exact teszttel hasonlítottuk össze az elemszámnak megfelelően. A szignifikancia szintet 5%-nál ($p=0,05$) húztuk meg. A statisztikai analízishez az SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) software-t használtuk. Az esélyhányados (Odds ratio=OR) konfidencia intervalluma (CI) 95% volt. 5 éves EFS és OS eredmények értékeléséhez a túlélés analízis (Survival Analysis) egyik nem paraméteres formáját a Kaplan-Meier elemzést, illetve a Cox-regressziót alkalmaztuk.

IV. Eredmények

IV.1. N363S glükokortikoid receptor polimorfizmus

A 346 vizsgált ALL-es gyermekből 32 hordozta heterozigóta formában a polimorfizmust (9,24%). Homozigóta előfordulást nem találtunk. Az allélfrekvenciát megvizsgálva a populációnk Hardy-Weinberg eloszlást követett ($p=0,36>0,05$).

IV.1.1. Glükokortikoidok okozta toxicitások

Hepatotoxicitás szignifikánsan gyakrabban fordult elő a hordozók körében, mint a nem hordozók esetében ($p=0,004$).

A szénhidrát anyagcserére vonatkozó adatok hasonló eredményt mutattak, mint a hepatotoxicitás esetében. Ez a toxicitás szintén szignifikánsan gyakrabban fordult elő hordozók körében, mint nem hordozók körében ($p=0,001$).

Idegrendszeri károsodás és magatartásbeli zavarok esetében nem mutatkozott statisztikailag jelentős összefüggés a vizsgált mellékhatás és az SNP között. A hordozók között ez a mellékhatás a nem hordozókhöz képest nem fordult elő gyakrabban ($p=1,0$).

Bár a magasvérnyomás gyakrabban fordult elő a hordozók körében, mint a nem hordozók esetében, ez az arány statisztikai számítással azonban mégsem igazolódott szignifikánsnak ($p=0,171$).

A toxicitások kombinálódása esetén is azt figyeltük meg, hogy a 363S genotípus hajlamosít a glükokortikoidok okozta mellékhatások megjelenésére.

Legalább egy glükokortikoid toxicitás szignifikánsabban gyakrabban fordult elő a hordozók körében, mint a nem hordozóknál ($p=0,001$). Legalább két szteroid mellékhatás szintén szignifikánsan gyakrabban fordult elő a hordozókban, mint a nem hordozókban ($p=0,009$). Legalább három toxicitás szintén a hordozókban volt gyakoribb ($p=0,02$). Négy toxicitás egyszerre egy vizsgált gyermekben sem alakult ki.

IV.1.2. 8. napi prednisolon válasz

A prednisolon választ vizsgálva azt találtuk, hogy egy hordozónál sem jelentkezett rossz prednisolon válasz (0/32), míg ez az arány a nem hordozók körében 8,28% volt (26/314).

IV.1.3. 5 éves EFS és OS

Eredményeink azt mutatják, hogy a 363S genotípussal rendelkezők körében az 5 éves eseménymentes túlélés szignifikánsan jobb volt, mint a nem hordozók esetében ($p=0,012$).

Az 5 éves OS szintén szignifikánsan kedvezőbb volt a hordozók körében ($p=0,013$).

IV.2. Az ER22/23EK glükokortikoid receptor polimorfizmus

A 346 vizsgált ALL-es gyermekből 10 hordozta heterozigóta formában a polimorfizmust (3,46%). Homozigóta előfordulást ezen polimorfizmus esetén sem találtunk. Az allélfrekvencia Hardy-Weinberg eloszlást követett ($p=0,7>0,05$).

IV.2.1. Glükokortikoidok okozta toxicitások

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem jelentkezett szignifikáns különbség a hepatotoxicitás tekintetében a hordozók és a nem hordozók között ($p=0,6185$).

A hordozók körében szénhidrát anyagcserezavar egyáltalán nem fordult elő, noha a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,510$).

Magasvérnyomás az ER22/23EK SNP-t hordozók körében nem alakult ki, de a különbség itt sem mutatkozott szignifikánsnak ($p=0,25$).

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem találtunk olyan ALL-es gyermeket, akinél idegrendszeri károsodás/magatartásbeli változás történt volna, ugyanakkor a nem hordozóknál ez az arány 8,6% volt. A különbség nem volt statisztikailag jelentős ($p=0,695$).

Legalább egy toxicitás vizsgálatokor nem találtunk statisztikailag jelentős összefüggést a hordozók és a nem hordozók között ($p=0,065$). Kettő ($p=0,716$) vagy három toxicitás ($p=0,645$) egy hordozóban sem fordult elő.

IV.2.2. 8. napi prednisolon válasz

A 8. napi prednisolon válasz esetén azt láttuk, hogy egy hordozó sem volt rossz prednisolon válaszadó (0/10), ugyanakkor a nem hordozók körében 7,74%-os volt a rossz prednisolon válasz aránya (26/336).

IV.2.3. 5 éves EFS és OS

Az ER22/23EK polimorfizmus esetén nem volt különbség a hordozók és a nem hordozók között az EFS tekintetében. A két csoportban nem különbözött szignifikánsan az 5 éves EFS ($p=0,18$).

Az 5 éves OS tekintetében sem mutatkozott statisztikailag jelentős különbség a hordozók és a nem hordozók között ($p=0,27$).

IV.3. A Bcl I glükokortikoid receptor polimorfizmus

Ezen polimorfizmus esetén az előzőekkel ellentétben nagy számban találtunk a polimorfizmusra nézve homozigóta (GG) betegeket. Éppen ezért a fenti toxicitásokat, a 8. napi prednisolon választ, illetve az 5 éves EFS-t és OS-t mindig 3 csoport viszonyában vizsgáltuk. Egyszer vizsgáltuk előfordulásukat a G-allél függvényében (CC vs. GC+GG), majd a homozigótákkal szemben (GG vs. GC+CC), illetve megnéztük alakulásukat akkor is, mikor a Bcl I polimorfizmus az N363S polimorfizmussal kombinálódott (Bcl I-N363S vs nincs kombináció).

Az allélfrekvencia a Hardy-Weinberg eloszlást követett ($p=0,33>0,05$). A homozigóta vad típusúak (CC) aránya 47,47%, a heterozigótáké (CG) 40,86%, a homozigóta mutáns típusúaké pedig (GG) 11,67% volt.

IV.3.1. Glükokortikoidok okozta toxicitások

A glükokortikoid toxicitások és a Bcl I polimorfizmus viszonyában az eredmények azt mutatják, hogy nincs szignifikáns összefüggés sem a hepatotoxicitással, sem a szénhidrát anyagcserezavarral, sem a magasvérnyomással sem pedig a központi idegrendszeri károsodással/magatartás zavarral a három vizsgált csoporton belül (CC vs. GC+GG, GG vs. CC+GC, Bcl I-N363S vs. nincs kombináció) (1. táblázat). P-értékek a táblázatban láthatóak.

Hepatotoxicitás				Idegrendszeri/ magatartásbeli zavar			
Genotípus	Volt	Nem volt	P-érték	Genotípus	Volt	Nem volt	P-érték
G/G+G/C	27	108	P=0,455	G/G+G/C	18	117	P=0,785
CC	20	102		CC	15	108	
G/G	10	20	P=0,23	G/G	6	24	P=0,209
C/C+G/C	37	190		C/C+G/C	27	201	
N363S-BCL1	2	7	P=0,671	N363S-BCL1	1	8	P=1,00
Nincs N363S-BCL1	45	203		Nincs N363S-BCL1	32	217	
Szénhidrát anyagcserezavar				Magasvérnyomás			
Genotípus	Volt	Nem volt	P-érték	Genotípus	Volt	Nem volt	P-érték
G/G+G/C	7	128	P=0,332	G/G+G/C	33	102	P=0,167
CC	10	112		CC	39	82	
G/G	1	29	P=0,7	G/G	7	23	P=0,534
C/C+G/C	16	211		C/C+G/C	65	161	
N363S-BCL1	2	7	P=0,113	N363S-BCL1	3	6	P=0,714
Nincs N363S-BCL1	15	233		Nincs N363S-BCL1	69	178	

1. táblázat: A Bcl I polimorfizmus és a Bcl I-N363S polimorfizmusok kombinációjának összefüggése a glükokortikoidok okozta toxicitásokkal

Eredményeink a toxicitások halmozódását illetően azt mutatták, hogy a GG homoizigóták körében ugyan nem fordult elő három toxicitás egyszerre ugyanazon betegnél, de ez a különbség nem volt szignifikáns. A többi csoport esetén (CC vs. GC+GG, GG vs. CC+GC, Bcl I-N363S vs. nincs kombináció) sem találtunk összefüggést a Bcl I polimorfizmus és a toxicitások kombinálódása között (2. táblázat). P-értékek a táblázatban láthatóak.

Glükokortikoid okozta toxicitások halmozódása – BCL1						
	Legalább 1 toxicitás	Egy toxicitás sem	Legalább 2 toxicitás	Nincs két toxicitás	Legalább 3 toxicitás	Nincs 3 toxicitás
G/G+G/C	64	71	16	119	130	5
CC	69	54	11	112	119	4
G/G	18	12	6	24	0	30
C/C+G/C	115	113	21	207	9	219
N363S + BCL1	4	5	2	7	2	7
NINCS N363S-BCL1	129	120	25	224	7	242

Glükokortikoid okozta toxicitások halmozódása – BCL1- P-értékek			
	Legalább 1 toxicitás	Legalább 2 toxicitás	Legalább 3 toxicitás
G/G+G/C	P=0,163	P=0,543	P=1,000
CC			
G/G	P=0,325	P=0,104	P=0,563
C/C+G/C			
N363S + BCL1	P=0,743	P=0,24	P=0,34
NO N363S-BCL1			

2. ábra: A Bcl I polimorfizmus és a Bcl I-N363S polimorfizmusok kombinációjának összefüggése a glükokortikoidok okozta toxicitások halmozódásával

IV.3.2. 8. napi prednisolon válasz

A GG genotípusúak körében nem találtunk olyan ALL-es beteget, akinek rossz prednisolon válasza lett volna ($p=0,198$). A Bcl I-N363S kombináció esetén szintén jó prednisolon válasza volt mindenkinek ($p=0,500$). A fenti esetek egyikében sem volt azonban az eredmény szignifikáns. A CC vs CG+GG csoport esetén sem találtunk szignifikáns összefüggést ($p=0,559$).

IV.3.3. 5 éves EFS és OS

Az 5 éves EFS esetén nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a CC vs. GC+GG ($p=0,535$), sem a GG vs. CC+CG ($p=0,445$) csoportban, sem pedig a Bcl I-N363S kombináció ($p=0,3$) esetén.

Az 5 éves OS esetén hasonló eredményre jutottunk, ugyanis itt sem mutatkozott statisztikailag jelentős differencia az egyes csoportokban (CC vs. CG+GG $p=0,816$; GG vs. CC+GC $p=0,849$; Bcl I-N363S $p=0,681$).

A 363S genotípusú betegek bár sok toxicitásra számíhattak, mégis náluk az 5 éves EFS és 5 éves OS szignifikánsan jobb volt. Az irodalmi adatok alapján relatív szteroid rezisztenciát okozó ER22/23EK polimorfizmus esetében nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a szteroid okozta toxicitásokkal sem az 5 éves EFS-sel, sem az OS-sel. Ugyanakkor a toxicitások tekintetében tendencia valóban megfigyelhető volt a protektivitás irányába. Sem az ER22/23EK, sem az N363S polimorfizmus esetében nem talákoztunk rossz prednisolon válasszal. A Bcl I homozigóta hordozók (GG) körében szintén nem akadt rossz prednisolon válaszadó, mely a receptor polimorfizmus következtében megnövekedett szteroid érzékenységet igazolhatja. A két receptor érzékenységet növelő polimorfizmus kombinációja esetén (Bcl 1-N363S) szintűgy nem találtunk rossz prednisolon válaszadót. Az eredmények alapján más glükokortikoid receptor polimorfizmusok vizsgálatai után egyéni glükokortikoid adagolás lehetősége is felmerülhet a jövőben, illetve a polimorfizmusok alapján a szteroid mellékhatások tekintetében magasabb rizikójú betegek esetén szorosabb monitorozás is szükségessé válhat. Természetesen a betegszámot a jövőben bővíteni kell, hogy az alacsonyabb gyakoriságot mutató polimorfizmusok, illetve polimorfizmus kombinációk relevánsabb eredményt adjanak. Szintén a jövő feladata lehet további, az irodalmi adatok alapján jelentősebb glükokortikoid hatást befolyásoló polimorfizmusok vizsgálata, mint például a thtIII vagy az N766N.

V. Következtetések

1. PhD munkám során az N363S polimorfizmus kapcsán a hepatotoxicitás, a szénhidrát anyagcserezavar tekintetében az ALL-es nagy dózisú szteroid terápiában részesülő gyermekek körében azt találtuk, hogy ez az SNP növeli a glükokortikoidok iránti érzékenységet. Szintén növekedett érzékenységet bizonyított az is, hogy a prednisolon válasz „cserébe a sok toxicitásért” minden hordozó esetén kedvező volt, illetve, hogy a 363S genotípus esetén statisztikailag nagyobb arányban mutatkozott kedvezőbb 5 éves EFS és 5 éves OS is.
2. Az ER22/23EK polimorfizmus esetében - az N363S polimorfizmussal ellentétben - nem különböztek szignifikánsan a hordozók és a nem hordozók között sem a toxicitások, sem az 5-éves EFS sem pedig az 5 éves OS. Ezen SNP esetén nem találtunk rossz prednisolon válaszdót a hordozók körében.
3. A Bcl 1 polimorfizmus esetén a polimorfizmusra homozigóta egyéneknél (G/G) nem fordult elő rossz prednisolon válasz, ami a megnövekedett glükokortikoid érzékenység mellett szól. Ugyanakkor ezen genotípus esetén nem fordult elő 3 toxicitás fellépése együttesen sem az ALL-es gyermekek körében. A Bcl 1-N363S hordozók között szintén nem volt rossz prednisolon válasz.
4. Az 5 éves EFS-t és OS-t 6 cikk vizsgálta eddig az irodalomban. Egy talált közülük negatív korrelációt a Bcl 1 GG genotípusa esetén a teljes túléléssel. Mi a receptor érzékenységet növelő N363S polimorfizmus kapcsán pozitív korrelációt találtunk az 5 éves EFS és OS tekintetében.

Jelen kutatási eredmények a jövőbeliekkel kiegészítve felvethetik egy, a glükokortikoid terápiára magasabb rizikójú betegcsoport jelenlétét, akiknél szorosabb monitorozás, vagy akár egyénileg meghatározott glükokortikoid gyógyszeradagolás jöhet majd szóba.

Amennyiben a mi vizsgálati eredményeinket a jövőben több polimorfizmus és azok kombinációinak vizsgálataival kiegészítjük, valamint, ha a betegszámot tovább növeljük, akkor talán lehetőség nyílik majd az ALL szempontjából fontos prognosztikai faktorok és túlélési mutatók még pontosabb jóslására.

VI. Saját publikációk jegyzéke

Saját témában megjelent közlemények:

Eipel OT , Nemeth K , Torok D , Csordas K , Hegyi M , Ponyi A , Ferenczy A , Erdelyi DJ , Csoka M , Kovacs GT. (2013) The glucocorticoid receptor gene polymorphism N363S predisposes to more severe toxic side effects during pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. International Journal of Hematology, 97:216-222. IF: 1.679

Eipel OT, Hegyi M, Csordas K, Németh K, Luczay A, Török D, Csóka M, Erdélyi D, Kovács GT (2016): Some GCR Polymorphisms (N363S, ER22/23EK, and Bcl-1) May Influence Steroid-induced Toxicities and Survival Rates in Children With ALL. Journal of Pediatric Hematology and Oncology. [Epub ahead of print] IF: 0.956

Egyéb témában megjelent közlemények

Csordas K , Lautner-Csorba O , Semsei AF , Harnos A , Hegyi M , Erdelyi DJ , Eipel OT , Szalai C , Kovacs GT. (2014) Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Hematology, 166:410-420. (2014) IF:4,959

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. Anti-Cancer Drugs, 24:189-197. IF: 1.891

Hegy M , Gulácsi A , Cságoly E , Csordás K , Eipel OT , Erdélyi DJ , Müller J , Nemes K , Lautner-Csorba O , Kovács GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 138:1697-1702. IF=2.914

Csordas K , Eipel O, Hegyi M , Csoka M , Pap E , Kovacs G. (2011) Nagy dózisú methotrexatkezelések farmakokinetikai vizsgálata gyermekkori hematológiai malignitásokban. Orvosi Hetilap, 152:1609-1617.