

**Genetikai polimorfizmusok elemzése és klinikai paraméterek
prognosztikus jelentőségének vizsgálata myelodysplasiás szindrómában
és myeloma multiplexben**

Doktori értekezés

Dr. Kádár Katalin Eszter

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Várkonyi Judit, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Rejtő László, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Törő Klára, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Molnár Zsuzsanna, Ph.D., főorvos
Dr. Molnár Miklós, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Müllner Nándor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	8
2.1. Myelodysplasiás syndroma (MDS).....	9
2.1.1. Klinikum.....	9
2.1.2. Biológia és patogenezis	12
2.1.3. Kezelés.....	13
2.2. Myeloma multiplex (MM).....	14
2.2.1. Diagnózis, klinikum.....	14
2.2.2. Előfordulási gyakoriság	16
2.2.3. Etiológia.....	16
2.2.4. Biológia és patogenezis	16
2.2.4.1. A myelomás sejtklón jellemzői	17
2.2.4.2. A csontvelői mikro környezet szerepe.....	18
2.2.5. Prognosztikai faktorok.....	19
2.2.6. Kezelés.....	24
2.2.7. Myeloma és genetika kapcsolata	26
2.3. A multifaktoriális betegségek genetikai hátterének vizsgálati módszerei....	26
2.3.1. Egy pontú nukleotid polimorfizmus (SNP).....	27
2.3.2. Genetikai variációk kimutatása	28
2.4. TNF-α.....	29
2.4.1. A TNF szupercsalád	29
2.4.2. TNF- α által kiváltott jelutak.....	29
2.4.3. A TNF- α gén	31
2.4.4. A genetikai polimorfizmus és a TNF- α szint összefüggése	32
2.4.5. TNF- α szerepe MDS-ben	33
2.4.6. TNF- α szerepe MM-ben.....	33
3. CÉLKITŰZÉSEK	35
3.1. Myelodysplasiában végzett vizsgálatok	35

3.2. Myeloma multiplexben végzett vizsgálatok.....	35
4. MÓDSZEREK	38
4.1. Myelodysplasiában végzett vizsgálatok	38
4.1.1. <i>TNF-α -238G>A (rs361525) és -308G>A (rs1800629) pozíciójú polimorfizmusok meghatározása MDS-ben és kontroll csoportban.....</i>	38
4.1.1.1. Betegek és kontroll csoport	38
4.1.1.2. Mintavétel és DNS izolálás	39
4.1.1.3. Genotípus meghatározás.....	41
4.1.1.4. Statisztikai analízis	42
4.2. Myeloma multiplexben végzett vizsgálatok.....	42
4.2.1. <i>TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G, (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok meghatározása MM betegek és kontroll személyek esetében</i>	42
4.2.1.1. Betegek és kontroll csoport	43
4.2.1.2. Mintavétel és DNS izolálás	44
4.2.1.3. Genotípus meghatározások.....	44
4.2.1.4. Statisztikai analízis	47
4.2.2. <i>7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM-ben és kontroll populációban.....</i>	48
4.2.2.1. Betegek és kontroll csoportok	48
4.2.2.2. DNS mintavétel és genotípus meghatározás	49
4.2.2.3. Statisztikai analízis	50
4.2.3. <i>Albumin / M-komponens (A/M) arány és AMWBC pontrendszer prognosztikai szerepe myeloma multiplexben</i>	50
4.2.3.1. Betegek.....	50
4.2.3.2. A/M prognosztikus index és AMWBC pontrendszer meghatározása ...	51
4.2.3.3. Statisztikai analízis	52
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. Myelodysplasiás synrdoma	53
5.1.1. <i>TNF -238G>A (rs361525) és TNF -308G>A (rs1800629) genotípusok eloszlása MDS-ben és egészséges populációban.....</i>	53
5.2. Myeloma multiplex	54

5.2.1. <i>TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok és haplotípusaik MM betegekben és kontroll személyekben.....</i>	54
5.2.2. <i>7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM betegek és kontroll populáció esetében.</i>	57
5.2.3. <i>Albumin / M-komponens (A/M) arány és az AMWBC pontrendszer összefüggése a túléléssel MM betegek esetében</i>	59
6. MEGBESZÉLÉS	62
6.1. Myelodysplasiás syndroma	62
6.1.1. <i>TNF -238G>A (rs361525) és TNF -308G>A (rs1800629) genotípusok eloszlása MDS-ben és egészséges kontroll csoportban</i>	62
6.2. Myeloma multiplex	64
6.2.1. <i>TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok és haplotípusaik MM betegekben és kontroll személyekben.....</i>	64
6.2.2. <i>7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM betegek és kontroll populáció esetében.</i>	66
6.2.3. <i>Albumin / M-komponens (A/M) arány és az AMWBC pontrendszer összefüggése a túléléssel MM betegek esetében</i>	68
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	70
8. ÖSSZEFOGLALÁS	73
9. SUMMARY	74
10. IRODALOMJEGYZÉK	75
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	95
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AML	akut myeloid leukaemia
AH	ősi haplotípus (ancestral haplotype)
ASCT	autológ őssejt-transzplantáció (autologous stem cell transplantation)
β2M	béta-2 mikroglobulin
CI	konfidencia intervallum, megbízhatósági tartomány
CRAB	C = hypercalcaemia, R = veseelégtelenség, A = anaemia, B = csontléziók (hypercalcemia, renal failure, anemia, bone lesions)
del	deléció
DNS	dezoxiribonukleinsav
DS	Durie-Salmon klinikai stádiumbeosztás
EPO	erythropoietin
FAB	French-American-British
Fas	FS 7 asszociált sejtfelszíni antigén
FasL	Fas ligand
FGFR3	fibroblaszt növekedési faktor receptor-3 (fibroblast growth factor receptor-3)
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FLC	szabad könnyűlánc
GEP	génexpressziós profil
GWAS	teljes genom asszociációs vizsgálat (genome wide association study)
HGF	májsejt növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HLA	humán leukocyta antigén
HSP	hősokkfehérje (heat shock protein)
HSP70	70 kD-os hősokkfehérje
IFN	interferon
IGF	inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IGH	immunglobulin nehézlánc (immunoglobulin heavy chain)
IL	interleukin
IL-1β	interleukin-1-béta

IMWG	Nemzetközi Myeloma Munkacsoport (International Myeloma Working Group)
ISS	nemzetközi stádium-besorolási rendszer (International Staging System)
JAK	Janus tirozin kináz
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LD	kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság (linkage disequilibrium)
LDH	laktát dehidrogenáz
LTA	limfotoxin-alfa
MAF	musculoaponeuroticus fibrosarcoma
MAPK	mitogén-aktivált proteinkináz
MDS	myelodysplasiás syndroma
MDE	myelomát meghatározó esemény (myeloma-defining event)
MGUS	nem meghatározott jelentőségű monoklonális gammopathia (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MIP1- α	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MM	myeloma multiplex
MMSET	multiple myeloma SET domain
mTOR	rapamicin célpont emlősökben (mammalian Target Of Rapamycin, egy szerin/threonin kináz)
MYC	myelocytomatosis
NF κ B	nukleáris faktor kappa B, κ B jelzésű általános magi transzkripciós faktor
NK sejt	természetes ölősejt (natural killer) sejt
OEP	Országos Egészségbiztosítási Pénztár
OR	esélyhányados (odds ratio)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PI	proteaszóma inhibitor
PI3K	foszfatidil-inozitol-3 kináz
RA	refrakter anaemia
RAEB	refrakter anaemia magas blastaránnal (refractory anemia with excess blasts)
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts

RARS	refrakter anaemia gyűrűs sideroblastokkal (refractory anemia with ring sideroblasts)
RAS	rat sarcoma
RCMD	refrakter cytopenia több sejtsort érintő dysplasiával (refractory cytopenia with multilineage dysplasia)
RFLP	restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism)
SMM	parázsló myeloma multiplex (smoldering myeloma multiplex)
SNP	egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
STAT	jelátvivő és transzkripció aktivátor (signal transducer and activator of transcription)
TAM	tumor-asszociált makrofág
TGF- β	transzformáló növekedési faktor-béta (transforming growth factor beta)
TNF- α	tumornekrózis faktor-alfa
VEGF	ér-endothel növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
WBC	fehérvérsejt
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
Wnt	wingless and a related gene termed int 1

2. BEVEZETÉS

Az ember genetikai állományának, a DNS bázissorrendjének a megismerése lehetővé tette, hogy molekuláris szinten értelmezhesük az egyes biológiai folyamatokat, az emberi populáció tagjainak egyediségét, a populáción belüli variabilitást, az egyes betegségekre való hajlamot. A daganatos betegségről évtizedek óta tudjuk, hogy vannak bizonyos örökletes hajlamosító tényezők, ugyanakkor a betegség kialakulása az egyén élete során felhalmozódó szomatikus mutációk és epigenetikai változások eredménye. A myeloma multiplex (MM) a plazmasejtek klonális daganatos megbetegedése, a második leggyakoribb hematológiai malignitás. A myelodysplasiás syndroma (MDS) szintén gyakori rosszindulatú vérképzőszervi kórkép. Mindkét betegség előfordulása az életkor előrehaladtával nő, nagyjából azonos korcsoportot érint, a fejlett nyugati országokban előfordulási arányuk emelkedést mutat, amelyet a lakosság élettartamának növekedése is magyaráz. További közös jellemzőjük a kifejezett heterogenitás a prognózis, a kórlefolyás, és a különböző kezelési formákra adott válasz tekintetében, ezáltal döntő jelentőségű a megfelelő prognosztikai tényezők meghatározása a rizikóadaptált kezelési stratégia kialakítása céljából. A betegségek patomechanizmusának pontosabb megismerése újabb lehetséges terápiás célpontokra irányíthatja figyelmünket és segíthet a megfelelő prognosztikai faktorok megtalálásában. Munkánk során a fenti két betegségcsoport genetikai hátterét vizsgáltuk. Elemeztük a patomechanizmus alapján feltételezhetően szerepet játszó egyes citokinek polimorfizmusát, majd egy nemzetközi génasszociációs vizsgálatban való részvétellel olyan genetikai markereket kerestünk, amelyek bizonyítékul szolgálhatnak a myeloma multiplexre való genetikai hajlam demonstrálására. Ezt követően a myeloma multiplexben használt egyes prognosztikai faktorok segítségével alkotott, témavezetőm által korábban már publikált pontrendszer alkalmazhatóságát vizsgáltuk, adaptálva az új típusú, bortezomib és immunmoduláns kezelésben részesült betegek esetére.

2.1. Myelodysplasiás syndroma (MDS)

2.1.1. Klinikum

Az MDS heterogén betegségcsoport, amelyet ineffektív hemopoézis, következményesen kialakuló egy, vagy több sejtvonalat érintő cytopenia és AML-be történő transzformáció jelentős kockázata jellemez. A háttérben a hemopoetikus őssejtek szerzett klonális betegsége áll [1]. Főként időskorúakat érint, a betegek 80%-a 60 évesnél idősebb, a diagnóziskor a medián életkor 71 év, férfiakban gyakrabban fordul elő [2]. A primer, de novo MDS oka nem ismert, a szekunder esetek (az összes eset 10-15%-a) korábbi citosztatikus kezelés, - elsősorban topoizomeráz II gátlók és alkiláló szerek - sugárkezelés, immunszuppresszív terápia, valamint egyes környezeti ártalmak következtében alakulnak ki [3, 4]. A diagnózis alapját a perifériás vérben észlelt cytopenia, a perifériás vérben és csontvelőben látható dysplasiás jelek és blastsejtek száma, valamint a klonális citogenetikai eltérések jelentik. A de novo MDS betegk 40-60 %-ában mutatható ki citogenetikai eltérés, amely leggyakrabban az 5, 7, 8, 12, 20 és Y kromoszómákat érinti [5, 6]. A betegek egy részénél komplex (3 vagy több) eltérés figyelhető meg. A citogenetikai eltéréseknek fontos szerepe van a prognózis és a várható terápiás válasz megítélése szempontjából [7]. Az MDS osztályozására korábban az 1982-ben készült FAB (French American British) klasszifikációt használták, amely elsősorban a sejtek morfológiáját vette alapul és ennek alapján 5 alcsoportot különböztetett meg [8] (1. táblázat).

1. táblázat. Az MDS 1982-es FAB klasszifikációja [8]

Entitás	Perifériás vér blast sejtek	Csontvelő blast sejtek	Egyéb jellemzők	Átlagos túlélés (hónap)
RA	< 1%	< 5%	RS < 15 %-a a csontvelői sejteknek	32
RARS	< 1%	< 5%	RS >15%-a a csontvelői sejteknek	42
RAEB	< 5%	5%-20%		12
RAEB-t	5%-30%	20%-30%		5
CMML	< 5%	< 20 %	AMC> 1 G/l	10

RA: refrakter anaemia; RARS: refrakter anaemia gyűrűs sideroblastokkal; RAEB: refrakter anaemia magas blastarányal; RAEB-t: refrakter anaemia magas blastarányal, transzfomációval; CMML: krónikus myelomonocytar leukaemia; RS: gyűrűs sideroblast; AMC: abszolút monocyta szám

Ez a besorolás azonban a prognózis, a leukémiás átalakulás esélyének megítélése és bizonyos kezelési szempontok miatt a későbbiekben újragondolást igényelt. A 2001-es WHO klasszifikáció az egyes entitások meghatározásában a morfológia mellett már klinikai és citogenetikai jellemzőket is figyelembe vett. Jelenleg a WHO 2008-ban frissített ajánlása az elfogadott, amely a perifériás vérben jelen levő blastok, Auer pálcák, a cytopeniát mutató sejtvonalak száma, a csontvelő jellemzői és a citogenetikai eltérések alapján határozza meg az egyes alcsoportokat [9] (2. táblázat).

2. táblázat. Az MDS 2008-as WHO klasszifikációja [9]

Entitás	Perifériás vér	Csontvelő
Refrakter cytopenia egy sejsort érintő dysplasiával	1-2 sejsort érintő cytopenia blast nincs	egy sejsort érintő dysplasia, < 10% dysplasiás sejt < 5% blast < 15% gyűrűs sideroblast
Refrakter cytopenia gyűrűs sideroblastokkal (RARS)	anaemia	erythroid dysplasia < 5% blast > 15% gyűrűs sideroblast
Refrakter cytopenia több sejsort érintő dysplasiával (RCMD)	bicytopenia, vagy pancytopenia, < 1% blast, nincs Auer pálca <1×10 ⁹ /l monocyta	két, vagy több sejsort érintő dysplasia, > 10% dysplasiás sejt < 5% blast, nincs Auer pálca ± 15% gyűrűs sideroblast
Refrakter anaemia magas blastarányal-1 (RAEB-1)	cytopenia < 5% blast, nincs Auer pálca < 1×10 ⁹ /l monocyta	egy, vagy több sejsort érintő dysplasia, 5-9% blast, nincs Auer pálca
Refrakter anaemia magas blastarányal-2 (RAEB-2)	cytopenia 5-19% blast, ± Auer pálca < 1×10 ⁹ /l monocyta	10-19% blast, ± Auer pálca
Nem osztályozható MDS (MDS-U)	cytopenia < 1% blast, nincs Auer pálca < 1×10 ⁹ /l monocyta	egy, vagy több sejsort érintő dysplasia, < 10% dysplasiás sejt < 5% blast
MDS izolált del(5q)-val	anaemia, < 1% blast, normális/emelkedett thrombocytaszám	normális/emelkedett megakaryocytaszám, hypolobulált sejtmag, < 5% blast, nincs Auer-pálca, izolált del(5q)

A betegek várható túlélése és a leukémiás átalakulás kockázata szempontjából több pontrendszert alkottak a prognózis meghatározása céljából. A legszélesebb körben használt az IPSS (International Prognostic Scoring System) pontrendszer [10] (3.táblázat).

3. táblázat. IPSS (International Prognostic Scoring System) [10]

		Érték	Pontszám
Csontvelő blast (%)		< 5	0
		5-10	0,5
		11-20	1,5
		21-30	2,0
Kariotípus	normál, del(5q), -Y, del(20q)	jó	0
	minden egyéb	közepes	0,5
	komplex (≥ 3) vagy 7-es kr.	rossz	1,0
Cytopenia		0-1	0
		2-3	0,5
Rizikó besorolás	Összpontszám	Átlagos túlélés (év)	25% AML (év)
Kicsi	0	5,7	9,4
Közepes-1	0,5-1,0	3,5	3,3
Közepes-2	1,5-2,0	1,2	1,1
Nagy	$\geq 2,5$	0,4	0,2

2012-ben Greenberg és munkatársai által publikálásra került az IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), amely a korábbinál nagyobb jelentőséget tulajdonít a citogenetikai eltéréseknek 5 citogenetikai alcsoportba sorolva a betegeket, ezenkívül a cytopenia mélységét is figyelembe veszi [11]. A WPSS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System) a WHO osztályozás és a transfúzió függőség jelentőségének ismeretében 2007-ben Malcovati által kidolgozott prognosztikus rendszer, amely a WHO osztályozást, citogenetikai eltérést és a transfúziós igényt veszi figyelembe. Ez a pontrendszer különösen alkalmas a kis kockázatú csoporton belül a biztosan nagyon jó prognózisú esetek megkülönböztetésére [12].

2.1.2. Biológia és patogenezis

A betegség kialakulásában genetikai, epigenetikai és immunológiai tényezők egyaránt szerepet játszanak. Általánosan elfogadott, hogy az MDS a hemopoetikus őssejtet és a csontvelői mikrokörnyezetet érintő többlépcsős folyamat következményeként alakul ki [13]. Klinikai megjelenésben különböző entitásokat foglal magába, amelyek közös

jellemzője a periférián észlelhető cytopenia, szemben a csontvelői progenitorok kifejezett proliferációjával [14]. A jelenség a csontvelői hemopoetikus sejtek nagyfokú apoptózisával magyarázható [15], amely az alacsonyabb rizikójú betegcsoportban kifejezettebb, a csontvelői blastarány növekedésével mértéke csökken. Igazolódott, hogy a fokozott apoptózis döntően a megváltozott csontvelői mikrokörnyezet által termelt pro-inflammatorikus cytokinek mediálta parakrin folyamat következménye. A résztvevő cytokinek közül a tumornekrózis faktor-alfának (TNF- α) kiemelkedő szerepe van. A pro-apoptotikus, pro-inflammatorikus cytokinek - TNF- α , IL-1 β , TGF- β - fokozott termelése minden MDS szubtypusban kimutatható [16]. Az immunfolyamatok szabályozási zavara autoimmun myeloszuppresszió révén szintén szerepet játszik az ineffektív hemopoezis kialakulásában [17, 18]. Az MDS egyes entitásaiban egy másik, a patogenezisben fontos szerepet játszó közös eltérés az epigenetikai reguláció gyakori zavara, amit a terápiában alkalmazott hypometiláló szerek cytopeniát javító hatása is igazol. Az új generációs génszekvenálási technikák segítségével az előbb említett epigenetikai szabályozásban résztvevő gének mellett a DNS hibajavítás, a transzkripciós reguláció és különböző jelátviteli utakban szereplő gének visszatérő szomatikus mutációit is igazolták [19].

2.1.3. Kezelés

A betegek kezelése prognosztikai csoportokba való tartozásuk alapján történik figyelembe véve a transzfúziós igényt, az anaemián kívüli cytopenia mértékét, a csontvelői blast arányt és a citogenetikai jellemzőket. A kis kockázatú csoportban a hemopoezis támogatása, a transzfúziós igény és a leukémiás transzformáció csökkentése a cél, a nagy kockázatú csoportban a túlélés hosszabbításához a kóros klón intenzív kemoterápiával történő eradikálása szükséges. A szupportív kezelés mellett növekedési faktorok, immunszuppresszív készítmények, hypometiláló szerek, immunmodulálók, intenzív kemoterápia és allogén hemopoetikus őssejt-transzplantáció tartozik a terápiás lehetőségek közé. Az egyetlen gyógyító célú kezelést az allogén őssejtátültetés jelenti, ez azonban a betegek idős kora és társbetegségeik miatt csak ritkán alkalmazható. A lenalidomid a kis kockázatú csoportba tartozó, transzfúziófüggő betegek és az 5q- citogenetikai eltéréssel rendelkezők esetében különösen hatékony. A

hypometiláló 5-azacitidint és a decitabint elsősorban a nagy kockázatú betegcsoportban alkalmazzák [20]. A hazai gyakorlatban a többségében idős, társbetegségekkel rendelkező MDS betegek döntően szupportív kezelésben részesülnek. A hemoszubsztitúció és a vaskelátképzők alkalmazása általánosan elterjedt. A növekedési faktorok ugyan hozzáférhetőek, de elsővonalbeli kezelésként nem kapnak OEP támogatást. A lenalidomid és egyes hypometiláló szerek jelenleg csak egyedi méltányosság alapján adhatók. Az allogén őssejtátültetés indikációját a Felnőtt Csontvelőátültető Bizottság bírálja el, ez a kezelési mód az arra alkalmas betegek számára hazánkban is lehetséges alternatíva.

2.2. Myeloma multiplex (MM)

2.2.1. Diagnózis, klinikum

A WHO osztályozása szerint az MM a B sejtes differenciálódás terminális szakaszát képviselő plazmasejtek klonális rosszindulatú daganatos megbetegedése. A csontvelőben felszaporodott kóros plazmasejtek nagy mennyiségben termelnek komplett, vagy inkomplett monoklonális immunglobulint, amely a szérumban és/vagy a vizeletben, mint paraprotein jelenik meg, jellegzetes elektroforetikus mintázatot, M-komponenst mutatva. Az aktív, tünetekkel járó MM diagnózisa az IMWG 2003-as meghatározása szerint a kóros M-protein (szérum elektroforézis, immunfixáció, könnyűlánc meghatározás) és a csontvelői monoklonális plazmasejtek (csontvelő aspiráció és/vagy biopszia, áramlási citometria, immunhisztokémiai vizsgálat), valamint az általuk létrehozott szervkárosodások kimutatásán alapul. A malignus plazmasejtek és a kóros fehérjék következtében kialakuló szervkárosodásokra utaló klinikai és laboratóriumi jeleket az angolszász irodalomból származó CRAB mozaikszó foglalja össze (hypercalcemia, renal failure, anemia, bone lesions) [21]. A betegek leggyakrabban csontfájdalmakkal, csontvelő-elégtelenség tüneteivel, vagy ritkábban veseelégtelenség miatt fordulnak orvoshoz [22]. A myelomát szinte minden esetben megelőzi a klonális plazmasejt proliferáció premalignus, tünetmentes stádiuma, az MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance – nem meghatározott jelentőségű monoklonális gammopathia). Ebben az esetben a monoklonális fehérje

mennyisége és a csontvelői plazmasejtek aránya nem éri el a diagnózishoz szükséges mértéket, valamint a klinikai tünetek, szervkárosodás jelei is hiányoznak [23, 24]. Az MGUS előfordulási gyakorisága az 50 év feletti kaukázusi populációban 3% és MM-be történő progressziójának esélye évente 1 % [25]. Amennyiben klinikai tünetek, célszervkárosodás jelei még nincsenek, de a myeloma diagnózisához szükséges kritériumok megállapíthatóak, az úgynevezett parázsló myelomáról, smoldering myeloma multiplex (SMM) beszélünk [26], amely az MGUS és MM közötti köztes állapotot jelent. A SMM tünetekkel járó myelomába történő progressziójának kockázata az első 5 évben a legnagyobb, ekkor évente 10%, a következő 5 évben évente 3 %, a további 10 év során pedig évente csak 1 % [27]. Az egyes entitások elkülönítésére azért van szükség, mert gyógyszeres kezelés csak tünetekkel járó myeloma multiplexben indikált, a másik két esetben a szoros megfigyelés a teendő. A myeloma és a megelőző állapotok diagnosztikus kritériuma a betegség patomechanizmusának pontosabb megismerése és a diagnosztikus eljárások finomodása következtében a közelmúltban módosult [28]. A jelenleg érvényben lévő, 2014-ben megjelent nemzetközi ajánlás részleteit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. MGUS, SMM és MM diagnosztikus kritériumai a legújabb, 2014-es IMWG ajánlás szerint [28]

	MGUS	SMM	MM
Csontvelői klonális plazmasejt	< 10 %	10-60 %	≥ 10 % vagy biopsziával igazolt plasmocytoma
M-komponens	ÉS < 30 g/l szérum vagy <500 mg/24 h vizelet	ÉS/VAGY ≥ 30 g/l szérum vagy ≥ 500 mg/24 h vizelet	
CRAB tünet/MDE	NINCS	NINCS	≥ 1
MDE	(C) Hypercalcaemia (Ca > 2,75 mmol/l) (R) Veseelégtelenség (kreatinin clearance < 40 ml/min vagy kreatinin > 177 µmol/l) (A) Anaemia (hgb < 100 g/l) (B) ≥ 1 lytikus csonttétérés rtg, CT, vagy PET-CT vizsgálattal ≥ 60 % klonális csontvelői plazmasejt ≥ 100 FLC arány > 1 MRI-vel igazolt fokális csontlézió		

MDE: myelomát meghatározó esemény (myeloma-defining event); CT: komputertomográfia; PET: pozitronemissziós tomográfia; MRI: mágneses rezonancia vizsgálat; FLC: szabad könnyűlánc

2.2.2. Előfordulási gyakoriság

Az MM a második leggyakoribb rosszindulatú hematológiai betegség a non-Hodgkin lymphomák után, a hematológiai malignus kórképek közel 10%-át, az összes daganatos megbetegedés 1 %-át teszi ki. Jellemzően az idősebb korosztályt érinti, előfordulása az életkor előrehaladtával nő. A diagnózis felállításakor az átlagéletkor 70 év, a betegek 2/3-a a diagnóziskor 65 éven felüli [29]. Napjainkban azonban megfigyelhető a betegség egyre fiatalabb életkorban való jelentkezése is. Az incidencia széles határok között mozog, 0,4-5/100 000 lakos, az előfordulás a fejlett nyugati államokban (Ausztrália, Új-Zéland, Észak-Amerika, Európa nyugati része) a leggyakoribb, Ázsiában a legritkább [30]. Férfiakban gyakrabban fordul elő, a férfiak és nők aránya 3:2. Magyarországon a férfiak nagy esetszámú korai kardiovaszkuláris mortalitása miatt a nemek aránya fordított. Az évente felismert új esetek száma növekedést mutat [31]. A Nemzeti Rákregiszter adatai alapján hazánkban 2013-ban 259 férfi és 309 nő betegedett meg myelomában, azaz 568 új esetet regisztráltak [32].

2.2.3. Etiológia

Bár a betegség pontos etiológiája ismeretlen, bizonyított kockázati tényezőnek számít az idősebb életkor, férfi nem, etnikai háttér, a családban előforduló myeloma, vagy egyéb lymphoid vérképzőszervi malignitás, valamint az előzményekben szereplő myelomát megelőző állapot (MGUS vagy SMM). Valószínű rizikótényező az obezitás, herpes zoster fertőzés és a HIV fertőzés. Ellentmondóak az epidemiológiai adatok, valamint a kohorsz és eset-kontroll tanulmányok eredményei a tartós immunstimulus, autoimmun betegség, foglalkozási és környezeti ártalmak vonatkozásában [33].

2.2.4. Biológia és patogenezis

A myeloma patogenezisének két fő meghatározó folyamata a malignus klónon belül kialakuló genetikai eltérések és a myelomasejt és mikrokönyezete közötti kapcsolat.

2.2.4.1. A myelomás sejtklón jellemzői

A myelomasejt a terminálisan differenciálódott, immunglobulint termelő, hosszan túlélő plazmasejt neoplasztikus megfelelője. Többségük nyugvó, alacsony proliferációs potenciállal rendelkező sejt. Feltételezhető, hogy a klonális növekedés csak egy szűkebb sejtpopulációra szorítkozik, ez az elmélet a myelomás klónon belüli funkcionális heterogenitást valószínűsíti [34]. Az új molekuláris technikák (SNP array, új generációs szekvenálás) vizsgálati eredményei szerint már a betegség kezdetekor több malignus klón létezik párhuzamosan. A klonális heterogenitás egyetlen betegen belül is mind térbeli, mind időbeli vonatkozásban bizonyított [35]. Az egyes szubklónok ugyanazért a csontvelői mikrokörnyezetért versenyeznek, ennek következtében a betegség lefolyása során tapasztalhatjuk a klonális evolúció jelenségét [36]. A kialakuló genetikai eltérések a transzformált plazmasejt szubklón(ok) növekedési előnyét eredményezik, amely a betegség progressziójához, terápiarezisztenciához vezet. Az egyes lépcsőfokok egyre jobban növelik a kórkép genetikai komplexitását [37].

A korai, primer onkogén esemény nagy valószínűséggel a nyirokcsomó centrum germinatívumában történik a szomatikus hypermutáció, vagy izotípus osztályváltás során, amely a DNS kettőslánc törése miatt, a folyamat természetéből adódóan hajlamosít genetikai hibákra. A tény, hogy ugyanezeket a korai genetikai eltéréseket MGUS-ban és SMM-ben is kimutatták arra utal, hogy ezek az eltérések szükségesek, de nem elégségesek a MM kialakulásához. A késői, szekunder onkogén események nagy valószínűséggel a csontvelőben mennek végbe [38].

A normális plazmasejt malignus transzformációját elindító két fő elsődleges, úgynevezett korai genetikai esemény az IGH (immunglobulin nehézlánc) 14q32 régió transzlokációi és a hyperdiploiditás. Az IGH lókuszt érintő kromoszóma transzlokációk a betegek közel 50 %-ában fordulnak elő. A transzlokáció következtében a partnerrégióban elhelyezkedő onkogének az IGH lókuszt erős enhancerének szabályozása alá kerülnek és ezáltal fokozott expressziójuk következik be. Az öt leggyakoribb partner kromoszóma régió a 11q13 (cyclin D1), 4p16 (FGFR-3 és MMSET), 6p21 (cyclin D3), 16q23 (c-maf) és 20q11 (mafB). A hyperdiploiditás, amely a másik korai genetikai esemény, elsősorban a páratlan számú kromoszómákat érinti és szintén a betegek közel 50 %-ában fordul elő. A hyperdiploiditás kialakulásának pontos

molekuláris mechanizmusa még nem ismert. A kromoszómák triszómiája, vagy az intersticiális kópiaszám nyereség az előbbiekhöz hasonlóan onkogének expressziójának fokozódásával, aktivációs mutációjával okozza a plazmasejtek malignus transzformációját. Mindkét folyamat a betegek többségében a sejtciklus szabályozásában döntő szerepet játszó cyclin D szabályozási zavarához vezet, ami így feltételezhetően egy korai, közös patogenetikai esemény [39, 40].

A másodlagos, későbbi genetikai események, amelyek már a betegség progressziójában játszanak szerepet, kulcsfontosságú onkogén jelutakat aktiválnak (RAS/MAPK, MYC, NFkB), és/vagy tumorszuppresszor gének funkcióvesztését okozzák, úgymint TP53 (tumor protein 53) és RB1 (retinoblasztoma 1). Ezek az eltérések rossz prognózist jelentenek, csakúgy, mint az 1q21 amplifikáció, vagy az 1p veszteség [41].

Mind a DNS metilációja, mind a hiszton poszttranszlációs módosítása befolyásolja a génextpressziót. Myelomában a patogenezis szempontjából legfontosabb epigenetikai változás a globális hypometiláció és a génspecifikus hypermetiláció, amely többek között az MGUS-ból a myelomába történő transzformáció során figyelhető meg. A legkifejezettebb DNS metilációs változás a betegek 15 %-ában előforduló t(4;14) transzlokáció esetében figyelhető meg, amely az MMSET, hiszton metiltransferáz aktivitással rendelkező gén fokozott expressziójának a következménye. Ez génspecifikus hypermetilációs expressziós mintázatot eredményez, amely a sejt túléléséhez és proliferációjához vezet [42].

2.2.4.2. A csontvelői mikrokörnyezet szerepe

A csontvelői strómasejtek a hemopoetikus őssejtek mellett a myelomasejtek számára is proliferációt, apoptózis elleni védelmet, gyógyszerrezisztenciát elősegítő környezetet biztosítanak a csontvelői „niche”-ben mind direkt sejt-sejt kontaktus, mind cytokinek, kemokinek szekréciója révén. A normális és a myelomás plazmasejtek proliferációját szabályozó komplex autokrin és parakrin cytokin hálózat legfontosabb szereplői az IL1 β , IL6, IL10, TNF- α , IGF-1, HGF, MIP1 α és egyes Wnt családba tartozó cytokinek [43]. A tumoros mikrokörnyezeten belül a makrofágok tumor-asszociált makrofágokká (TAM) differenciálódnak, amelyek a myelomasejtekhez tapadnak. A TAM-ok az IL-6, valamint a TNF- α és IL-1 β fő szekretálói, továbbá IL-10-et termelnek, amely a T sejt

működés gátlása révén a daganatos immuntolerancia fő mediátora, ezenkívül jelentősen elősegítik az angiogenezist, így a myeloma patogenezisében fontos szerepet töltenek be [44]. Az IL-6 a myelomás sejtek növekedését elősegítő egyik legfontosabb cytokin. Elsősorban a csontvelői strómasejtek és makrofágok termelik. A myelomasejtek adhéziója a csontvelői strómasejtekhez az NFkB transzkripciós faktoron keresztül fokozza az IL-6 termelést [45]. Az IL-6 a receptorán keresztül aktiválva a JAK/STAT3 és PI3K/AKT jelutakat a myelomasejtek proliferációját és túlélését eredményezi, ugyanakkor gátolja a Fas-indukálta apoptózist [46]. Az IL-6 a vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF) szekrécióját is fokozza, valamint az osteoclast differenciálódásban is szerepet játszik [47]. A csontvelői mikrokörnyezetből származó TNF- α , IL-1 β és IL-17 szintén fokozott IL-6 termelést váltanak ki.

A TNF- α a gyulladás és a csontreszorpció mediátora. Elősegíti a myelomasejtek túlélését, proliferációját és migrációját. A myeloma és csontvelői strómasejtek felszínén az adhéziós molekulák expresszióját fokozza, ezáltal az NFkB jelutat aktiválja [48].

Az IGF-1 az IL-6-hoz hasonlóan a myelomasejtek túlélését segíti elő a PI3K/AKT, MAPK és NFkB jelutak aktiválásán keresztül [49].

2.2.5. Prognosztikai faktorok

A myelomás betegek kezelésre adott válasza és túlélése jelentős különbséget mutat. Ez a heterogenitás részben a tumorról, részben a beteggel kapcsolatos tényezőkkel függ össze. Az elmúlt 30 év irodalmát áttekintve hatalmas adatmennyiség gyűlt össze, amely a myeloma klinikai és biológiai jellemzőit vizsgálta a túlélés szempontjából, de mindmáig nincs konszenzus a legmegfelelőbb markereket, vagy az ezek alapján kialakított stádium meghatározásokat illetően.

Már az 1960-as években olyan biomarkereket kerestek, amelyek a túlélés független prediktoraiként voltak értékelhetők. (Biomarkernek nevezhető bármilyen jellemző, – gén, fehérje, klinikopatológiai, vagy akár képalkotó jellemző - amely objektíven és reprodukálhatóan mérve indikátora a betegség biológiájának, vagy a terápiára adott válasz mértékének.) Az első időkben főleg a tumor tömeg nagyságát tükröző paramétereket vizsgálták, hiszen ez nyilvánvalóan szoros kapcsolatban áll a túléléssel. Ezek a haemoglobin, szérum kalcium, szérum kreatinin és a csontkárosodás mértéke

voltak [50]. 1975-ben a Durie és Salmon féle stádium meghatározás az M-proteint, haemoglobint, kalciumot és a csonteltérések számát vette figyelembe a myelomás tumor tömeg becslésére, a kreatinin szint további alcsoportokra bontotta a betegeket [51]. Az 1980-as években a szérumban β -2 mikroglobulin (β 2M), mint a tumor tömegre utaló egyszerű és megbízható marker került alkalmazásra, mind a betegség stádiumának, mind a túlélésnek a meghatározásában [52, 53]. Ezt követően az albumin [54], C-reaktív protein [55], és a csontvelői plazmasejt proliferációs aktivitását tükröző plazmasejt jelölési index [56] szerepelt, mint prognosztikus marker, de széleskörű gyakorlati alkalmazásukra nem került sor. A fenti paramétereket β -2 mikroglobulinnal együtt is alkalmazták [55, 56]. A vizsgált tényezők között szerepelt a keringő plazmasejt jelenléte, amelyet 4 % felett tekintettek független rossz prognosztikai tényezőnek [57]. A sejtek anyagcseréjére utaló emelkedett LDH érték nagy tumor tömegre, agresszívabb betegségre, extramedulláris folyamatra enged következtetni, szintén kedvezőtlen jelentőségű [58]. 2005-ben egy több országot magába foglaló konzorcium a β 2M és albumin felhasználásával létrehozta a ma is széles körben alkalmazott nemzetközi besorolási rendszert (International Staging System; ISS), amelynek alapján a meghatározott betegség stádiumok alkalmasnak bizonyultak a túlélés előrejelzésére [59]. Az utóbbi években a szérumban szabad könnyűlánc (FLC) arány, mint új biomarker került be a gyakorlatba [60]. A myeloma szövődményei, mint a veseelégtelenség, anaemia, csontszerkezeti eltérések szintén kedvezőtlen faktorok a túlélés szempontjából [61].

A citogenetika, a többi hematológiai betegséghez hasonlóan, a myelomában is az egyik legfontosabb prognosztikai marker. MM-ben a tumorsejtek alacsony mitotikus aktivitása miatt a hagyományos citogenetikai vizsgálat a betegek mindössze 20-30 %-ában informatív [62, 63]. Azonban fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) vizsgálattal, vagy molekuláris citogenetikai technikával vizsgálva szinte minden MM tumornál kóros kariotípust lehetne igazolni. Myelomában az IGH transzlokációk és a génállomány mennyiségének aneuploid állapotát eredményező változások határozzák meg a jellemző genetikai eltéréseket. Az interfázis FISH vizsgálat, amely a sejteket nyugalmi fázisban értékeli, az utóbbi években alapvető prognosztikai tényezővé vált. A FISH vizsgálat alapján nagy rizikócsoportha tartozik a t(4;14), t(14;16), t(14;20), del17p, és az 1q

amplifikáció. Minden egyéb eltérés a standard, vagy az alacsony rizikócsoporthoz jelenti [64].

A génextpressziós profil (GEP) vizsgálatok hatalmas mennyiségű adatot szolgáltatnak, amelynek értékelése komoly bioinformatikai felkészültséget igényel. Az első molekuláris csoportosítás alapja a cyclin D expresszió és az azonosított IgH gént érintő transzlokáció típusa, az úgynevezett TC klasszifikáció volt [65], ugyancsak ezen alapul az IMWG által javasolt molekuláris klasszifikáció is, amely 8 különböző szubtypust különít el [66]. Egy másik, szintén génextpressziós vizsgálaton alapuló klasszifikáció a myeloma 7 különböző biológiai viselkedésű alcsoportját különbözteti meg, amelyek közül két jellemző klinikai képpel rendelkező myeloma szubtypus, a proliferatív és a „low bone” csoportok felismerését éppen az expressziós profil tette lehetővé [67]. A GEP vizsgálat lehetőséget nyújt a nagy rizikócsoporthoz tartozó betegek azonosítására. Az Arkansasi munkacsoport 70 génből álló készlet vizsgálatát javasolja, ami 17 génre redukálható, a nagy rizikójú betegek azonosítására mind diagnóziskor, mind relapsus esetén. Az összes beteg kb 15 %-a tartozik ebbe a csoportba [68].

A kezelésre adott válasz a legfontosabb tényezők egyike a túlélés szempontjából. Egy 21 vizsgálatot elemző meta-analízis szerint az autológ őssejtátültetésre adott jó válasz a progressziómentes túlélést (PFS) és a teljes túlélést (OS) is megnövelte [69].

Az eddig felsorolt prognosztikai tényezőket kombinálva több kísérlet történt a MM stádium meghatározására. A Durie-Salmon féle stádium beosztást 1975-ben dolgozták ki, matematikai modell alapján készítették és a tumoros sejttömeg és a paraprotein mennyiségének összefüggésén alapult [51]. Széles körben alkalmazták, hátránya azonban hogy a csonteltérések számának megítélése szubjektív (5. táblázat).

5. táblázat. Durie-Salmon klinikai stádium beosztás (1975) [51]

Stádium	Kritériumok	Betegek megoszlása	Túlélés (hónapok)
I	Hgb > 100 g/l Kalcium < 3,0 mmol/l M-protein: IgA < 30 g/l IgG < 50 g/l Bence Jones protein < 4 g/24 h RTG: ép csontstruktúra, vagy csak szoliter plasmocytoma	IA: 7,5 % IB: 0,5 %	IA: 62 IB: 22
II	Egy, vagy több a következőkből: Hgb 85-100 g/l Kalcium < 3,0 mmol/l M-protein: IgA 30-50 g/l IgG 50-70 g/l Bence Jones protein 4-12 g/24 h 3, vagy kevesebb csontlézió	IIA: 22 % IIB: 4 %	IIA: 58 IIB: 34
III	Egy, vagy több a következőkből: Hgb < 85 g/l Kalcium > 3,0 mmol/l M-protein: IgA > 50 g/l IgG > 70 g/l Bence Jones protein > 12 g/24 h Jelentős csontérintettség	IIIA: 49 % IIIB: 17 %	IIIA: 45 IIIB: 24
A	Se kreatinin < 177 µmol/l (< 2 mg/dl)		
B	Se kreatinin > 177 µmol/l (> 2 mg/dl)		

Ezt a hátrányt később a Durie-Salmon-PLUS stádium meghatározás küszöbölte ki a rendszer MRI-vel és/vagy FDG-PET vizsgálattal való kiegészítésével, azonban ez utóbbi vizsgálatok nehezebb hozzáférhetősége és magas költségei miatt nem terjedt el a gyakorlatban [70].

A Durie-Salmon klasszifikációt 2005-ben felváltotta az új nemzetközi besorolási rendszer (International Staging System; ISS), amely két egyszerű, könnyen reprodukálható laboratóriumi paraméter, a béta-2 mikroglobulin és a szérum albumin mennyiségét veszi figyelembe [59]. Ezt a stádium meghatározást 11 171 beteg bevonásával, 3 kontinensen végzett multicentrikus vizsgálat eredményei alapján hozták létre. Az ISS három rizikócsoporthat különböztet meg, amelyek alapján az egyes csoportok túlélése jól különválnak: 62, 44 és 29 hónap. A beosztás reprodukálható volt minden korcsoportban, különböző geográfiai populáció esetében, konvencionális kezelés és autológ őssejtvédelemben adott nagydózisú kemoterápia esetén is. Ez a

stádium beosztás ma a legegyszerűbben alkalmazható, legszélesebb körben elterjedt prognosztikai rendszer (6. táblázat).

6. táblázat. International Staging System (ISS) (2005) [59]

Stádium	ISS kritérium	Betegek megoszlása	Várható túlélés (hónapok)
I	β -2 mikroglobulin < 3,5 mg/dl szérum albumin \geq 3,5 g/dl	28 %	62
II	β -2 mikroglobulin < 3,5 mg/dl és szérum albumin < 3,5 g/dl vagy β -2 mikroglobulin 3,5-5,5 mg/dl	33 %	44
III	β -2 mikroglobulin \geq 5,5 mg/dl	39 %	29

Az ISS azonban nem alkalmas a tumor tömegtől függetlenül a genetikai eltérés alapján nagy rizikócsoporthoz tartozó betegek azonosítására, ezért több próbálkozás történt a citogenetikai eltérésekkel történő kombinációra. ISS, t(4:14) és del(17) által meghatározott 3 rizikócsoporthoz [71], illetve egy másik tanulmányban ISS, kedvezőtlen citogenetika és LDH érték alapján 4 stádiumot állapítottak meg [72]. A legfrissebb ajánlás a Nemzetközi Myeloma Munkacsoport által javasolt módosított ISS (Revised International Staging System, R-ISS), amely az ISS, citogenetikai eltérések és LDH eredményeit veszi figyelembe. A nemzetközi tanulmány 11 centrumból 4445 beteg adatait dolgozza fel, 3 stádiumot határoz meg. A vizsgálat eredményei ezenkívül igazolták az ISS alkalmazhatóságát az újabb kezelési módok (immunmoduláló szerek [IMiD] és proteaszóma gátlók [PI]) esetében is [73] (7. táblázat).

7. táblázat. ISS (2005) és R-ISS (2015) kritériumrendszer [73]

ISS			R-ISS		
Stádium	Kritérium	5 éves PFS és OS (%)	Stádium	Kritérium	5 éves PFS és OS (%)
I	$\beta 2M < 3,5$ mg/dl és albumin $\geq 3,5$ g/dl	49 és 77	I	ISS I FISH standard rizikó LDH normális	55 és 82
II	$\beta 2M < 3,5$ mg/dl és albumin $< 3,5$ g/dl vagy $\beta 2M 3,5-5,5$ mg/dl	36 és 62	II	Sem I sem III	36 és 62
III	$\beta 2M \geq 5,5$ mg/dl	30 és 47	III	ISS III és FISH nagy rizikó vagy LDH emelkedett	24 és 40

$\beta 2M$: béta-2 mikroglobulin; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; ISS: International Staging System; LDH: laktát dehidrogenáz; PFS: progressziómentes túlélés; OS: teljes túlélés

2.2.6. Kezelés

Korábban a myeloma terápiáját a myelotoxikus kemoterápiás szerek jelentették, ezek között elsősorban az alkiláló szerek, antraciklinek és a glukokortikoidok szerepeltek. A melphalant 1958 óta alkalmazták és prednizolonnal kombinálva évtizedeken keresztül a kezelés „arany standardját” jelentette [74]. Az 1970-es évektől kezdve közel 30 éven keresztül többféle kemoterápiás kombinációs sémát próbáltak az eredmények javítása érdekében. A kezelésre adott válaszarány javult ugyan, de az átlagos túlélés a 90-es évek közepéig változatlanul 3 év volt [75]. Komoly előrelépést a túlélésben az autológ hemopoetikus őssejtátültetés (ASCT) védelmében alkalmazott nagy dózisú kemoterápia bevezetése jelentett [76]. Jelenleg ez vált a myeloma standard kezelésévé, az újonnan diagnosztizált betegek terápiás stratégiáját a transzplantációra való alkalmasság határozza meg. A biológiai korukat tekintve 70 évesnél fiatalabb, jó általános állapotú betegeket, a társbetegségeket is figyelembe véve, általában nagy dózisú kemoterápiában és autológ őssejtátültetésben kell részesíteni. Bár a túlélést a korábbi standard dózisú kezelésekhöz képest meghosszabbítja, magát a myelomát ez a kezelési forma sem tudja véglegesen meggyógyítani, ezért a betegség kiújulására gyakorlatilag minden esetben számítani kell. Kuratív kezelési módot csak az igen kevés esetben alkalmazható és nagy transzplantációs mortalitással járó allogén őssejtátültetés egyes esetei jelentenek,

azonban relapszus itt is előfordulhat. A betegek 5-10 %-a alkalmas allogén transzplantációra figyelembe véve a HLA-identikus donorok elérhetőségét, a betegek életkorát és a társbetegségeket [77].

Az elmúlt 15 év drámai változást hozott a myeloma kezelésében. Több, merőben új hatásmechanizmusú, mind a myelomás tumorsejtet, valamint annak csontvelői mikrokönyezettel való kapcsolatát célba vevő, nem myelotoxikus szerrel bővült a terápiás lehetőség. Mérföldkőnek számított az 1999-ben bevezetett thalidomid [78], egy korábban nyugtatóként alkalmazott, de teratogenitása miatt a forgalomból kivont készítmény, amelyről bebizonyosodott, hogy apoptózist elősegítő, angiogenezist gátló, a T és NK (natural killer) sejtek működését befolyásolva immunmoduláló és direkt myelomaellenes tulajdonságokkal rendelkezik [79, 80]. A kedvező terápiás eredmények hatására rövid időn belül újabb thalidomid-analógok (lenalidomid, pomalidomid, összefoglaló nevükön az immunmoduláló hatásukra utalva IMID-ek) kerültek kifejlesztésre, amelyek még hatékonyabb és jobb mellékhatás profillal rendelkező készítményeknek bizonyultak [81-84].

A proteaszóma gátlók (PI) a hatásmechanizmust és rezisztencia viszonyokat tekintve egy másik, teljesen új vegyületcsoportot reprezentálnak. A bortezomib, az első reverzibilis proteaszóma gátló készítmény 2003-ban a került klinikai alkalmazásra [85-88].

Az immunmodulánsokat és a proteaszóma gátlókat „új szerek” néven említi a szakirodalom. Jelentős részben kiváltották a korábbi évekre jellemző myelotoxikus, kemoterápia-alapú kezelést, amelynek révén a kezelések toxicitása számottevően csökkent.

A várható túlélés az autológ össejtátültetés védelemben végzett nagy dózisú kemoterápia és az új, immunmoduláló és proteaszóma gátló készítmények alkalmazása eredményeképpen lényeges javulást mutatott. A Mayo Klinika tanulmányában 2981 beteg adatait összehasonlítva az 1976 és 2006 közötti időszakban, az utolsó 10 évben diagnosztizált betegek átlagos túlélése 50 %-kal javult a korábbi időszakhoz képest (44,8 hónap vs 29,9 hónap) [89]. Az előbbi vizsgálat folytatásaként, ugyancsak a Mayo Klinika beteganyagát áttekintve, két további időperiódusban 2001-2005 és 2006-2010 között diagnosztizált 1038 beteg esetében vizsgálták a túlélést, amelynek átlaga az első csoportban 4,6 a későbbiben 6,1 év volt. Ez megerősíti a túlélés további, folyamatos

javulásának tényét, ami döntően az új szerek alkalmazásának a jelentőségét bizonyítja [90].

2.2.7. Myeloma és genetika kapcsolata

Számos epidemiológiai adat - a betegség családi halmozódása, a jellemző etnikai különbség az előfordulásban - utal arra, hogy genetikai tényezők szerepet játszanak a myeloma kialakulásában [91-96].

Az elmúlt évtizedben a teljes génállományt feltérképező génasszociációs vizsgálatok (genom-wide association study [GWAS]) eredményei közvetlen bizonyítékokkal szolgáltak a myelomával kapcsolatos genetikai hajlam demonstrálására. Myelomában eddig 7 genetikai lókuszt azonosítottak, amelyek variációi a családi halmozódású esetek közel 13 % -ért felelősek [97]. Broderick és mtsai 2012-ben a myelomára vonatkozó első teljes genom asszociációs vizsgálatban német és angol betegek adatbázisának meta-analízise során 1675 beteg és 5903 kontroll személy mintáját vizsgálva 3 lókuszt azonosítottak a 3p22.1, 7p15.3 és 2p23.3 helyeken, amelyekhez tartozó polymorfizmusok szignifikánsan gyakoribban fordultak elő a myelomás csoportban [98]. Ezt az eredményt a 3p22.1-es lókuszon Greenberg munkacsoportja is megerősítette [99]. A későbbiekben Chubb és mtsai tanulmányában 4692 myelomás és 10990 kontroll személy genetikai mintáját összehasonlítva a 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 és 22q13.1 lókuszon található genetikai variációk bizonyultak szignifikánsan gyakoribbnak a myelomás esetekben, így ezek az adatok további bizonyítékul szolgáltak a genetikai hajlam igazolására [100].

2.3. A multifaktoriális betegségek genetikai hátterének vizsgálati módszerei

A daganatos betegségek a poligénes, multifaktoriális betegségek közé tartoznak. A kóros folyamat több gén és több környezeti tényező egymásra hatásának következtében alakul ki. A genetikai háttér tisztázása asszociációs vizsgálatokkal lehetséges. Ilyenkor bizonyos genetikai markerek genotipizálásával, majd statisztikai módszerekkel az adott marker adott betegséghez – fenotípushoz - kapcsolódó esélyét vizsgálják. Ha egy marker asszociál egy fenotípussal, az azt jelenti, hogy az adott allél (marker)

szignifikánsan gyakrabban fordul elő az adott fenotípussal együtt, mint a kontroll populációban. Genetikai markerként minden olyan genetikai variáció használható, amellyel jellemezni lehet egy lókuszt, és alkalmas arra, hogy két homológ kromoszómán lévő lókuszt között különbséget tegyen. A genom leggyakoribb variációja az egy nukleotidot érintő polimorfizmus (SNP). Az asszociációs vizsgálatokban leggyakrabban ezt a markert használják.

2.3.1. Egy pontú nukleotid polimorfizmus (SNP)

SNP-nek (single nucleotide polymorphism) azaz egy pontú nukleotid polimorfizmusnak nevezzük a DNS szekvenciában bekövetkező, egyetlen nukleotidot érintő változást, amennyiben a populációban való előfordulása eléri az 1% gyakoriságot. A humán genomban 300-1000 bázispáronként található egy SNP, becsült számuk közel 30 millió, 2010-ben az azonosított SNP-k száma megközelítette a 20 milliót. Az SNP-k leírását nyilvános adatbázisok tartalmazzák: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. A legtöbb SNP nem befolyásolja a fenotípust, mivel vagy nem-kódoló szakaszon helyezkedik el, vagy azonos aminosavat kódoló, úgynevezett szinonim SNP. Azonban a funkcionális jelentőségű polimorfizmusok, amelyek a fehérje funkciójának, vagy mennyiségének változását eredményezik, hajlamosíthatnak betegségekre, vagy befolyásolhatják a kórlefolyást. Az SNP-k genetikailag stabil markerek, emiatt biológiai markerként jól használhatók a genetikai vizsgálatokban.

A genetikai markerek alkalmazása során ismerni kell a kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság, linkage disequilibrium (LD) fogalmát. Ha két allél (marker) egymástól függetlenül öröklődik, akkor a populációs eloszlásuk egymáshoz képest véletlenszerű, azaz köztük egyensúly van. Amennyiben két, vagy több, általában egymás közelében elhelyezkedő genetikai variáns generációkon keresztül kapcsoltsán öröklődik, ez a véletlenszerű eloszlás megszűnik, és az allélok között az úgynevezett kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság jelensége lép fel. Az egy kromoszómán elhelyezkedő, genetikailag kapcsoltsán öröklődést mutató SNP készletet haplotípusnak nevezzük. A különböző populációkban eltérő haplotípusokat és haplotípus frekvenciákat lehet találni. Ezen erősen konzervált blokkok elterjedése és fennmaradása feltehetően evolúciós előnnyel járt az adott populációban. A haplotípusok

feltérképezésére indult el 2002-ben a HapMap project. Jelenleg a haplotípus térképeket szintén katalogizálták és nyilvánosan hozzáférhetővé tették [101].
<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

2.3.2. Genetikai variációk kimutatása

A genetikai variánsok betegségben játszott szerepének megítélésére kétfajta megközelítés ismert: a kapcsoltsági analízis és az asszociációs vizsgálatok. A kapcsoltsági analízis a betegségek és a genetikai variánsok megjelenését követi nyomon adott család több generációján keresztül. A kapcsoltsági analízissel szemben az asszociációs vizsgálatok a genetikus változó és a betegség közötti kapcsolat fennállását nagy populációkban tanulmányozzák.

Kandidáns gén asszociációs vizsgálat

Az asszociációs vizsgálatok során kétféle módszertani megközelítés lehetséges: a hipotézis által irányított és a hipotézismentes. Az előbbire példa a jelölt gén asszociációs vizsgálat, amikor olyan kandidáns géneket választunk ki, amelyek az adott betegségre jellemző biológiai folyamatban nagy valószínűséggel részt vesznek. Ehhez ismerni kell a betegség patomechanizmusát. A másik módszer példája a teljes genomszűrés.

Teljes genom asszociációs vizsgálat (GWAS)

A molekuláris biológiai technika fejlődésével a SNP-k kimutatása automatizálhatóvá vált, egyetlen chippel több százezer SNP-t lehet kimutatni. Ebben az esetben nincs semmiféle előzetes elméleti megfontolás a vizsgálandó SNP-k kiválasztásában, és nem szükséges ismerni a vizsgálandó betegség pontos patomechanizmusát. A teljes genom asszociációs vizsgálat, genome wide association study (GWAS) a humán genom genetikai variációit vizsgálja. Általában fenotípusos jelet hordozó (beteg) személyeket és kontroll populációt genotipizálnak keresve, hogy melyik marker gyakorisága különbözik a két populáció között. Ha a különbség statisztikailag szignifikáns, akkor

kapcsolódás állapítható meg a kérdéses marker és a vizsgált jelleg, betegség között. Az elmúlt évek során a GWAS vizsgálatok óriási lehetőséget nyújtottak a multifaktoriális betegségek genetikai hátterének tisztázására, az egyes kórképek biológiájának jobb megismerésére. Mivel a vizsgálat hipotézismentes, ezért a patogenezisben szereplő lehetséges új utakra irányíthatja a figyelmet, amelyek egyben új terápiás célpontokat is jelenthetnek.

2.4. TNF- α

A tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) a TNF szupercsaládba tartozó cytokin, amely pro-inflammatorikus hatása révén az immunregulációs és gyulladásos folyamatok egyik legfontosabb mediátora, de kiemelkedően fontos szerepe van az apoptózisban, továbbá a sejtproliferációban, a morfogenetikai változásokban, valamint a differenciálódási folyamatokban is. A TNF- α -t döntően makrofágok termelik, de a cytokin produkciójában részt vesznek aktivált T sejtek, masztociták, NK sejtek, endothel sejtek, adipociták, asztrociták, gliasejtek, oszteoblasztok és tumorsejtek is. [102].

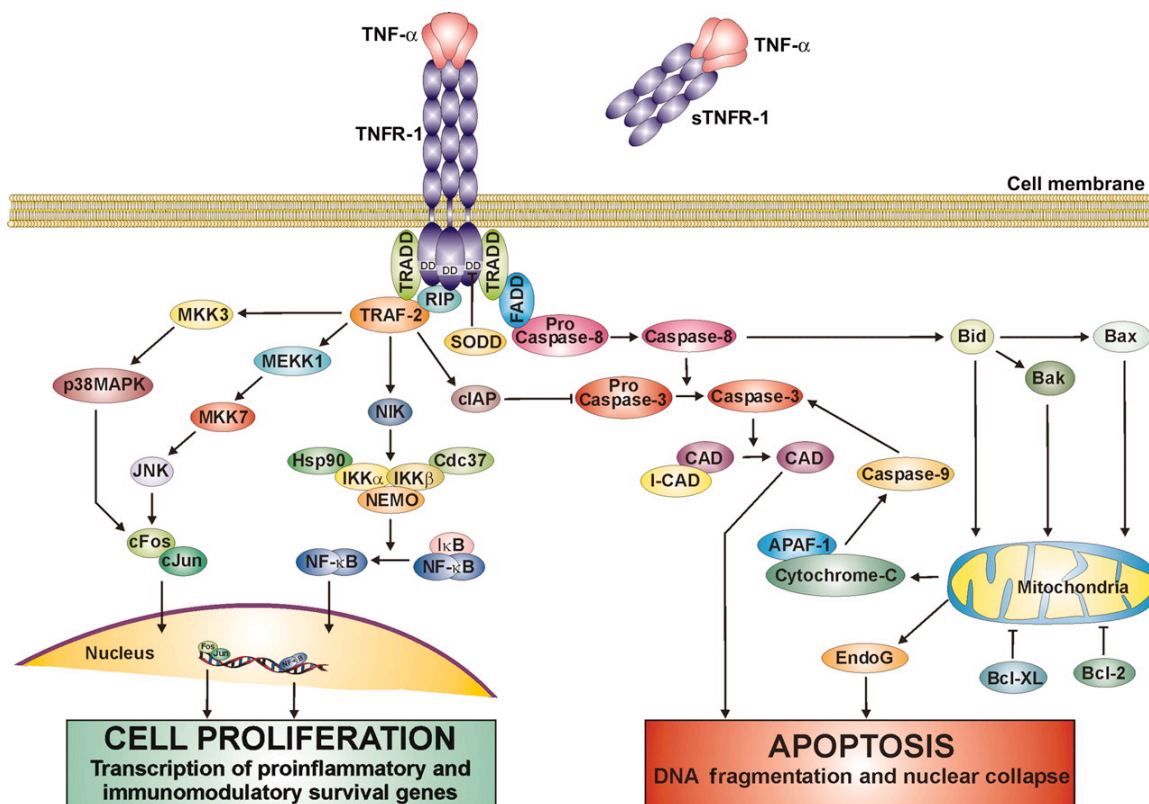
2.4.1. A TNF szupercsalád

A TNF szupercsaládba 19 ligand és 29 receptor tartozik. Több ligand egynél több receptoron is hat, ugyanakkor a sejtfelszíni receptorok több ligandot is köthetnek. A TNF- α és a limfotoxin-alfa (LT- α vagy LTA) azonos cytokin családba tartoznak, szerkezetbeli és funkcionális homológiát mutatnak. Mindketten hasonló affinitással ugyanahhoz a receptorhoz kapcsolódnak [103]. Minden ligand kivétel nélkül pro-inflammatorikus hatású, de több családtag a sejtproliferációban, apoptózisban, sejtdifferenciálódásban is részt vesz, akár egyszerre több folyamatban is, mint például a TNF- α esetében is látható.

2.4.2. TNF- α által kiváltott jelutak

A TNF- α kötődésekor a tumor nekrozis faktor receptor-1 (TNFR1) szerkezete megváltozik, képes kötni a TNFR- associated death domain (TRADD) fehérjét, így

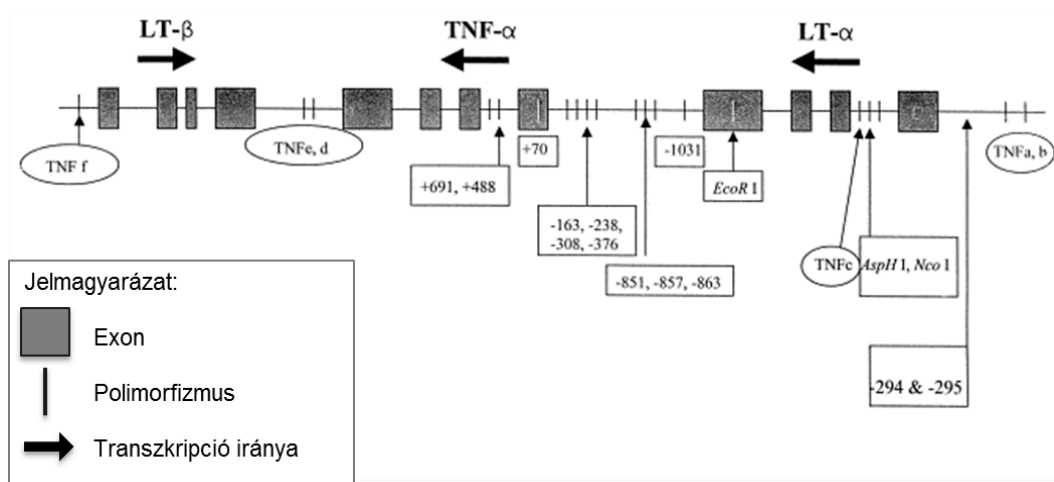
lehetővé válik több adapter molekula kötődése, amelyek segítségével különböző jelátviteli folyamatok: az apoptózis, a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B), az extracelluláris signal-regulated kinase (ERK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) és c-Jun N-terminal kinase (JNK) jelutak aktiválása valósulhat meg [104]. Az NF κ B transzkripciós faktor aktiválása számos, a sejt túlélésben, proliferációban, gyulladásos és antiapoptotikus folyamatban szereplő fehérje átírását eredményezi. Látható, hogy a TNF- α -nak kulcsszerepe van az apoptózisban és ugyanakkor a sejt túlélésében is. A különböző jelutak közötti interakció szabja meg a TNF- α válasz jellegét [105] (1. ábra).



1. ábra. A TNF- α által kiváltott jelutak [105]

APAF-1: apoptosis protein activating factor 1; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; CAD: caspase-activated DNase; cIAP: cytoplasmic inhibitor of apoptosis; cFos/cJun: transzkripciós faktorok; DD: death domain; FADD: Fas-associated DD; HSP90: heat shock protein 90; I-CAD: inhibitor of CAD; I κ B: inhibitor of NF- κ B; IKK α / β : I κ B kinase; JNK: cJun n-terminal kinase; MEKK1: mitogen-activated protein kinase/extracelluláris signal-regulated kinase kinase 1; MKK3/7: MAPK kinase 3/7; NEMO: NF- κ B essential modulator; NF- κ B: nuclear factor kappa B; NIK: NF- κ B inducing kinase; p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; RIP: receptor interacting protein; SODD: silencer of DD; sTNFR-1: soluble TNFR-1; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; TNFR-1: TNF receptor 1; TRADD: TNF receptor-associated DD; TRAF-2: TNF receptor-associated factor-2

2.4.3. A TNF- α gén



2. ábra. A *TNF* génklaszter az MHC III régióiban belül, amely a *LT- α* , *TNF- α* és *LT- β* géneket tartalmazza. A mikroszatellita variánsok (kör) és az ismert SNP-k (szögletes kerettel) elhelyezkedése [106]

A TNF- α fehérjét kódoló *TNF* gén a 6-os kromoszóma rövid karján, a 6p21.33 szakaszon, a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) III régióban helyezkedik el, amely génszakaszra nagyfokú polimorfizmus jellemző (2. ábra). Ezen a területen az immunválasz szabályozásában fontos cytokinek és plazmafehérjék kódoltak. A TNF- α -t kódoló génnek több DNS szintű polimorfizmusa ismert: 6 mikroszatellita variáns és a promóter régióiban belül több SNP [106]. A *TNF- α* és *LT- α* (*LTA*) gének egymás mellett helyezkednek el és variáns alléljaik jellemzően kapcsolatosan öröklődnek közös haplotípust alkotva. A *LT- α* a TNF- α -hoz hasonlóan proinflammatorikus cytokin, és IL-6 termelést indukál. A *LTA* génen belül is több polimorfizmus ismert, ezek közül az első intron +252 pozícióban lévő A>G báziscserének bizonyított a funkcionális jelentősége [107, 108].

Az MHC régióra jellemző a nagyfokú linkage disequilibrium (LD), kapcsoltsági egyensúlytalanság, ami által akár megabázisnyi (Mb) hosszúságú kromoszómaszakaszok öröklődhetnek generációkon át szinte változatlan formában. Az egyetlen őstől származó, az emberi evolúció korai időszakában kialakult, és azóta csupán minimális módosuláson átesett hosszú DNS szekvenciákat ősi haplotípusnak

(ancestral haplotype [AH]), vagy konzervált kiterjesztett haplotípusnak (conserved extended haplotype [CEH]) nevezik [109]. Az egyik ilyen haplotípus az AH8.1 kiterjesztett ősi haplotípus, amely a kaukázusi populációban igen elterjedt (közel 10%). A TNF -308A és a LTA 252G variáns allélok ennek az ősi haplotípusnak a részei.

2.4.4. A genetikai polimorfizmus és a TNF- α szint összefüggése

A *TNF* gén transzkripciójának szabályozása alapvetően fontos a termelődő TNF fehérje mennyisége szempontjából. A promóter régióon belüli genetikai variációk befolyásolhatják a TNF átíródását, génexpresszióját, ezáltal szerepet játszhatnak bizonyos betegségekben előforduló emelkedett TNF szint létrejöttében.

A TNF- α fehérjét kódoló *TNF* gén promóter régiójának -308-as pozíciójú biallélikus G/A polimorfizmusa az asszociációs vizsgálatok által egyik legtöbbször használt SNP [110]. In vitro vizsgálatok igazolták, hogy a -308A (más elnevezésben TNF2) variáns allélt hordozó sejtek TNF- α termelése kifejezettebb a TNF -308G allélt (TNF1) hordozó sejtekénél [111]. A populációban ritkábban előforduló variáns, a -308A (TNF2) allél, többszörösen erősebb transzkripció aktivátor, mint a gyakori -308G (TNF1) allél [112]. A báziscsere következtében a DNS konformáció változás eredményeképpen a különböző nukleáris faktorok kötődése, affinitása módosul [113, 114]. A -308A (TNF2) variáns allél in vivo jelentőségét igazolják azok a közlemények, amelyek szerint egyes fertőző, gyulladásszerű betegségek lefolyása súlyosabb, és egyes autoimmun, illetve daganatos betegségek előfordulása gyakoribb a ritka allélt hordozók esetében [115-117]. A ritkábban előforduló -308A (TNF2) allélról igazolódott, hogy egy kiterjesztett HLA-A1-B8-DR3-DQ2 MHC haplotípus része, amely autoimmun betegségek gyakoribb előfordulásával és fokozott TNF- α termeléssel jár együtt [118]. A promóter régió másik gyakran vizsgált polimorfizmusa a -238-as pozícióban megfigyelt G/A polimorfizmus, amely szintén funkcionális jelentőségű, azaz fokozott TNF cytokin termeléssel jár [119].

2.4.5. TNF- α szerepe MDS-ben

A myelodysplasiára jellemző a periférián megjelenő pancytopenia szemben a csontvelőben észlelt normo-, vagy hypercellularitással. Az ineffektív hemopoézis, perifériás pancytopenia hátterében az apoptózisnak döntő szerepe van [120]. Abnormális cytokin produkció, autoreaktív T lymphocyták és a progenitor sejtek és csontvelői mikrokörnyezet közötti megváltozott interakció mind elő tud idézni fokozott apoptózist. A hemopoetikus sejtek túlélését a növekedési faktorok és a myeloszuppresszív cytokinek finom egyensúlya szabályozza. A TNF- α -ról ismeretes, hogy a hemopoézis potenciális inhibitora, myeloszuppresszív cytokin, apoptózist indukál [121]. A TNF-nek az apoptózisban betöltött kulcsszerepe révén feltételezhető volt, hogy az MDS patogenezisében is fontos szerepe lehet. Több tanulmány bizonyította, hogy MDS betegek csontvelői mononukleáris sejtjeiben emelkedett a TNF- α mRNS és fehérje szintje az egészséges kontrollokhoz képest [122, 123]. Emelkedett szérumban TNF- α szintet találtak MDS betegek vérében, amelynek a mértéke korrelált az anaemia fokával [124], valamint a rHuEPO-ra adott kedvezőtlen válasszal [125, 126]. Gersuk és mtsai 44 MDS beteg csontvelői mintáját vizsgálva igazolták, hogy a TNF- α , Fas és FasL szintek lényegesen emelkedettebbek MDS-ben az egészséges csontvelői mintához képest, továbbá az értékek magasabbak voltak a refrakter anaemia (RA) csoportban a refrakter anaemia excesszív blastarányal (RAEB) csoporthoz képest. Ugyanez a vizsgálat kimutatta, hogy Fas és TNF- α ellenes antitest kezelés jelentősen növeli a hemopoetikus kolóniák számát az MDS betegek csontvelői kultúrájában [127].

2.4.6. TNF- α szerepe MM-ben

A TNF- α -t elsősorban a csontvelői strómasejtek és a tumoros csontvelői mikrokörnyezeten belül a makrofágok (tumor-asszociált makrofág [TAM]) termelik nagy mennyiségben, de maguk a myelomasejtek is expresszálják. Elősegíti a myelomás sejtek túlélését, proliferációját és migrációját [128, 129]. Részből a fő myeloma cytokinnel, az IL-6-tal szinergizmusban, de tőle független útvonalon is fokozza a kóros plazmasejtek proliferációját [130]. A myeloma és csontvelői strómasejtek felszínén az

adhéziós molekulák expresszióját fokozza, ennek eredményeként a MM sejtek csontvelői strómasejtekhez történő adhéziója az NFkB jelút aktiválásán keresztül IL-6 termelést vált ki [131]. A keringő TNF- α szint arányos a csontvelői plazmasejtszám, LDH, és béta-2 mikroglobulin alapján a myelomás tumor tömeggel, továbbá a betegség stádiumával való korreláció alapján a betegség agresszivitásával is [132].

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. Myelodysplasiában végzett vizsgálatok

A fenti irodalmi előzmények alapján a myelodysplasia genetikai hátterét kívántuk vizsgálni kandidáns gén kiválasztásával. A TNF- α központi szerepét ismerve a myelodysplasiában megfigyelhető fokozott apoptózisban és következményes ineffektív hemopoesisben feltételeztük, hogy az emelkedett cytokin termeléssel járó genotípusok gyakrabban fordulnak elő MDS-ben, és ezáltal szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. Ennek ismeretében a következő kérdést fogalmaztuk meg:

- Van-e különbség a TNF- α -238-as és -308-as genotípusok előfordulási gyakoriságában myelodysplasiás betegek és egészséges kontroll személyek esetében?

3.2. Myeloma multiplexben végzett vizsgálatok

A myeloma multiplex genetikai hátterét vizsgálva először itt is a betegség patogenezisében szerepet játszó kandidáns gén megközelítést alkalmaztuk. Az irodalmi adatok alapján a TNF- α a myelomasejtek proliferációjában és túlélésében fontos szerepet játszó cytokin és hasonló hatásokkal rendelkezik a LT- α is. Hipotézisünk az volt, hogy a fokozott cytokin termeléssel járó génvariánsok elősegíthetik a myeloma kialakulását, akár azon keresztül, hogy a plazmasejtek proliferációját fokozzák, akár úgy, hogy a környező sejtekben aktiválnak olyan utakat, amelyek elősegítik a myeloma számára kedvező mikro környezet létrejöttét.

A TNF- α gén és a vele tandem elhelyezkedő a LT- α gén bizonyítottan funkcionális jelentőséggel bíró variáns alléljeik jellemzően kapcsolatosan öröklődnek közös haplotípust alkotva. A legalább két ritka allél hordozását emelkedett cytokin termeléssel járó haplotípusnak nevezi az irodalom [133]. A TNF -308A és a LTA +252G variáns allélok az úgynevezett AH8.1 kiterjesztett ősi haplotípusnak is részei, amelynek az egyik legjellemzőbb tulajdonsága a fokozott spontán TNF- α termelődés [134].

A következőkben azt kívántuk vizsgálni, hogy az emelkedett TNF- α szinttel járó polimorfizmusok önmagukban külön, vagy haplotípusban gyakrabban fordulnak-e elő MM-ben a kontroll populációhoz képest és ezáltal szerepet játszanak-e az MM patogenezisében? Az irodalmat áttekintve az AH8.1 ősi haplotípus hordozás gyakoriságát MM-ben eddig nem vizsgálták. Az AH8.1 haplotípust a TNF -308G>A, LTA +252A>G, HSP70-2 +1267A>G, RAGE -429T>C polimorfizmusok együttes jelenléte alapján állapítottuk meg. Ennek megfelelően a következőket vizsgáltuk:

- TNF -308G>A, LTA +252A>G, HSP70-2 +1267A>G, RAGE -429T>C variáns allélok előfordulási gyakorisága MM betegek és életkorban illesztett kontroll személyek esetében
- TNF-308A-LTA252G emelkedett cytokin termeléssel járó haplotípus előfordulási gyakorisága MM betegek és életkorban illesztett kontroll személyek esetében
- 8.1 ősi haplotípus előfordulási gyakorisága MM betegek és életkorban illesztett kontroll személyek esetében

A myelomára vonatkozó első teljes genom asszociációs vizsgálat 3 polimorfizmust jelölt meg az MM kialakulására hajlamosító tényezőként. Egy 2011-ben megalakult nemzetközi együttműködéshez csatlakoztunk saját beteganyagunkkal, hogy ezáltal 1000 főnél nagyobb számú, az eredeti vizsgálatától független populáción validáljuk az említett teljes genom asszociációs vizsgálat eredményét. A következőkre kerestünk választ:

- A 7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs746082) lókuszek polimorfizmusa genotípus megoszlás és allélfrekvencia szerint mutat-e különbséget MM betegek és a kontroll populáció között?

A myeloma esetében a prognózis becslésére alkalmas egyszerű, könnyen elérhető és reprodukálható laboratóriumi paraméterekből alkotott, korábban már publikált [141] pontrendszer alkalmazhatóságát kívántuk vizsgálni új típusú, nem myelotoxikus kezelésben részesült MM betegek esetében. Kérdésünk a következő volt:

- A diagnóziskor meghatározott albumin (A) / monoklonális fehérje (M) arány, valamint az előbbi két paraméter és az induló fehérvérsejtszám (WBC) felhasználásával kialakított AMWBC pontrendszer alkalmas-e a túlélés előrejelzésére újonnan diagnosztizált MM betegek esetében bortezomib, illetve IMiD bázisú kezelés alkalmazása esetén?

4. MÓDSZEREK

4.1. Myelodysplasiában végzett vizsgálatok

4.1.1. TNF- α -238G>A (rs361525) és -308G>A (rs1800629) pozíciójú polimorfizmusok meghatározása MDS-ben és kontroll csoportban

4.1.1.1. Betegek és kontroll csoport

A vizsgálatban 69, a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikáján 2005 előtt diagnosztizált és gondozott MDS beteg (26 férfi, 43 nő) és 125 egészséges kontroll személy (38 férfi, 87 nő) adatait elemeztük. Az MDS betegek átlagéletkora 69 év volt, a kontroll csoporté 44.7 ± 1.8 év. A kontroll csoportba egészséges, nem rokon, a kaukázusi rasszhoz tartozó, foglalkozás egészségügyi szűrővizsgálaton résztvevő személyek kerültek. A kontroll populáció genotípus eloszlása nem tért el a Hardy-Weinberg egyensúlytól. Minden résztvevő felvilágosítást követően beleegyezését adta a vizsgálatban való közreműködéséhez. Munkánk a Nemzeti Kutatás-Értékelési Bizottság engedélyével történt (ETT-TUKEB: 441/KO/2004. 12236-45/2004-1018EKU). Az MDS betegek adatait a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat. MDS betegek klinikai jellemzői (n=69)

NEM	n (%)
Férfi	26 (38%)
Nő	43 (62%)
ÉLETKOR A DIAGNÓZISKOR	
Átlagéletkor 69 év (39-88 év)	
WHO/FAB KLASSZIFIKÁCIÓ	
RA	27 (39%)
RARS	19 (29%)
RAEB	3 (4%)
RAEB-t	14 (20%)
Hipoplasztikus	3 (4%)
MDS/MPS	3 (4%)
IPSS	
Sikeres citogenetika csontvelőből 32/69	
Alacsony	6 (19%)
Intermedier-1	17 (53%)
Intermedier-2	4 (12.5%)
Magas	5 (15.5%)

4.1.1.2. Mintavétel és DNS izolálás

Minden résztvevőtől 3 ml perifériás vérmintát vettünk rutin vérvételi körülmények között, etilén-diamin-tetra-acetát (EDTA) antikoagulánst tartalmazó egyszer használatos vérvételi csőbe. A mintákat a genotípus meghatározásig -20 Celsius (°C) fokon tároltuk. A genomiális DNS mintát a perifériás vér mononukleáris sejtjeiből nyertük, a Miller-féle egyszerű kizózásos technika szerint eljárva [135]. Az eljárás során a fehérvérsejteket EDTA-val alvadástól véréből szeparáltuk hipotóniás oldattal történő mosás és centrifugálás során a következő módon: a standard 2 milliliteres (ml-es) csőbe 1 ml vörösvértest lízis puffert (a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriuma által készített puffer, összetevők: Sigma-Aldrich gyártmányúak, összetétele 54,8 g szacharóz, 5 ml Triton, 2,5 ml 1 M MgCl₂ x 6 H₂O, 6 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 desztillált vízzel 500 ml-re feltöltve) mértünk. Erre kb. 0,5 ml-t öntöttünk a

vérmentából, ezeket 30 másodpercen (mp-en) keresztül óvatosan összeforgattuk. Ezután 13 000 rpm (revolutions per minute, egy percre eső fordulatok száma) sebességgel 2 percen keresztül centrifugáltuk. Ezáltal a fehérvérsejtek a cső alján pellet formájában, a vörösvértestek fragmentumai a felülúszóban voltak találhatóak. A felülúszó leöntését követően a fehérvérsejteket a még oldatban maradt vörösvértest fragmentumoktól tovább tisztítottuk, a pelletre 1 ml desztillált vizet mértünk, majd ismét 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm sebességgel. A fehérvérsejtek biológiai membránját proteináz K és detergens segítségével bontottuk, a felülúszót pipettával leszívtuk, majd a pelletre 80 µl proteináz K puffert (a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriuma által készített puffer, összetevők: Sigma-Aldrich gyártmányúak, összetétele 750 µl 5 M NaCl, 2,4 ml 0,5 M EDTA, 6,85 ml desztillált víz), majd 15 µl, 10 mg/ml koncentrációjú proteináz K enzimet (Thermo Scientific) mértünk. A mintákhoz ezután 20 µl, 20 %-os SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát), és 240 µl desztillált vizet mértünk, majd 30 percen keresztül 55-56 °C fokon emésztettük vízfürdőben. A fehérvérsejtek lizálását és fehérjeemésztését követően a minták fehérjementesítése következett a fehérjéket precipitáló telített NaCl oldattal: hűtést követően (kb. 10 perc elteltével) az elegyhez 250 µl 5-6 M nátrium-klorid oldatot adtunk, 15 mp-ig erősen ráztuk. Ezután ismét centrifugálás következett 7 percen keresztül, 13 000 rpm sebességgel. A kicsapódott fehérjék a cső alján a centrifugálást követően üledékként összegyűlve, a DNS molekulák a felülúszóban voltak találhatóak. A felülúszót 1,5 ml- es csövekbe öntöttük át. Ezt ismét 3 percen keresztül 13 000 rpm sebességgel centrifugáltuk, ismét 1,5 ml-es csövekbe öntöttük át a felülúszót, amire 1,5 ml izopropil-alkohol (C₃H₈O, i-propanol) pipettáztunk. A csöveket kezdetben lassan, később erősebben forgatva a DNS kicsapódását idéztük elő, majd ismét 2 percen keresztül 13 000 rpm sebességgel centrifugáltuk, majd a felülúszót óvatosan leszívtuk. A kapott DNS mintára 70%-os etanolt mértünk, összerázás után újra 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm sebességgel. Az etanolt ekkor leszívtuk, a DNS mintát 23 °C fokon, 20 percen keresztül vákuumcentrifugában szárítottuk. Ezt követően a DNS mintát 75 µl desztillált vízben feloldottuk, 24 órán keresztül 4 °C fokon tartottuk. További vizsgálatok elvégzése előtt fél órán keresztül 37 °C fokon állni hagytuk.

4.1.1.3. Genotípus meghatározás

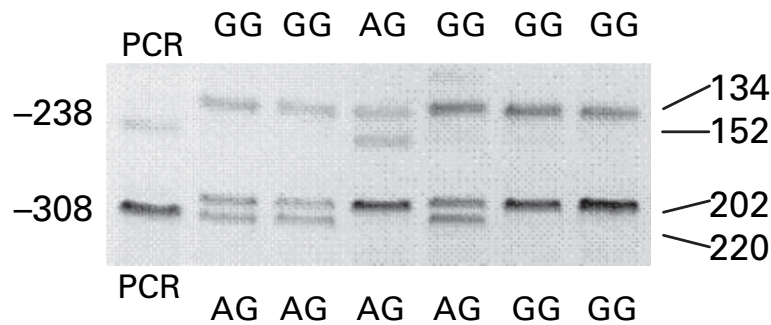
A genotípus meghatározások a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek.

A TNF- α fehérjét kódoló *TNF gén* -238G>A (rs361525) és -308G>A (rs1800629) pozíciójú polimorfizmusait vizsgáltuk. PCR-RFLP metodikát alkalmaztunk Day és mtsai által leírt primereket használva [136].

Először felszoroztuk a vizsgálni kívánt DNS szakaszt. A polimeráz láncreakciókat az AB GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) PCR készülékben végeztük el. Az amplifikációt 50 μ l végtérfigatban hajtottuk végre a megfelelő primerek segítségével, három primert alkalmazva egy reakcióelegyben. A1= 5' ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG 3', M1= 5' AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG 3', M2: 5' AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC 3'. Az A1 és M1 a -308, míg az A1 és M2 a -238 polimorfizmusnak megfelelő szakaszt sokszorozza meg. A PCR reakció fázisai: I. denaturáció 94°C-on 15 perc; II: 35 ciklus: 1. denaturáció 95°C-on 10 másodperc, 2. primer bekötődés 57°C-on 30 másodperc, 3. lánchosszabbítás 72°C-on 30 másodperc; III: végső lánchosszabbítás 1 ciklus 72°C-on 5 perc.

A PCR termékeket ezt követően restrikciós enzimekkel inkubáltuk 37 °C -on. NcoI enzimet használtunk a -308-as, és MspI-t a -238-as pozíciójú poimorfizmus kimutatására.

A hasítási termékeket hagyományos gélelektroforézis segítségével 1x TBE pufferben (0.09M Tris, 0.09M bórsav, 0.002M EDTA, pH=8.0) választottuk szét, amelyhez 1 μ g/ml ethidium-bromidot tartalmazó, megfelelő tömegszázalékú agaróz gélt használtunk. A DNS-EtBr fragmentumokat UV-fénnyel megvilágítva, Syngene Chemigenious2 (Cambridge, UK) gëldokumentációs rendszerben detektáltuk (3. ábra).



3. ábra. TNF- α genotipizálás eredményei a -238-as (felső sor) és a -308-as (alsó sor) pozíciókban. A bal oldalon emésztetlen PCR termék („PCR”) mintázata látható. A jobb oldalon a fragmentek bázispárban kifejezett mérete látható. A megfelelő allélok genotípusai a bázisok betűjelével jelölve

A: adenin; G: guanin

4.1.1.4. Statisztikai analízis

A kategorikus adatokat abszolút számokban és százalékban, a folyamatos változókat medián és interkvartilis tartományban tüntettük fel. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés, vagy egyezés becslésére és az egyes allélok relatív előfordulási gyakoriságának összehasonlítására a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, California, USA; www.graphpad.com) program segítségével végeztük.

4.2. Myeloma multiplexben végzett vizsgálatok

4.2.1. TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G, (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok meghatározása MM betegek és kontroll személyek esetében

4.2.1.1. *Betegek és kontroll csoport*

A vizsgálatban 1997 és 2005 között kezelt, konsekutívan beválasztott 94 myelomás beteg szerepelt. Az MM diagnózisa a 2003-as WHO kritériumok szerint történt. Csak tünettel rendelkező myelomás eseteket vontunk be, az MGUS, SMM diagnózisú betegek nem szerepeltek a vizsgálatban. A stádium meghatározás a Durie és Salmon besorolás alapján történt. A kontroll csoport 141 nem és korcsoport szerint megfeleltetett személyből állt, genotípus eloszlásuk nem tért el a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A kontroll csoportba tartozó személyeket a 2001-ben szervezett Magyar Családorvosok Betegségmegelőző Programjának résztvevői közül választottuk. Ennek a genetikai, epidemiológiai vizsgálatnak a célpopulációja olyan 20 évnél idősebb személyek voltak, akiket az ország nyugati és keleti részét is reprezentáló 4 megyéből 22 családorvos regisztrált. Az 1196 főből a jelen munkánkhoz a 60-69 és a 70-79-es korcsoportokból kaptunk mintákat. Minden egyes résztvevő tájékoztatást követően írásos beleegyezést adott vérmintája vizsgálatokhoz való felhasználásához. Vizsgálatunk a Nemzeti Kutatás-Értékelési Bizottság engedélyével történt (ETT-TUKEB: 441/KO/2004. 12236-45/2004-1018EKU). A MM betegek és a kontroll személyek adatait és a betegek jellemzőit a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat. MM betegek és kontroll személyek demográfiai és klinikai adatai

Jellemzők	Beteg (n=94)	Kontroll (n=141)	p érték
Életkor, évek, medián (interkvartilis tartomány)			
A teljes csoportban	68,0 (59,0-73,0)	68,9 (62,9-74,0)	0,257 ^a
Férfiak	63,0 (49,0-73,0)	68,9 (61,0-73,0)	0,143
Nők	69,6 (62,0-74,5)	68,9 (64,0-75,0)	0,563
Férfi/Nő	28/66	81/60	0,080 ^b
Életkor a diagnóziskor, évek, medián (interkvartilis tartomány)	63,0 (52,0-69,0)	-	-
Nehézlánc $\gamma/\alpha/\mu$	66(70%)/27(29%)/1(1%)	-	-
Könnyűlánc κ/λ	69(73%)/25(27%)	-	-
Durie-Salmon stádium I/II/III	18(19%)/42(45%)/34(36%)	-	-

^a Mann-Whitney teszt

^b Fisher-féle egzakt teszt

4.2.1.2. Mintavétel és DNS izolálás

A mintavétel és a DNS izolálás a 3.1.1.2. pontban leírtak szerint történt.

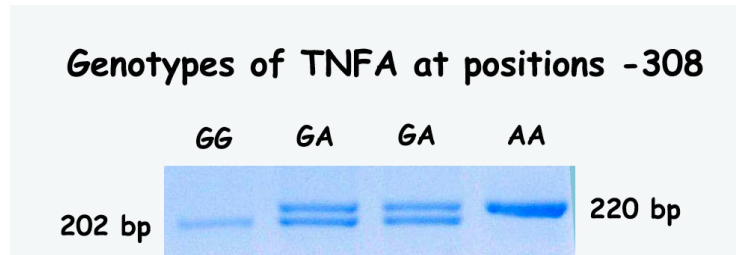
4.2.1.3. Genotípus meghatározások

4.2.1.3.1. A TNF -308G>A (rs1800629) polimorfizmus vizsgálata

A genotípus meghatározások a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek.

A TNF- α fehérjét kódoló *TNF gén* -308 (rs1800629) pozíciójú polimorfizmus meghatározása PCR-RFLP módszerrel történt [136].

Forward primer: 5'-AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG-3', reverse primer: 5'-ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG-3'. A PCR reakció 10 μ l reakció elegyben történt, amely tartalmaz dNTP-t 200-200 μ M koncentrációban, a primereket 1,5-1,5 μ M koncentrációban, 20 ng/ μ l templát DNS-t, 2 mM koncentrációban MgCl₂-t, 10 mM koncentrációban Tris-HCl-t, 50 mM koncentrációban KCl-t és 0.025 U/ μ l HotStart Taq DNS polimerázt (Qiagen). A PCR reakció technikai paraméterei: I. denaturáció 94°C-on 15 perc; II: 35 ciklus: 1. denaturáció 95°C-on 10 másodperc, 2. primer bekötődés 57°C-on 30 másodperc, 3. lánchosszabbítás 72°C-on 30 másodperc; III: végső lánchosszabbítás 1 ciklus 72°C-on 5 perc. 10 μ l-nyi, PCR-termékeket tartalmazó elegyet 8 egységnyi NcoI restriktív endonukleázzal 37°C-on teljes éjszakán át inkubáltuk, majd a G allél jelenléte esetén 18+202 bp, és az A allél jelenléte esetén 220 bp hosszú restriktív fragmentek detektálása gél elektroforézissel 3%-os agaróz gélen történt (4. ábra).



4. ábra. TNF- α genotipizálás eredményei a -308-as pozícióban. A bal és jobb oldalon a fragmentek bázispárban kifejezett mérete látható. A megfelelő allélok genotípusai a bázisok betűjelével jelölve

A: adenin; G: guanin

4.2.1.3.2. A HSP70-2 +1267A>G (rs1061581) polimorfizmus vizsgálata

A genotípus meghatározások a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek.

A HSP70-2 +1267A>G (rs1061581) polimorfizmus vizsgálata az irodalomból ismert PCR-RFLP módszerrel történt [137].

A 10 μ l PCR reakcióelegy tartalmazott forward primert: 5'-CAT CGA CTT CTA CA C GTC CA-3' 1.5 μ M mennyiségben, reverse primert: 5'-CAA AGT CCT TGA GTC CCA AC-3' 1.5 μ M mennyiségben, 20 ng/ μ l templát DNS-t, 200 μ M koncentrációban dNTP-eket, 2 mM koncentrációban MgCl₂-t, 10 mM koncentrációban Tris-HCl-t, 50 mM koncentrációban KCl-t és 0.02 U/ μ l Taq DNS polimerázt (Fermentas). A PCR reakció technikai paraméterei: I: denaturáció 95°C-on 3 percig; II: 35 ciklus: 1. denaturáció 95°C-on 20 másodpercig, 2. primer bekötődés 60°C-on 20 másodpercig, 3. lánchosszabbítás 72°C-on 20 másodpercig; III: végső lánchosszabbítás 72°C-on 6 percig. A 10 μ l-nyi, PCR-termékeket tartalmazó elegyet 10 egység *Pst*I restriktációs enzimmel 37°C-on 6 órán keresztül inkubáltuk. Az A allél jelenléte esetén 1117 bp, a G allél jelenléte esetén 936+181 bp hosszúságú fragmentek detektálása gél elektroforézissel, 3%-os agaróz gélen történt.

4.2.1.3.3. RAGE -429T>C (rs1800625) polimorfizmus vizsgálata

A genotípus meghatározások a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek.

A RAGE -429T>C (rs1800625) polimorfizmus vizsgálata PCR-RFLP módszerrel történt az irodalomban közölteknek megfelelően [138].

Forward primer: 5'-GGG GGC AGT TCT CTC CTC-3', reverse primer: 5'-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-3'. A PCR reakció 50 µl reakcióelegyben történt, amely a primerekből 50-50 pmol-nyi mennyiséget, 10-10 ng/µl templát DNS-t, 200-200 µmol/l koncentrációban dNTP-eket, 2 mmol/l koncentrációban MgCl₂-t, 20 mmol/l koncentrációban Tris-HCl-t, 50 mmol/l koncentrációban KCl-t és 0.02 U/µl Taq DNS polimerázt (Promega Corp., Madison, WI, USA) tartalmazott. A PCR reakció technikai paraméterei: I: 35 ciklus: 1. denaturáció 94°C-on 1 percig; 2. primer bekötődés 56°C-on 1 percig, 3. lánchosszabbítás 72°C-on 2 percig; III: végső lánchosszabbítás 72°C-on 10 percig. A 10 µl-nyi, PCR-termékeket tartalmazó elegyet 2 egység AluI restrikciós endonukleázzal (Fermentas) 6 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a T allél jelenléte esetén 345 bp, és a C allél jelenléte esetén 183+162 bp hosszú restrikciós fragmentek detektálása gélelektroforézissel 3%-os agaróz gélen történt.

4.2.1.3.4. LTA +252A>G (rs909253) polimorfizmus vizsgálata

A genotípus meghatározások a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézet Laboratóriumában történtek.

A LTA +252A>G (rs909253) polimorfizmus vizsgálata irodalmi adatok alapján PCR RFLP módszerrel történt [139].

Forward primer: 5'-CTCCTGCACCTGCTGCCTGGATC-3', reverse primer: 5'-GAAGAGACGTTTCAGGTGGTGTGCAT-3'. A PCR reakció 10 µl reakcióelegyben történt, amely primereket 0,5-0,5 mM végkoncentrációban, 20 ng/µl templát DNS-t, dNTP-eket 0,2mM végkoncentrációban, 2 mM koncentrációban MgCl₂-t, 20 mmol/l koncentrációban Tris-HCl-t, 50 mM koncentrációban KCl-t és 0,025u/µl HotStarTaq polimerázt (Qiagen) tartalmazott. A PCR reakció technikai paraméterei: 1 ciklus: 95°C-on 15 percig; 30 ciklus: 1. denaturáció 30 másodpercig 94 °C-on, 30 másodpercig 56

°C-on és 45 másodpercig 72°C-on, majd 1 ciklus 72 °C-on 7 percig. A 10 µl-nyi, PCR-termékeket tartalmazó elegyet 10 egység *NcoI* restrikciós endonukleázzal 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd az A allél jelenléte esetén 368 bp, és a G allél jelenléte esetén 235+133 bp hosszú restrikciós fragmentek detektálása gél elektroforézissel 2%-os agaróz gélen történt.

A TNF -308A, HSP70-2 +1267G, RAGE -429C, és LTA +252G allélok szimultán hordozása esetén feltételeztük az AH8.1 hordozó állapotot.

4.2.1.4. Statisztikai analízis

A kategórikus adatokat abszolút számban és százalékban, a folytonos változókat mediánban és interkvartilis tartományokban tüntettük fel. A kategórikus adatokat (genotípusok, allélok és haplotípusok gyakorisága) a Fisher-féle egzakt teszt, vagy Pearson-féle Khi-négyzet teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze. A 0,05-nál kisebb értéket tekintettünk szignifikánsnak. Minden tesztünk kétoldalas volt. Bármely, egyszeres változós analízisben szignifikáns különbséget többszörös logisztikus regressziós modellben is vizsgáltunk. Minden egyes polimorfizmus esetén Pearson-féle Khi-négyzet próbával teszteltük a Hardy-Weinberg eloszlás meglétét. A betegek és a kontroll csoport életkorának összehasonlítására Mann-Whitney tesztet használtunk. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, www.graphpad.com) és SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL) programok segítségével végeztük. A páronkénti kapcsoltságot és a kapcsoltság erejét (D' érték) az Arlequin (<http://anthro.unige.ch/arlequin>) program segítségével számítottuk ki. Ugyanezt a programcsomagot használtuk a haplotípus meghatározására is.

4.2.2. 7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM-ben és kontroll populációban

4.2.2.1. Betegek és kontroll csoportok

2011-ben megalakult egy nemzetközi együttműködés, a Nemzetközi Myeloma Multiplex Konzorcium (International Multiple Myeloma rESEarch [IMMEnSE]), amely a myeloma epidemiológiájának, genetikájának és farmakogenetikájának vizsgálatát tűzte ki céljául. A jelen vizsgálat idején 14 centrum csatlakozott a konzorciumhoz Németország, Olaszország, Spanyolország, Lengyelország, Portugália, Franciaország, Dánia és Magyarország területéről. Hazánkat munkacsoportunk 139 MM beteg és 104 kontroll személyvel képviselte, akik közül a myelomás betegeket a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Hematológiai részlegén és a Szent László Kórház Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályán diagnosztizáltak és kezeltek. A magyarországi kontroll csoport kórházban kezelt, MM-ben nem szenvedő, életkor szerint illesztett betegekből állt, akiket a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikáján ápoltak. A kontroll csoport esetében a daganatos és az immunpatológiai betegségek kizáró okot képeztek.

A vizsgálatban összesen 1139 MM beteg és 1352 kontroll személy vérmintája került genotipizálásra, amely mintákat a résztvevő centrumok biztosították. 1990 és 2010 között diagnosztizált MM betegek kerültek bevonásra, a diagnózis a 2003-as IMWG kritériumok alapján történt. A kontroll csoportban véradók, egészséges átlagpopulációba tartozók és olyan kórházban kezelt betegek voltak, akik nem szenvedtek daganatos betegségben. Mindegyik vizsgált személy a kaukázusi rasszhoz tartozott. Minden résztvevő a vizsgálatba beleegyező írásos nyilatkozatot adott, a vizsgálatok a megfelelő etikai bizottságok jóváhagyásával történtek. Az MM betegek és kontroll személyek jellemzőit a 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat. MM betegek és kontroll személyek demográfiai jellemzői

Ország	MM BETEGEK			KONTROLL SZEMÉLYEK			Kontroll típusa
	Nem F/N (Összes)	Átlag-életkor (± SD)	Medián életkor (Tartomány)	Nem F/N (Összes)	Átlag-életkor (± SD)	Medián Életkor (Tartomány)	
IT	121/111 (232)	62,5 (±9,9)	63 (35-87)	131/106 (237)	58,8 (±10,8)	59 (35-89)	átlagpopuláció
PL	59/59 (118)	62,1 (±10,5)	62 (39-86)	69/81 (150)	69,5 (±6,7)	69 (55-98)	véradók
ES	100/109 (209)	63,4 (±11,1)	64 (31-93)	173/158 (331)	65,2 (±12,6)	66 (24-92)	kórházban fekvő betegek
FR	46/35 (81)	55,5 (±9,4)	57 (27-75)	48/47 (95)	33,2 (±14,8)	30 (18-60)	véradók
PT	32/36 (68)	66,0 (±11,2)	67,5 (41-86)	55/45 (100)	60,7 (±7,7)	58 (51-85)	véradók
HU	49/90 (139)	66,2 (±11,4)	68 (34-90)	50/54 (104)	73,4 (±10,1)	74,5 (51-95)	kórházban fekvő betegek
DK	174/118 (292)	55,3 (±7,1)	56 (29-69)	177/158 (335)	62,9 (±4,9)	63,5 (52-73)	átlagpopuláció
Összesen	581/558 (1139)	60,9 (±10,6)	61 (27-93)	703/649 (1352)	62,0 (±13,3)	63 (18-98)	

IT: Olaszország; PL: Lengyelország; ES: Spanyolország; FR: Franciaország; PT: Portugália; HU: Magyarország; DK: Dánia

4.2.2.2. DNS mintavétel és genotípus meghatározás

A perifériás vérből nyert DNS minták Heidelbergben, a Német Rákkutató Központban (DKFZ) kerültek tárolásra és később genotipizálásra.

A genotípus meghatározás a dán minták kivételével TaqMan próba (ABI, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alapú allél diszkriminációval történt a gyári protokollnak megfelelő technológiát alkalmazva. A PCR lemezek ABI PRISM 7900HT műszer segítségével lettek leolvasva. (Applied Biosystems). A genotípus meghatározása az SDS Software, version 2.4 (Applied Biosystems) program segítségével történt. A Dániából származó kontroll minták esetében egy korábban publikált GWAS vizsgálat kontroll populációjának adatait bocsátották rendelkezésre, az eredeti vizsgálatban a genotipizálás a Human Hap 550 Infinium II chip és a Human 610-Quad chip (Illumina, San Diego, CA) alkalmazásával történt.

4.2.2.3. Statisztikai analízis

A kontroll mintáknál minden esetben ellenőrzésre került a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés megléte, vagy hiánya. Cochran–Mantel–Haenszel (M-H) teszt és Breslow-Day (B-D) teszt került alkalmazásra az egyes szubpopulációkon belüli heterogenitás meghatározására minden SNP esetében. Meta-analízis végzése történt minden SNP esetében, a két másik GWAS vizsgálat és a jelen vizsgálat eredményeit közös esélyhányadossá összevonva. A meta-analízisen belüli heterogenitás ellenőrzése Cochran's Q és I^2 statisztikai számításokkal történt. Minden számítás illesztve lett életkor, nem, és a régióknak megfelelő eredet szerint a STATA software (StataCorp, College Station, TX) felhasználásával.

4.2.3. Albumin / M-komponens (A/M) arány és AMWBC pontrendszer prognosztikai szerepe myeloma multiplexben

4.2.3.1. Betegek

A retrospektív vizsgálatban 103 konszekutív, 1996 és 2006 között újonnan diagnosztizált MM beteg adatai szerepeltek. A betegeket a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikáján kezelték. Egyéb plazmasejtes betegségek, mint MGUS, SMM, amyloidosis nem kerültek bevonásra. A könnyűlánc myeloma és a nem szekretáló myeloma esetében az A/M arány nem értelmezhető, ezért ezek a betegek sem kerültek be a tanulmányba. Annak érdekében, hogy a túlélés szempontjából minél homogénebb beteganyagot vizsgáljunk, kihagytuk az APSCT-n átesett betegeket, és azokat is, akiknél a kezelés során második malignus betegség alakult ki. A 103 beteg közül 47 csak kemoterápiában részesült, 56 beteg új típusú, nem myelotoxikus kezelést kapott – thalidomid, bortezomib – önállóan, vagy kemoterápiával kombináltan együtt adva. Az új kezelési módokban részesült betegek (103/56) adatait külön csoportban is értékeltük. A betegek jellemzőit a 11. táblázat foglalja össze.

11. táblázat. MM betegek jellemzői

	Összes beteg (n=103)	Új típusú szerekekkel kezelt beteg (n=56)
Férfi	36 (35%)	16 (29%)
Nő	67 (65%)	40 (71%)
Átlagéletkor	67,76 év (45-89)	66,87 év (46-89)
IgG	74 (72%)	47 (84%)
IgA	27 (26%)	9 (16%)
IgM	1 (0.9%)	0 (0%)
IgD	1 (0.9%)	0 (0%)
kappa	74 (72%)	44 (79%)
lambda	29 (28%)	12 (21%)
Átlagos túlélés	46,5 hónap (1-204)	50,7 hónap (1-205)

4.2.3.2. A/M prognosztikus index és AMWBC pontrendszer meghatározása

Egy korábban már publikált vizsgálat során az albumin (A) és az M-komponens (M) arányából, valamint a fehérvérsejt értékből (WBC) álló pontrendszer, egy úgynevezett AMWBC score került kialakításra, az eredeti közleményben a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Hematológiai részlegén 1981 és 1996 között kezelt, az akkori gyakorlatnak megfelelően myelotoxikus kemoterápiában részesülő myelomás betegek esetében. Az A/M hányados egynél kisebb értékének és az induló fehérvérsejtszám $4,5 \times 10^9/l$ alatti értékének rossz prognosztikai jelentőségét igazolták a szerzők [141] (12. és 13. táblázat).

12. táblázat. A diagnóziskor mért A/M hányados és a kezdeti fvs szám prognosztikus értéke a túlélés szempontjából

A/M	< 1	rossz prognózis
WBC	< 4.5 G/l	rossz prognózis

13. táblázat. AMWBC prognosztikus pontrendszer kalkulálása

Pontérték	0	1
A/M	≥ 1	< 1
WBC	≥ 4.5 G/l	< 4.5 G/l

0 pont jó prognózis

1 pont intermedier prognózis

2 pont rossz prognózis

A jelenlegi vizsgálatban a fenti laboratóriumi paraméterek, illetve a pontrendszer érvényességét vizsgáltuk az új típusú, immunmoduláns és proteaszóma gátló kezelés alkalmazásának időszakában. A kezelés megkezdése előtt minden beteg esetében meghatároztuk az A/M arányt, a kezdeti fvs számot és az úgynevezett AMWBC pontértéket. Az A/M arányt és az AMWBC pontértéket a túlélés vonatkozásában értékeltük. A betegek túlélésénél a diagnózis időpontjától a halál időpontjáig, vagy az utolsó követés dátumáig eltelt időszakot vettük figyelembe. 2 éves és 5 éves túlélési periódusokat vettünk alapul.

4.2.3.3. Statisztikai analízis

A túlélést Kaplan-Meyer analízis szerint értékeltük, az egyes csoportok közötti statisztikai szignifikanciát log-rank teszt alapján számítottuk ki. A folytonos változók közötti kapcsolatot a nem-paraméteres Spearman-féle rank korrelációs eljárással számoltuk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Myelodysplasiás syndroma

5.1.1. *TNF -238G>A (rs361525) és TNF -308G>A (rs1800629) genotípusok eloszlása MDS-ben és egészséges populációban*

A TNF- α -308 GG, GA és AA genotípusok eloszlása csaknem azonos volt a két populációban. A -238-as allélfrekvencia előfordulásában és a genotípus eredményekben megfigyelhető volt különbség, azonban ez nem érte el a szignifikancia mértékét. A genotípusok előfordulási gyakoriságát a 14. táblázat mutatja be.

14. táblázat. TNF- α gén G/A polimorfizmus MDS betegek és egészséges kontrollok esetében.

	GG	GA	AA	
TNF -308				
MDS (n=69)	50(72%)	17(25%)	2(2,9%)	p=0,91
Kontroll (n=125)	87(69%)	34(27%)	4(3%)	
TNF -238				
MDS (n=69)	63(91%)	6(8,8%)	0(0%)	p=0,0815
Kontroll (n=125)	121(96,8%)	4(3,2%)	0(0%)	

Az egyes polimorfizmus helyekre vonatkozó eredmények a bázisok megfelelő betűivel jelölve, mindkét allélnak megfelelő pozícióban. A megfelelő genotípusok száma (%)

A: adenin; G: guanin

5.2. Myeloma multiplex

5.2.1. *TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok és haplotípusaik MM betegeknél és kontroll személyekben*

Az egyes polimorfizmusokat 94 MM beteg és 141 egészséges kontroll személy esetében vizsgáltuk. Minden egyes SNP esetében ellenőriztük a Hardy-Weinberg egyensúlyt, az egyensúlytól való eltérést egyik esetben sem találtunk.

A TNF -308A (TNF2) variáns allél előfordulási gyakorisága szignifikánsan ($p=0,027$) alacsonyabb volt az MM betegek csoportjában (9,6%), mint a kontroll csoportban (21,3%). A többi vizsgált SNP esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között.

Jelentősen erős szignifikanciájú ($D'=1,000$, $p < 0,0001$) kapcsoltság mutatkozott a variáns TNF -308A (TNF2) és a LTA +252G allélok között mind az MM betegek, mind az egészséges kontroll populáció tekintetében. A TNF -308A(TNF2) allél a HSP70-2 +1267G és a RAGE -429C allélokhoz is igen erős kapcsoltságot mutatott szintén mindkét csoportban ($D' = 0,8151$, $p=0,0021$ és $D' = 0,5625$, $p=0,001$). A TNF2-LTA +252G haplotípust hordozók és nem hordozók előfordulási gyakoriságát összehasonlítva az MM betegek (9,6%) és a kontrollok (20,6%) között szignifikánsan alacsonyabb volt az előfordulás az MM betegek esetében ($p=0,041$). Ezzel szemben az ősi 8.1 haplotípus hordozók előfordulási gyakorisága közel azonos volt a két csoportban.

Ezt követően annak ellenőrzésére, hogy az egy szempontos varianciaanalízis során nyert eredményeink megismételhetőek-e multivariációs analízis során is, összehasonlítottuk az allél és haplotípus frekvenciákat az MM beteg és kontroll csoport között életkor és nem szerint illesztett többszörös logisztikus regresszióval is. Mind a TNF2 allél és a TNF2-LTA +252G haplotípus hordozó állapot is szignifikánsan összefüggött több, mint kétszeresen csökkent esélyhányadossal az MM betegcsoportba tartozással, ugyanakkor hasonló összefüggés sem a többi allél, sem a 8.1 ősi haplotípus hordozó állapot esetében nem volt megfigyelhető (15. táblázat).

15. táblázat. A TNF -308A allél, LTA +252G allél, HSP70-2 +1267G allél, RAGE -429C allél, a TNF -308-LTA +252G haplotípus és 8.1 ősi haplotípus előfordulási gyakorisága MM betegek és életkorban illesztett, magyar populációt reprezentáló kontroll személyek esetében, valamint az MM-re vonatkozó esélyhányados értéke a hordozó és nem hordozó személyek esetében (életkor és nemek szerint illesztett, többszörös logisztikus regressziós analízis alapján számolva)

Genotípus	Variáns allél gyakorisága		Esélyhányados OR (95% CI)	p érték
	Betegek (n=94)	Kontroll (n=141)		
TNF -308G>A	9 (9,6%)	30 (21,3%)	0,402 (0,179-0,902)	0,027
LTA +252A>G	43 (45,9%)	72 (51,1%)	1,134 (0,668-1,923)	0,642
HSP70-2 +1267A>G	60 (63,5%)	76 (53,8%)	1,269 (0,852-1,889)	0,242
RAGE -429T>C	25 (26,1%)	43 (30,8%)	0,894 (0,517-1,547)	0,690
TNF-308A-LTA +252G haplotípus	9 (9,6%)	29 (20,6%)	0,429 (0,191-0,965)	0,041
8.1 ősi haplotípus	5 (9,45%)	11 (7,7%)	0,855 (0,267-2,740)	0,792

Tekintettel arra, hogy szignifikáns ($p=0,026$) kapcsolatot találtunk az életkor és a TNF -308A allél hordozása között a beteg vagy a kontroll csoportba tartozást illetően, megvizsgáltuk, hogy ugyanez az asszociáció igazolható-e a myeloma rizikója és TNF2 allél hordozást illetően külön a fiatalabb és az idősebb életkorú betegek esetében is. A vizsgált személyeket a kontroll csoport medián életkora alapján két csoportra osztottuk: 69 évesnél fiatalabbakra és 69 évesnél idősebbekre. A variáns TNF2 allél hordozása alacsonyabb volt a fiatalabb korcsoportban (6,9%), mint az idősebbek esetében (13,3%). A ritkább TNF2 allél hordozók 4-szer alacsonyabb esélyhányadossal rendelkeztek az MM kialakulására vonatkozóan a 69 évesnél fiatalabb korcsoportban, mint a 69 évesnél idősebbek esetében. Ugyanakkor a 69 évesnél idősebbek esetében nem volt kimutatható szignifikáns összefüggés a variáns TNF2 allél hordozás és a MM kialakulása tekintetében. Az életkor szerinti alcsoportokra bontott eredményeket foglalja össze a 16. táblázat.

16. táblázat. A TNF -308A (TNF2) allélt hordozók és nem hordozók MM-re vonatkozó esélyhányadosa életkor szerint megosztva (nemek szerint illesztett többszörös logisztikus regressziós analízis alapján számolva)

Életkor	Életkor a diagnóziskor év, medián (interkvartilis tartomány)	TNF2 hordozó/összes (%)		Esélyhányados (95% CI)	p érték
		Beteg	Kontroll		
≤69 év	53,0 (45,0-60,0)	3/49 (6,9)	17/68 (25,0)	0,203 (0,056-0,742)	0,016
>69 év	69,0 (66,0-72,5)	6/45 (13,3)	13/73 (17,8)	0,809 (0,272-1,409)	0,700

Hasonló, és még inkább életkorfüggő különbség mutatkozott, ha a TNF2-LTA +252G haplotípust vettük figyelembe: a nemek szerint illesztett esélyhányados a fiatalabb és idősebb alcsoportban 0,196 (0,054-0,711 p=0,013), illetve 0,710 (0,249-2,025 p=0,522) volt.

A vizsgált csoportokat nemek szerinti alcsoportokra bontva is tanulmányoztuk. A variáns TNF2 allélt hordozó férfiak (66,0 [59,7-74,0] év) és nők (68,9 [62,0-74,5] év) életkor szerinti eloszlása nem különbözött szignifikánsan egymástól (p=0,308), ezért a vizsgálat elvégezhető volt. A nők esetében negatív asszociáció volt megfigyelhető, amennyiben a variáns allél hordozása 4-szer alacsonyabb rizikót jelentett a myeloma előfordulását illetően. A férfiak esetében szignifikáns összefüggés nem volt megfigyelhető (17. táblázat).

17. táblázat. A TNF -308A (TNF2) allélt hordozók és nem hordozók MM-re vonatkozó esélyhányadosa nemek szerinti alcsoportokra bontva (életkor szerint illesztett többszörös logisztikus regressziós analízis lapján számolva)

Nem	TNF2 hordozó/összes (%)		Esélyhányados (95% CI)	p érték
	Beteg	Kontroll		
Férfi	5/28 (17,9)	13/60 (21,7)	0,76 (0,24-2,47)	0,650
Nő	4/66 (6,1)	17/81(21,0)	0,24 (0,08-0,76)	0,015

A klinikai paraméterek vonatkozásában sem a betegség stádiuma, sem a paraprotein típusa, valamint a túlélési idő sem mutatott összefüggést bármely vizsgált allél vagy haplotípus előfordulási gyakoriságával.

5.2.2. 7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM betegek és kontroll populáció esetében.

A vizsgálat eredménye alapján mind a három vizsgált SNP gyakrabban fordult elő az MM betegek csoportjában a kontroll személyekhez képest. Két esetben erősen szignifikáns kapcsolat volt igazolható a kérdéses SNP és MM előfordulása között, egy esetben a kapcsolat korábban kimutatott szignifikáns mértékét nem tudta megerősíteni a jelen tanulmány. A vizsgált betegek és kontroll személyek genotípus és allélfrekvencia előfordulási gyakoriságát a 18. táblázatban foglaltam össze.

18. táblázat. 7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) lókuszek genotípusainak és allélfrekvenciáinak előfordulása MM betegek és kontroll személyek esetében

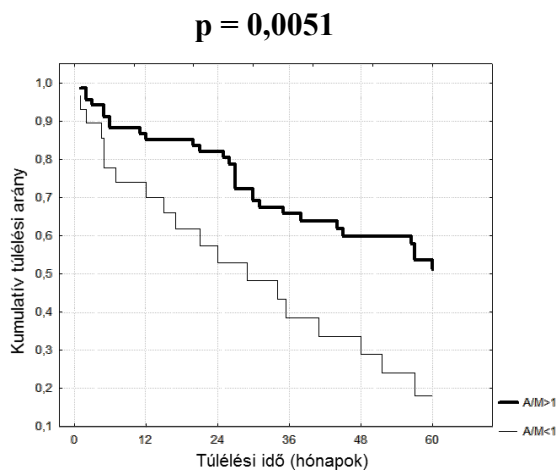
SNP	MM betegek (%)	Kontroll (%)	OR	95%CI	p érték
rs4487645 (7p15.3)					
A/A	67 (6,3)	139 (10,4)	1	–	–
A/C	423 (39,8)	598 (44,9)	1,47	1,07–2,02	0,017
C/C	572 (53,9)	595 (44,7)	1,99	1,45–2,73	0,00000173
A	557 (26,2)	876 (32,9)	1	–	–
C	1567 (73,8)	1788 (67,1)	1,37	1,21–1,56	0,0000000796
rs6746082 (2p23.3)					
C/C	35 (3,3)	61 (4,6)	1	–	–
A/C	304 (28,7)	425 (31,8)	1,21	0,78–1,89	0,392
A/A	721 (68,0)	849 (63,6)	1,48	0,96–2,27	0,074
C	374 (17,6)	547 (20,5)	1	–	–
A	1746 (82,4)	2123 (79,5)	1,22	1,05–1,41	0,008
rs1052501 (3p22.1)					
A/A	655 (61,5)	870 (65,7)	1	–	–
A/G	371 (34,9)	399 (30,1)	1,25	1,05–1,49	0,011
G/G	38 (3,6)	56 (4,2)	0,93	0,60–1,42	0,726
A	1681 (79,0)	2139 (80,7)	1	–	–
G	447 (21,0)	511 (19,3)	1,12	0,98–1,30	0,098

Az egyes polimorfizmus helyekre vonatkozó eredmények a bázisok megfelelő betűivel jelölve, mindkét allélnak megfelelő pozícióban. A: adenin; G: guanin; C: citozin
OR: Odds Ratio (esélyhányados) ; CI: Confidencia Intervallum

A legerősebb asszociációt az rs4487645 mutatta a 7p15.3 lókuszon, a myeloma előfordulása szempontjából közel 1,4-szeresen emelkedett kockázattal a C allélnak megfelelően (OR=1,37 [1,21–1,56], p=0,0000000796). A második legerősebb kapcsolat az rs6746082, a 2p23.3 lókuszon A allélja esetében volt látható (OR=1,22 [1,05–1,41], p=0,008). A szignifikancia mértékét el nem érő kapcsolat volt megfigyelhető az rs1052501 SNP-nek megfelelően a 3p22.1 lókuszon (OR=1,12 [0,98–1,30], p=0,098).

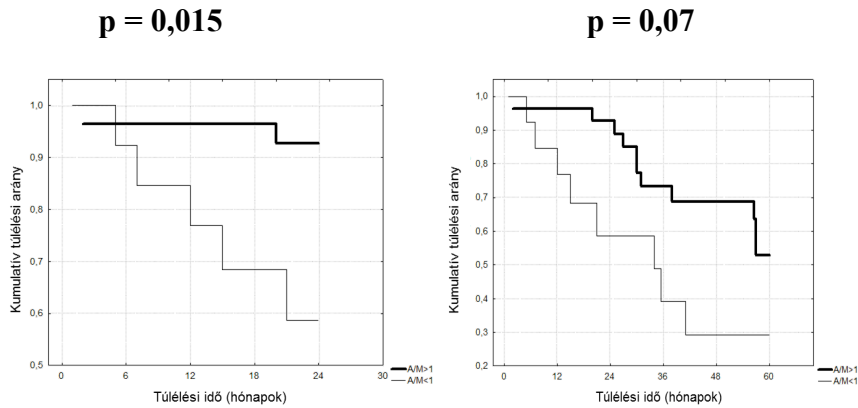
5.2.3. Albumin / M-komponens (A/M) arány és az AMWBC pontrendszer összefüggése a túléléssel MM betegek esetében

Az albumin (A) és az M-komponens (M) arányából, továbbá a diagnóziskor meghatározott fehérvérsejtszám értékéből (WBC) álló pontrendszer, az úgynevezett AMWBC pontrendszer prognosztikai jelentőségét vizsgáltuk újonnan diagnosztizált MM betegek esetében. Az A/M hányados egynél kisebb értékének és az induló fehérvérsejtszám $4,5 \times 10^9/l$ alatti értékének rossz prognosztikai jelentőségét igazolta Várkonyi és mtsai korábbi publikációja [141]. A jelenlegi vizsgálatban a fenti paraméterek, illetve a score érvényességét vizsgáltuk az új terápiás készítmények – immunmodulánsok és proteaszóma inhibitorok – alkalmazása esetén. Jelenlegi eredményeink szerint, amelyek a korábbi publikáció eredményeivel összhangban állanak, a diagnóziskor mért A/M <1 arány szignifikánsan rosszabb prognózist jelentett mind a 2 éves ($p=0,006$), mind az 5 éves ($p=0.0051$) (5. ábra) választott túlélési végpontok esetében a teljes betegpopulációban.



5. ábra. A/M arány és túlélés az összes beteg esetében. 5 éves túlélési végpont. (n=103)

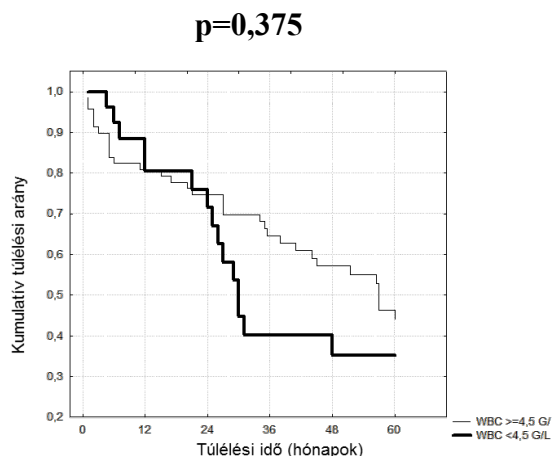
A csak újfajta terápiában részesülő betegcsoport esetében a 2 éves túlélési végpont esetében szignifikáns különbséget ($p=0,015$) (6. ábra), az 5 éves túlélési végpontnál pedig szignifikánshoz közeli trendet ($p=0,07$) (7. ábra) mutattak az eredmények.



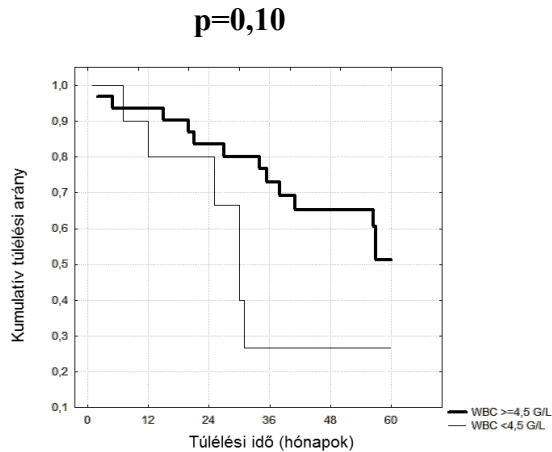
6. ábra. A/M arány és túlélés az új terápiás szerekkel kezelt betegek esetében. 2 éves túlélési végpont ($n=56$) $p=0,015$

7. ábra. A/M arány és túlélés az új terápiás szerekkel kezelt betegek esetében. 5 éves túlélési végpont ($n=56$) $p=0,07$

A fehérvérsejtszám (WBC) vonatkozásában nem tudtunk összefüggést kimutatni sem a 2 éves, sem az 5 éves (8. ábra) túlélési végpontoknál. Akkor sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, ha csak az újabb típusú kezelésben részesült betegek adatait vizsgáltuk (9. ábra).

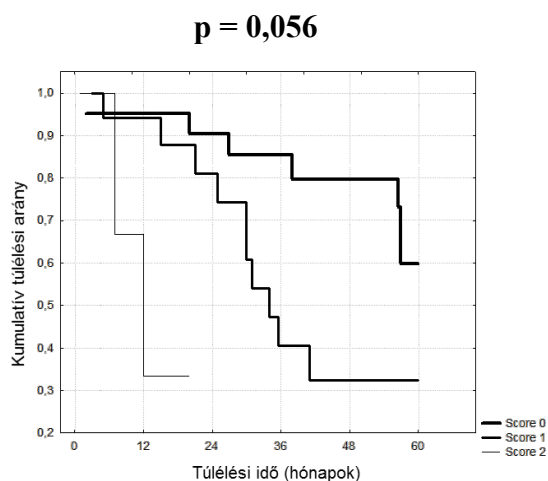


8. ábra. Kezdeti WBC szám és túlélés az összes beteg esetében. 5 éves túlélési végpont ($n=103$) $p=0,375$



9. ábra. Kezdeti WBC szám és túlélés az új szerekekkel kezelt betegek esetében. 5 éves túlélési végpont (n=56) p=0,10

Az A/M hányados és a kezdeti fehérvérsejtszám felhasználásával alkotott AMWBC pontrendszer az 5 éves túlélésnél közel szignifikáns különbséget mutatott az egyes csoportok között az összes beteg esetében, és hasonló eredményt kaptunk a csak új típusú kezelésben részesült betegeknél is (p=0,056) (10. ábra). Az eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a pontrendszer alkalmazása során tapasztalt erős trend döntően az A/M hányadosnak köszönhető.



10. ábra. AMWBC pontérték és túlélés az új terápiás szerekekkel kezelt betegek esetében 5 éves túlélési végpont (n=56) p=0,056

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Myelodysplasiás syndroma

6.1.1. *TNF -238G>A (rs361525) és TNF -308G>A (rs1800629) genotípusok eloszlása MDS-ben és egészséges kontroll csoportban*

A myelodysplasia kialakulásának genetikai hátterét vizsgálva, az ineffektív hemopoézis és ebben fontos szerepet betöltő apoptózis alapján a betegség patomechanizmusában a TNF- α szerepét feltételeztük. A funkcionális jelentőséggel bíró TNF polimorfizmusok előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk. A génszakasz promóter régiójában lévő egyetlen bázis cseréjét jelentő SNP befolyásolhatja a transzkripciót, ezáltal a termelt cytokin mennyiségét. Ennek hatása lehet az adott betegség iránti fogékonyságra, vagy a betegség lefolyásának súlyosságára. Feltételeztük, hogy az emelkedett TNF- α produkcióval járó ritka allél variáns gyakrabban fordul elő MDS-ben és ezáltal szerepet játszhat a kórkép kialakulásában.

Eredményeink alapján nem volt különbség az MDS betegek és az egészséges kontrollok genotípus megoszlásában. A *TNF* gén promóter régió -308G>A és -238G>A polimorfizmusainak hajlamosító szerepét MDS-ben vizsgálatunk nem igazolta. Saját eredményeinket tekintve az egészséges kontroll személyek allélfrekvencia előfordulása megegyezett a TNF -308-as pozíciójú polimorfizmus esetében korábban publikált magyar adatokkal [142].

Az apoptózis, amelynek kiemelt szerepe van az ineffektív hemopoézisben, az MDS minden betegségcsoportjában megfigyelhető, függetlenül attól, hogy melyik FAB, vagy WHO kategóriába tartozik a beteg. Emelkedett blast-szám esetén a mértéke azonban arányosan csökken. Az ineffektív hemopoézis főleg a kisebb rizikócsoportba tartozó betegekre (RA, RARS) jellemző, és a TNF- α szint is ezekben az esetekben emelkedettebb az előrehaladottabb, magasabb rizikócsoportba tartozó, emelkedett blast számmal járó RAEB-1, vagy RAEB-2 formákhoz képest. A vizsgálatunkban szereplő 69 MDS beteg 67 %-a tartozott az RA-a, vagy RARS csoportba. A kis esetszám miatt a genotípuseloszlást nem vizsgáltuk külön az egyes betegség alcsoportokban.

Ismeretes, hogy a keringő TNF- α szintet nemcsak a transzkripció mértéke határozza meg, hanem az mRNA poszttranszkripciós szabályozása, a szolúbilis cytokin forma leválása a membránhoz kötött formáról a TACE (TNF- α converting enzyme) működése következtében, a receptorok expressziójának mértéke, valamint számos epigenetikai tényező is. Elképzelhető, hogy ennek következtében az SNP által determinált cytokin termelés mértéke ebben a komplex biológiai rendszerben kisebb jelentőséggel bír, ami további magyarázat lehet a kapott eredményeinkre. A közleményünk megjelenését követően több tanulmány vizsgálta az MDS és az általunk is vizsgált polimorfizmusok összefüggését. Ellentmondó eredmények születtek. A ritka betegségekre vonatkozó asszociációs vizsgálatok esetében nem lehet eléggé hangsúlyozni a kellően nagy esetszám fontosságát, a meta-analízis vizsgálatok jelentőségét abban, hogy a kapott eredmények valóban a populációban lévő valóságot tükrözzék. A saját publikációnkat követő vizsgálatok eredményeit a 19. táblázat mutatja be.

19. táblázat. TNF- α polimorfizmusok MDS-ben. Az irodalom követése napjainkig

Szerző	Populáció	Esetszám MDS/kontroll	A vizsgált SNP	p érték	Irodalom
Gyulai (2005)	kaukázusi	55/74	TNF -308	NS	[143]
Lv (2007)	ázsiai	95/230	TNF -308A TNF -238A	0.75 0.18	[144]
Powers (2007)	kaukázusi	18/376 18/102	TNF -308 AA TNF -238 AA	0.02 0.35	[145]
Belli (2011)	kaukázusi	101/92	TNF -308 AA+GA	0.04	[146]
Xu (2013)	ázsiai	341/365	TNF -308 AA+GA* TNF -308A TNF -238	0.015 0.021 NS	[147]

NS: nem szignifikáns

* csak RCMD-ben (refrakter cytopenia több sejtstort érintő dysplasiával)

A fenti vizsgálatokon kívül, amelyek a TNF- α polimorfizmust, mint az MDS-re hajlamosító genetikai tényezőt vizsgálták, más munkacsoportok a betegség egyes klinikai jellemzőivel, valamint a kórlefordulás súlyosságával kerestek összefüggést. Parnes és mtsai 328 frissen diagnosztizált MDS beteg genotípusait elemezve szignifikáns összefüggést talált a neutropenia ($ANC < 1.5 \times 10^9/l$) és a -308 AA genotípus (a fokozott TNF- α produkcióval járó ritka allél szempontjából homozigóta

forma) hordozása között, valamint a -238 GA és AA genotípusok (szintén emelkedett TNF produkcióval járó genotípusok) és az anaemia előfordulása, illetve súlyossága között (Hb < 100 g/l) [148]. A Seattle-i munkacsoport 375 kaukázusi, transzplantáción átesett MDS beteg adatait áttekintve a TNF -308 GA genotípus esetén szignifikánsan nagyobb, nem relapszussal összefüggő transzplantációs mortalitást tapasztalt, mint a GG genotípus esetében [149]. Ezek a vizsgálatok a TNF- α polimorfizmus genetikai módosító szerepét támasztják alá az MDS klinikai megjelenésében és lefolyásának súlyosságában. Az eddigi vizsgálatok eredményeit összegezve úgy gondoljuk, hogy a *TNF* polimorfizmus és az MDS fenotípus összefüggése nem zárható ki teljességgel. A *TNF* génklaszter polimorfizmusai közül több kapcsoltságot mutat a HLA I és II osztályú allélokkal, ami tovább módosíthatja a TNF- α expresszióját. Elképzelhető, hogy a *TNF* gén variáns alléljait tartalmazó haplotípusoknak a vizsgálata jobban tükrözheti a valóságot, mint az egyes SNP-k vizsgálata önmagában.

6.2. Myeloma multiplex

6.2.1. *TNF -308G>A (rs1800629), LTA +252A>G (rs909253), HSP70-2 +1267A>G (rs1061581), RAGE -429T>C (rs1800625) pozíciójú polimorfizmusok és haplotípusaik MM betegeknél és kontroll személyekben*

A TNF -308G>A és LTA +252A>G SNP-eket, illetve a TNF -308A és LTA +252G ritka allélokot tartalmazó úgynevezett fokozott citokintermeléssel járó haplotípusokat több tanulmány vizsgálta már, az eredmények azonban ellentmondóak voltak. Davies és mtsai 198 MM beteg és 250 kontroll személy adatait elemezve a TNF -308A (TNF2)-LTA +252G ritka allélokot tartalmazó haplotípus gyakoribb előfordulását írta le a myelomás csoportban, eredményeik szerint az esélyhányados értéke 2,05 (95%-os CI 1,26-3,35) volt, azaz esetükben az MM előfordulása több, mint kétszer gyakoribbnak bizonyult a nem hordozókhoz képest [133]. Hasonló eredményről számolt be Neben és munkacsoportja is [150]. Más szerzők nem tudták megerősíteni ezt az összefüggést

[151, 152]. Ugyanakkor Morgan és mtsai a várakozással ellentétben, az MM csökkent rizikóját találták a TNF -308A (TNF2) ritka allél hordozása esetén [153].

Saját eredményeik alapján a TNF -308A (TNF2) ritka allél hordozása szignifikánsan ($p=0,027$) alacsonyabb frekvenciával fordult elő a MM betegek csoportjában a hasonló életkorban lévő magyar populációhoz képest. Az esélyhányados alapján az MM előfordulásának rizikója a ritka allél hordozása esetén több, mint kétszer alacsonyabb volt, mint a gyakori allélt (TNF1) hordozók esetében. Hasonló összefüggést mutattunk ki a TNF2-LTA 252G haplotípus esetén is ($p=0,041$). A kiinduló hipotézisünk nem igazolódott, sőt, eredményeink szerint a variáns allél hordozása mintegy védő hatásának bizonyult MM esetében. A többi SNP, illetve az ősi AH8.1 haplotípus tekintetében nem találtunk összefüggést. A TNF -308A allélra vonatkozó eredményünk teljesen összhangban volt Morgan és mtsai eredményével [153], és ugyancsak a variáns allélt tartalmazó genotípusok protektív hatását igazolta a későbbiekben ázsiai populáción Du munkacsoportja is [154].

Az ellentmondó eredményekre való tekintettel 2013-ban egy meta-analízis összesítette a TNF-re vonatkozó SNP-k és MM kialakulásának összefüggését vizsgáló tanulmányokat [155]. A meta-analízisben 2000 és 2012 között végzett 10 tanulmány – köztük a saját publikációnk - adatait összesítették. Összesen 1488 MM beteget és 2132 kontroll személyt vizsgáltak, 8 vizsgálatban kaukázusi, 2 vizsgálatban ázsiai populáció vett részt. A vizsgálatokban számos SNP szerepelt, a leggyakrabban meghatározott a TNF -308G>A polimorfizmus volt, ezt mind a 10 tanulmány vizsgálta, a TNF -238 G>A polimorfizmus 4 vizsgálatban szerepelt. A TNF -308G>A polimorfizmus tekintetében velünk együtt összesen 4 tanulmány szerint a ritka allél hordozása ritkábban fordult elő az MM betegek esetében, 4 tanulmány nem talált szignifikáns összefüggést és 2 tanulmány szerint gyakrabban fordult elő a variáns TNF -308A allél MM-ben. Az összesített adatok alapján azonban a teljes populációban sem a TNF -308G>A, sem a -238G>A polimorfizmus nem mutatott szignifikáns különbséget az MM és kontroll személyek genotípusai tekintetében. Külön vizsgálva a kaukázusi és ázsiai populációkat sem volt különbség.

Az eddig említett, és a saját vizsgálatunk is kandidáns génekre vonatkozó eset-kontroll vizsgálatok voltak, az alkalmazott genotipizálási módszerek egyidejűleg csak néhány SNP vizsgálatát tették lehetővé. Ma már tudjuk, hogy a multifaktoriális betegségekre

való hajlam sok genetikai variáció együttes előforulásának függvénye és a betegség kialakulása során a gének egymásra hatásának és epigenetikai tényezőknek is jelentős szerepe van.

A myeloma kialakulásában szerepet játszó genetikai variánsok kutatása kezdetben szinte kizárólag az úgynevezett kandidáns gének polimorfizmusainak vizsgálatára szorítkozott. A 2000-es évek elejétől áttekintve az irodalmat 6 nagyobb csoportba sorolhatók azok a hipotézisek, amelyek alapján a vizsgálandó géneket kiválasztották [97, 156]. Ezek: a citokinek szerepe, az immunválasz, a DNS hibajavítás, a folsav anyagcsere, az IGF, és az apoptózis. Ezek a vizsgálatok bár többször igazoltak pozitív kapcsolatot a kérdéses génvariációk és az MM kialakulása között, azonban az eredmények megismétlése más, független betegpopuláción csak ritkán járt sikerrel. Ez a tény, valamint a relatív kis betegszám korlátozta a vizsgálatok statisztikai erejét. A későbbiekben az SNP analízis automatizálásával egyszerre több százezer génvariáció analízise vált lehetővé egyidőben, így előzetes prekonceptió nélkül, a teljes genom vizsgálatára nyílt lehetőség. Ezáltal látótérbe kerülhettek olyan gének is, amelyeket korábban nem hoztak összefüggésbe a vizsgált betegség biológiájával. A hamis pozitív állítás elkerülése azonban rendkívül fontos, ezért ennek érdekében nagyon szigorú statisztikai szabályok kerültek bevezetésre az eredmények értékelésekor. A teljes genom asszociációs vizsgálatok esetében az első elemzés kritikus, hiszen a hamis pozitív állítás hosszú időre tévútra vezetheti a kutatást és ezáltal éppúgy komoly következménye van, mint annak, ha hamis negatív eredmény miatt fontos információt veszítünk. Ezért a szigorú statisztikai követelményeken kívül további lényeges elvárás, hogy az asszociációs vizsgálatok eredményit legalább egy független populáción validálni kell.

6.2.2. 7p15.3 (rs4487645), 3p22.1 (rs1052501) és 2p23.3 (rs6746082) SNP meghatározás MM betegek és kontroll populáció esetében.

2011-ben, az első teljes genom asszociációs vizsgálat myelomában három SNP-t azonosított, amely az eredmények alapján szignifikáns összefüggést mutatott a betegség kialakulásával [98]. Ezek új genetikai régiók voltak, amelyek eddig még nem szerepeltek a myeloma patomechanizmusával összefüggésben, de lehetséges etiológiának bizonyulhatnak a későbbiekben, új megvilágításba helyezve a betegség

kialakulásában szereplő folyamatokat. Az eredmények megismétlése és megerősítése más, független populációkban nagymértékben hozzájárul a kapott asszociáció megbízhatóságához, valóságához. A 2011-ben megalakult nemzetközi együttműködés, a Nemzetközi Myeloma Multiplex Konzorcium (International Multiple Myeloma rESEarch [IMMEnSE]) részeként, 139 magyar MM beteg és 104 kontroll személy részvételével mi is közreműködtünk a korábban kapott asszociációs eredmények validálásában. Vizsgálatunk eredményei szerint a legerősebb kapcsolatot a myelomával az rs4487645 C allél mutatta a 7p15.3 lókuszon. Ez a polimorfizmus a *DNAH11* génhez (dynein axonemal heavy chain 11, ami a dynein nehézlánc mikrotubulus dependens ATP-áz motor fehérjét meghatározó gén) tartozik, amely kapcsoltsági kiegyensúlyozatlansági blokkban van a *CDC47L* (cell division cycle associated 7-like) génnel, amely egy MYC interakciós fehérjét kódol, és így elősegítheti a MYC által okozott transzformációs folyamatokat. A MYC dereguláció jellemző a plazmasejtes daganatokra, eddig általában a késői progresszió eseményének gondolták. Az újabb vizsgálatok szerint azonban már az MGUS-ból az MM-be történő progresszió során megjelenik a génexpressziós vizsgálatokon a MYC jelút fokozott aktivációja [157]. A MYC jelút kiemelt szerepe alapján az utóbbi időben kifejlesztett szelektív MYC inhibitorok újabb terápiás lehetőséget jelenthetnek a myeloma kezelésében.

A második legerősebb kapcsolatot az rs6746082 polimorfizmus A allélja mutatta a 2p23.3 lókuszon. Ez a *DNMT3A* (DNS-citozin-5-metiltranszferáz 3 alfa) génhez kapcsolódó polimorfizmus, amely génszakasz a MM sejteket reguláló citokinek – TNF- α , INF- γ , IL-4 – esetében fokozottan expresszálandó DNS metiltranszferázt kódolja [158]. Direkt interakció figyelhető meg az előbb említett DNS metiltranszferáz és a *MYC* gén vonatkozásában is, valamint a p21 és p15 cyclin-dependens kináz inhibitorok promotérének metilálása révén korepresszorként szerepel. Mindez ismételt felhívja a figyelmet a MYC kulcsfontosságú szerepére a myeloma patogenezisében, valamint az epigenetikai folyamatok jelentőségét is kiemeli.

Az általunk vizsgált harmadik polimorfizmus, az rs1052501 a 3p22.1 lókuszon, amelynek kapcsolata a myelomával a mi eredményeink szerint a korábban kimutatott szignifikancia mértékét nem érte el, az *ULK4* gén egyik exonján helyezkedik el. A gén egy szerin-treonin proteinkinázt kódol, amely kulcsregulátora az mTOR mediálta autofágiának [159]. Az autofágiával kapcsolatos géneket összefüggésbe hozták a

daganatok keletkezésével, progressziójával és a kemoterápiára adott válasszal. Az mTOR gátlók szintén új lehetséges terápiás célpontok myelomában.

6.2.3. Albumin / M-komponens (A/M) arány és az AMWBC pontrendszer összefüggése a túléléssel MM betegek esetében

Az irodalomban számos myelomára vonatkozó klinikai és biológiai markert vizsgáltak a túlélés szempontjából prognosztikai faktorként, de konszenzus eddig nem született.

Korábbi publikáció igazolta, hogy a diagnóziskor észlelt A/M <1 érték esetén a túlélés szignifikánsan rosszabb, mint az A/M >1 esetében. A kérdéses vizsgálatban szereplő betegek az akkori gyakorlatnak megfelelően csak myelotoxikus kemoterápiában részesültek. Az elmúlt időszakban bevezett immunmoduláló és proteaszóma inhibitor kezelések eredményeként a myelomás betegek túlélése jelentősen javult. Ezért a korábbi vizsgálatok által meghatározott prognosztikus markerek ismételt validálása szükséges az új típusú kezelésben részesülő betegek esetében. Vizsgálataink az A/M hányados vonatkozásában megerősítették az előzőekben észlelt eredményeket. A diagnóziskor észlelt A/M <1 érték esetén a túlélés ebben a betegcsoportban is szignifikánsan rosszabb volt, mint az A/M >1 esetében. A törtben szereplő mindkét tényező külön-külön szerepelt már klinikai stádium meghatározásokban, de az albumin és az M-komponens együttes használatáról azonban nincs irodalmi adat. Mindkét paraméter a betegség patomechanizmusában kulcsfontosságú citokin, az IL-6 hatását tükrözi, egyrészt a csontvelőben a plazmasejt proliferáció következményeként termelt monoklonális fehérje mennyiségének növekedésén keresztül, másrészt a májban az albumin termelésének a gátlásán keresztül. A tört formájú alkalmazásban ezek a hatások még markánsabban nyilvánulnak meg.

A malignus plazmasejtek egyedülálló tulajdonsága a folyamatos fehérjetermelés. A termelt fehérje a betegség jelenlétének megbízható markere. A monoklonális fehérjék mérhetősége a myelomát a legjobb biomarkerrel rendelkező humán malignus megbetegedéssé teszi. Ezeknek a monoklonális fehérjéknek a mérését már évtizedek óta használják a klinikai gyakorlatban a plazmasejtes daganatban szenvedő betegek diagnózisára és monitorozására. Mivel ezeket a fehérjéket genetikai átrendeződésen és mutáción átesett B sejtek termelik, így a fehérje-markerek az őket termelő neoplasztikus

plazmasejtek mintegy genetikai ujjlenyomatának tekinthetők. A monoklonális fehérjék ideális biomarkerek, mivel betegség specifikusak, és diagnosztikus értékűek, erre példa a monoklonális illetve poliklonális eltérés jelentősége. Beteg specifikusak, azaz igazolhatják, hogy egy adott beteg pl. IgA kappa myelomában szenved. Mint hagyományos klinikai markereknek az a hátrányuk, hogy elsősorban a tumor tömeget tükrözik és nem a molekuláris heterogenitást, illetve a folyamat agresszivitását, ezért nem elég megfelelőek egy adott beteg prognózisának pontosabb előrejelzéséért. Ezért az A/M hányados FISH vizsgálat eredményével történő együtt alkalmazása javasolható. A könnyűlánc myeloma és a nem szekretáló myeloma esetében az A/M arány nem értelmezhető, ezért ezekben az esetekben prognosztikai markerként nem alkalmazható.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatómunkám célja két gyakori malignus hematológiai betegség, a myelodysplasia és a myeloma multiplex genetikai hátterének vizsgálata, és myeloma esetében egyes prognosztikai faktorok alkalmazhatóságának elemzése volt. A célkitűzésekben megfogalmazott kérdésekre a következő válaszokat kaptuk:

Myelodysplasiára vonatkozó megállapítások

1. A funkcionális jelentőséggel bíró TNF- α cytokin polimorfizmusok vizsgálata során a TNF -238 és -308-as genotípus variációk eloszlásában nem találtunk szignifikáns különbséget a myelodysplasiás betegek és az egészséges kontroll személyek esetében. A *TNF* gén promóter régió -238G>A és -308G>A polimorfizmusainak hajlamosító szerepét MDS kialakulásában vizsgálatunk nem támasztotta alá.
2. Saját eredményeinket tekintve az egészséges kontroll személyek allélfrekvencia előfordulási gyakorisága megegyezett a TNF -308-as pozíciójú allélok esetében korábban publikált magyar adatokkal.

Myeloma multiplexre vonatkozó megállapítások

3. A fokozott cytokin termeléssel járó TNF -308A (TNF2) ritka allél hordozása szignifikánsan alacsonyabb frekvenciával fordult elő az MM betegek csoportjában a hasonló életkorban lévő magyar kontroll populációhoz képest.
4. A TNF -308A (TNF2)-LTA 252G ritka allélokot tartalmazó haplotípus esetén is szignifikánsan alacsonyabb előfordulási arány igazolódott a myelomás betegek esetében az egészséges kontroll csoporthoz képest.

5. Eredményink megismételhetők voltak multivariációs analízis során is, összehasonlítva az allél és haplotípus frekvenciákat az MM beteg és kontroll csoport között életkor és nemek szerint illesztett többszörös logisztikus regresszióval is. Mind a TNF2 allél és a TNF2-LTA 252G haplotípus hordozó állapot is szignifikánsan összefüggött több, mint kétszeresen csökkent esélyhányadossal az MM betegcsoportba tartozással, ugyanakkor hasonló összefüggés sem a többi allél, sem a 8.1 ősi haplotípus hordozó állapot esetében nem volt megfigyelhető.

A vizsgált csoportokat életkor és nemek szerinti alcsoportokra bontva a TNF2 ritka allél és a TNF2-LTA 252G haplotípus hordozása a fiatalabb korcsoportba tartozóknál és a nők esetében jelentett alacsonyabb rizikót a myeloma előfordulását illetően.

A kiinduló hipotézisünk nem igazolódott, sőt, eredményeink szerint a variáns allél hordozása mintegy védő hatásúnak bizonyult MM esetében, bár a kis esetszám miatt ez az összefüggés további megerősítésre szorul.

6. A LTA +252G allél, HSP70-2 +1267G allél, a RAGE -429C allél és az ősi AH8.1 haplotípus tekintetében az előfordulási gyakoriság nem különbözött az MM betegek és a kontroll populáció esetében.

7. Erős asszociációt igazoltunk a 7p15.3 lókuszon az rs4487645 polimorfizmus tekintetében, a myeloma előfordulása szempontjából közel 1,4-szeresen emelkedett kockázattal a C allélnak megfelelően, amely egy MYC interakciós fehérjét kódoló régióval áll kapcsolatban, ezáltal elősegítve a MYC által okozott transzformációs folyamatokat. Ez a génszakasz eddig még nem szerepelt a myeloma patomechanizmusával összefüggésben, és a MYC szerepének kiemelt értékelését veti fel.

8. Erős kapcsolat igazolódott a myeloma előfordulása tekintetében a 2p23.3 lókuszon található rs6746082 polimorfizmus A allélja esetében is, amely a *DNMT3A* génszakaszon található, amely egy DNS metiltranszferázt kódol. Ez az epigenetikai folyamatok fontosságát hangsúlyozza.

9. A 3p22.1 lókuszon, az rs1052501 polimorfizmusnak megfelelően vizsgálatunk eredménye a korábban kimutatott szignifikáns kapcsolat mértékét nem érte el. Ennek ellenére az ebben a régióban elhelyezkedő *ULK4* gén, amely egy szerintreonin proteinkinázt kódol, amely kulcsregulátora az mTOR mediálta autofágiának, az mTOR mediálta autofágiára irányítja a figyelmet a myeloma patomechanizmusa tekintetében.

10. A myeloma diagnózisakor észlelt A/M <1 érték esetén a túlélés szignifikánsan rosszabb, mint az A/M >1 esetében. Ez az új, nem myelotoxikus kezelésben részesült betegek esetében is igazolható. A prognózis becslésére A/M hányados a FISH vizsgálat eredményeivel kiegészítve egy lehetséges alternatív megoldásként javasolható.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Myelodysplasiában és myeloma multiplexben végeztünk vizsgálatokat, egyrészt a betegség kialakulására hajlamosító genetikai tényezőkre, másrészt myeloma esetében a prognózist befolyásoló egyes klinikai paraméterekre vonatkozóan.

A TNF- α -nak bizonyítottan kiemelkedő szerepe van az apoptózisban, ezáltal a myelodysplasia patomechanizmusában is. Myelomában a plazmasejtek proliferációját szabályozó komplex autokrin és parakrin cytokin hálózat fontos szereplője.

Myelodysplasiás syndromában a fokozott cytokin termeléssel járó TNF -238 és -308-as genotípus variációk eloszlását vizsgáltuk. Nem találtunk szignifikáns különbséget a betegek és az egészséges kontroll személyek esetében. A *TNF* gén promóter régió -238G>A és -308G>A polimorfizmusainak hajlamosító szerepét MDS kialakulásában vizsgálatunk nem támasztotta alá.

Myeloma multiplexben a fokozott cytokin termeléssel járó TNF -308A (TNF2) ritka allél és a TNF2-LTA 252G haplotípus hordozó állapot a várakozással ellentétben szignifikánsan alacsonyabb előfordulást mutatott a myelomás betegek esetében, több mint kétszeresen csökkent esélyhányadossal az MM betegcsoportba tartozással. A kiinduló hipotézisünk nem igazolódott sőt, eredményeink szerint a variáns allél hordozása mintegy védő hatásúnak bizonyult a myeloma vonatkozásában.

A Nemzetközi Myeloma Multiplex Konzorcium (International Multiple Myeloma rESEarch [IMMEnSE]) vizsgálatához csatlakozva saját beteganyagunkkal erős asszociációt igazoltunk a 7p15.3 lókuszon az rs4487645 polimorfizmus tekintetében a myeloma előfordulása szempontjából közel 1,4-szeresen emelkedett kockázattal a C allélnak megfelelően, amely egy MYC interakciós fehérjét kódoló régióval áll kapcsolatban. Ugyancsak erős kapcsolat igazolódott a 2p23.3 lókuszon található rs6746082 polimorfizmus A allélja esetében is, amely egy DNS metiltranszferáz enzimet kódoló génszakaszon helyezkedik el.

Myelomában egyszerű és könnyen reprodukálható klinikai paramétereket alkalmazva prognosztikai markerként, a diagnóziskor mért albumin (A) és monoklonális fehérje (M) alapján meghatározott A/M <1 érték esetén a túlélés szignifikánsan rosszabbnak bizonyult, mint A/M >1 esetében. Ez igazolható volt új típusú, bortezomib és IMiD bázisú kezelésben részesült betegek esetében is.

9. SUMMARY

We conducted researches in connection with the genetic background of myelodysplastic syndrome (MDS) and multiple myeloma (MM). In case of myeloma we looked for simple, suitable prognostic factors that can effectively guide treatment decision.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) has a central role in the dysregulated apoptotic pathways observed in MDS. Among the potential MM growth factors it is a survival factor for MM cell lines, induces MM cells in the cell cycle and promotes long-term growth of malignant plasma cells.

Investigating the genetic polymorphisms of the *TNF* gene with functional significance in myelodysplastic syndrome we did not find any difference between MDS patients and controls with respect to the distribution of TNF -238 and TNF -308 genotypes. In our work we could not support that the investigated genetic polymorphisms of the *TNF* gene act as markers for predisposition to MDS.

In multiple myeloma both the carrier state of the high producer TNF-308A (TNF2) variant allele and the TNF2-LTA 252G haplotype was associated with a significant, more than two times decreased odds to belong to the multiple myeloma group. It means that high production of these cytokines does not facilitate development of MM but even may have a protective effect. Due to the low case number this result should be further confirmed.

Joining with our study group to the IMMEnSE consortium project, a very strong association was shown by rs4487645 at 7p15.3 locus, with an almost 1,4- fold increased MM risk for the C allele. This polymorphism site is in connection with a region that encodes a MYC-interacting protein. Also a strong association was observed for the A allele of the rs6746082 at 2p23.3 locus with a 1,22-fold MM risk. This annotates a gene that encodes a DNA methyltransferase.

Finding simple, reliable, reproducible prognostic markers in multiple myeloma using albumin (A) and monoclonal component (M), patients with $A/M < 1$ at diagnosis have significantly poorer prognosis, while $A/M > 1$ refers to longer survival. It could be confirmed in case of patients treated with novel therapies.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Tefferi A, Vardiman JW. (2009) Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 361(19):1872-85.
2. Sekeres MA. (2010) The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24(2):287-294.
3. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. (2000) Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood*, 95(11):3273–3279.
4. West RR, Stafford DA, Farrow A, Jacobs A. (1995) Occupational and environmental exposures and myelodysplasia: a case-control study. *Leuk Res*, 19(2):127-139.
5. Bernasconi P, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, Rocca B, Zappatore R, Dambruoso I, Caresana M. (2006) Clinical relevance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes. *Ann NY Acad Sci*, 1089:395-410.
6. Panani AD, Roussos C. (2006) Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: clinical implications. *Cancer Lett*, 235(2):177-190.
7. Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. (2012) New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*, 30:820–829.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 51(2):189–199.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5):937–951.

10. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6):2079-2088.
11. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. (2012) Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120 (12):2454-2465.
12. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M. (2007) Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 25(23):3503-3510.
13. Mufti GJ. (2004) Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol*, 17(4):543-557.
14. Raza A, Spiridonidis C, Ucar K, Mayers G, Bankert R, Preisler HD. (1985) Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer Res*, 45(5):2283-2287.
15. Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, Loew J, Marcus B, Khan Z, Chaney C, Showel J, Gregory S, Preisler H. (1995) Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 86(1):268-276.
16. Raza A, Gregory SA, Preisler HD. (1996) The myelodysplastic syndromes in 1996: complex stem cell disorders confounded by dual actions of cytokines. *Leuk Res*, 20(11-12):881-890.
17. Chamuleau ME, Westers TM, van Dreunen L, Groenland J, Zevenbergen A, Eeltink CM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. (2009) Immune mediated

- autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, 94(4):496-506.
18. Fozza C, Contini S, Galleu A, Simula MP, Viridis P, Bonfigli S, Longinotti M. (2009) Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions which are mostly polyclonal in the CD4 (+) subset and oligoclonal in the CD8 (+) subset. *Exp Hematol*, 37(8):947-955.
 19. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 364(26):2496-2506.
 20. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. (2016) Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am. J. Hematol*, 91(1):76–89.
 21. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. (2003) *Br J Haematol*, 121(5):749–757.
 22. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78(1):21–33.
 23. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. (2009) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22):5412-5417.
 24. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. (2009) A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113(22):5418-5422.
 25. Kyle R, Therneau T, Rajkumar S, Larson D, Plevak M, Offord J, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ 3rd. (2006) Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354(13):1362-1369.
 26. Landgren O, Waxman AJ. (2010) Multiple myeloma precursor disease. *JAMA*, 304(21):2397-2404.

27. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ 3rd, Rajkumar SV. (2007) Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*, 356(25):2582–2590.
28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12): e538-548.
29. Palumbo A, Anderson K. (2011) Multiple myeloma. *N Engl J Med*, 364(11):1046-1060.
30. Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002 *CA Cancer J Clin*. 55(2):74-108.
31. National Cancer Institute. Surveillance epidemiology and end results program. SEER stat fact sheets on multiple myeloma. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>; 2013. (accessed April 24, 2013).
32. http://onkol.hu/hu/nemzeti_rakregiszter
33. Alexander D, Mink JP, Adami H, Cole P, Mandel J, Oken M, Trichopoulos D. (2007) Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*, 120 (Suppl 12):40-61.
34. Huff CA, Matsui W. (2008) Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol*, 26(17):2895-2900.
35. Egan JB, Shi CX, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, Middha S, Asmann Y, Schmidt J, Braggio E, Keats JJ, Fonseca R, Bergsagel PL, Craig DW, Carpten JD, Stewart AK. (2012) Whole genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution and clonal tides. *Blood*, 120(5):1060–1066.
36. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, Van Wier S, Blackburn PR, Baker AS, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Carpten JD,

- Barrett M, Fonseca R, Stewart AK, Bergsagel PL. (2012) Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120(5):1067–1076.
37. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, Mirabella F, Lopez-Corral L, Humphray S, Murray L, Ross M, Bentley D, Gutiérrez NC, Garcia-Sanz R, San Miguel J, Davies FE, Gonzalez D, Morgan GJ. (2014) Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*, 28(2):384-390.
 38. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12(5):335-348.
 39. Kuehl WM, Bergsagel PL. (2012) Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*, 122(10):3456-3463.
 40. Bergsagel PL, Kuehl WM. (2003) Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev*, 194:96-104.
 41. Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, Agnelli L, Marzorati S, Fabris S, Ciceri G, Galletti S, Milesi G, Manzoni M, Mazzoni M, Greco A, Tonon G, Musto P, Baldini L, Neri A. (2015) Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication of MEK-ERK pathway activation. *Oncotarget*, 6(27):24205–24217.
 42. Martinez-Garcia E, Popovic R, Min DJ, Sweet SMM, Thomas PM, Zamdborg L, Heffner A, Will C, Lamy L, Staudt LM, Levens DL, Kelleher NL, Licht JD. (2011) The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, 117(1):211-220.
 43. Mahtouk K, Moreaux J, Hose D, Rème T, Meissner T, Jourdan M, Rossi JF, Pals ST, Goldschmidt H, Klein B. (2010) Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays. *BMC Cancer*, 10:198.
 44. Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK. (2011) Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol*, 41(9):2522-2525.

45. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. (1996) Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*, 87(3):1104–1112.
46. Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 95(8):2630–2636.
47. Löwik CW, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, Papapoulos SE. (1989) Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 162(3):1546–1552.
48. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. (2001) The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*, 20(33):4519–4527.
49. Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. (2002) Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*, 99(11):4138-4146.
50. Carbone PP, Kellerhouse LE, Gehan EA. (1967) Plasmacytic myeloma: a study of the relationship of survival to various clinical manifestations and anomalous protein type in 112 patients. *Am J Med*, 42(6):937–948.
51. Durie BG, Salmon SE. (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36(3):842–854.
52. Bataille R, Durie BG, Grenier J. (1983) Serum beta-2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br J Haematol*, 55(3):439–447.
53. Durie BG, Stock-Novack D, Salmon SE, Finley P, Beckord J, Crowley J, Coltman CA. (1990) Prognostic value of pretreatment serum β_2 -microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, 75(4):823–830.

54. Bataille R, Durie BG, Grenier J, Sany J. (1986) Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol*, 4(1):80–87.
55. Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie B, Pileri A. (1992) C-reactive protein and beta-2-microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*, 80(3):733–737.
56. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. (1993) Plasma cell labeling index and beta-2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*, 81(12):3382–3387.
57. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. (1996) Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*, 88(5):1780–1787.
58. Barlogie B, Smallwood L, Smith T, Alexanian R. (1989) High serum levels of lactic dehydrogenase identify a high-grade lymphoma-like myeloma. *Ann Intern Med*, 110(7):521-525.
59. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, and Westin J. (2005) International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23(15):3412–3420.
60. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR, Hubl W, Harding SJ. (2012) Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia*, 27(1):213–219.
61. San Miguel JF, Garzia-Sanz R. (2005) Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 18(4):569-583.
62. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. (1985) The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood*, 66(2):380-390.
63. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B (1995) Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 82(1):41-49.

64. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez NC, Liebisch P, O'Connor S, Dalva K, Fabris S, Testi AM, Jarosova M, Hodgkinson C, Collin A, Kerndrup G, Kuglik P, Ladon D, Bernasconi P, Maes B, Zemanova Z, Michalova K, Michau L, Neben K, Hermansen NE, Rack K, Rocci A, Protheroe R, Chiecchio L, Poirrel HA, Sonneveld P, Nyegaard M, Johnsen HE; European Myeloma Network. (2012) Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 97(8):1272-1277.
65. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. (2005) Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106(1):296–303.
66. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BGM, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23(12): 2210- 2221.
67. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 108(6):2020–2028.
68. Shaughnessy Jr JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR, Xiao Y, Xu H, Epstein J, Anaissie E, Krishna SG, Cottler-Fox M, Hollmig K, Mohiuddin A, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Sawyer J, Alsayed Y, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B. (2007) A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*, 109(6):2276-2284.
69. Van de Velde H, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. (2007) Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*, 92(10):1399-1406.

70. Durie BG. (2006) The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer*, 42(11):1539-1543.
71. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, Attal M, Gutierrez N, Haessler J, Goldschmidt H, Hajek R, Lee JH, Sezer O, Barlogie B, Crowley J, Fonseca R, Testoni N, Ross F, Rajkumar SV, Sonneveld P, Lahuerta J, Moreau P, Morgan G; International Myeloma Working Group. (2013) Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assesment in myeloma: An International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*, 27(3):711-717.
72. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, Rosinol L, Attal M, Pezzi A, Goldschmidt H, Lahuerta JJ, Marit G, Palumbo A, van der Holt B, Bladé J, Petrucci MT, Neben K, san Miguel J, Patriarca F, Lokhorst H, Zamagni E, Hulin C, Gutierrez N, Facon T, Caillot D, Benboubker L, Harousseau JL, Leleu X, Avet-Loiseau H, Mary JY. (2014) Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with frontline autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol*, 32(20):2173-2180.
73. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. (2015) Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33(26):2863-2869.
74. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE. (1969) Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*, 208(9):1680-1685.
75. Myeloma Trialists' Collaborative Group. (1998) Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: An

- overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol*, 16(12):3832–3842.
76. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. (1996) A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med*, 335(2):91-97.
 77. Mateos MV, San Miguel JF. (2013) How should we treat newly diagnosed multiple myeloma patients? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013:488-495.
 78. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B. (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 341(21):1565-1571.
 79. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi NC, Treon SP, Anderson KC. (2002) Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*, 99(12):4525-4530.
 80. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Podar K, Yasui H, Raje N, Kumar S, Chauhan D, Treon SP, Richardson P, Anderson KC. (2005) Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: Clinical application. *Br J Haematol*, 128(2):192-203.
 81. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, Jagannath S, Zeldenrust SR, Alsina M, Schlossman RL, Rajkumar SV, Desikan KR, Hideshima T, Munshi NC, Kelly-Colson K, Doss D, McKenney ML, Gorelik S, Warren D, Freeman A, Rich R, Wu A, Olesnyckyj M, Wride K, Dalton WS, Zeldis J, Knight R, Weller E, Anderson KC. (2006) A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 108(10):3458-3464.
 82. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau JL, Dmoszynska A, San Miguel J, Hellmann A, Facon T, Foà R, Corso A, Masliak Z, Olesnyckyj M, Yu Z, Patin J, Zeldis JB, Knight RD; Multiple Myeloma (010) Study

- Investigators. (2007) Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 357(21):2123-2132.
83. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, Abonour R, Siegel DS, Katz M, Greipp PR; Eastern Cooperative Oncology Group. (2010) Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 11(1):29-37.
 84. Richardson PG, Siegel DS, Vij R, Hofmeister CC, Baz R, Jagannath S, Chen C, Lonial S, Jakubowiak A, Bahlis N, Song K, Belch A, Raje N, Shustik C, Lentzsch S, Lacy M, Mikhael J, Matous J, Vesole D, Chen M, Zaki MH, Jacques C, Yu Z, Anderson KC. (2014) Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood*, 123(12):1826-1832.
 85. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC. (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*, 348(26):2609-2617.
 86. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Adams J, Kauffman M, Esseltine DL, Schenkein DP, Anderson KC. (2004) A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol*, 127(2):165-172.
 87. Oakervee HE, Popat R, Curry N, Smith P, Morris C, Drake M, Agrawal S, Stec J, Schenkein D, Esseltine DL, Cavenagh JD. (2005) PAD combination PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 129(6):755-762.
 88. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosiñol L, Bladé J, Lahuerta JJ, Cavo M, Tacchetti P, Zamagni E, Attal M, Lokhorst HM, Desai A, Cakana A, Liu K, van de Velde H, Esseltine DL, Moreau P. (2013) Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients

- with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol*, 31(26):3279-3287.
89. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA. (2008) Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111(5):2516-2520.
 90. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, Kapoor P, Dingli D, Hayman SR, Leung N, Lust J, McCurdy A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Kyle RA, Rajkumar SV. (2014) Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 28(5):1122-1128.
 91. Lynch HT, Watson P, Tarantolo S, Wiernik PH, Quinn-Laquer B, Isgur Bergsagel K, Huiart L, Olopade OI, Sobol H, Sanger W, Hogg D, Weisenburger D. (2005) Phenotypic heterogeneity in multiple myeloma families. *J Clin Oncol*, 23(4):685-693.
 92. Lynch HT, Ferrara K, Barlogie B, Coleman EA, Lynch JF, Weisenburger D, Sanger W, Watson P, Nipper H, Witt V, Thomé S. (2008) Familial myeloma. *N Engl J Med*, 359(2):152-157.
 93. Lynch HT, Thome SD. (2009) Familial multiple myeloma. *Blood*, 114(4):749-750.
 94. Altieri A, Chen B, Bermejo JL, Castro F, Hemminki K. (2006) Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42(11):1661-1670.
 95. Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, Foreman BJ, Larson DR, Colby CL, Phelps TK, Dispenzieri A, Kumar SK, Katzmann JA, Rajkumar SV. (2009) Increased risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 114(4):785-790.
 96. Landgren O, Weiss BM. (2009) Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*, 23(10):1691-1697.

97. Morgan GJ, Johnson DC, Weinhold N, Goldschmidt H, Landgren O, Lynch HT, Hemminki K, Houlston RS. (2014) Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia*, 28(3):518-524.
98. Broderick P, Chubb D, Johnson DC, Weinhold N, Försti A, Lloyd A, Olver B, Ma YP, Dobbins SE, Walker BA, Davies FE, Gregory WA, Child JA, Ross FM, Jackson GH, Neben K, Jauch A, Hoffmann P, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Tomlinson IP, Goldschmidt H, Hemminki K, Morgan GJ, Houlston RS. (2012) Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*, 44(1): 58-61.
99. Greenberg AJ, Lee AM, Serie DJ, McDonnell SK, Cerhan JR, Liebow M, Larson DR, Colby CL, Norman AD, Kyle RA, Kumar S, Rajkumar SV, Diasio RB, Slager SL, Vachon CM. (2013) Single nucleotide polymorphism rs1052501 associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Leukemia*, 27(2): 515–516.
100. Chubb D, Weinhold N, Broderick P, Chen B, Johnson DC, Försti A, Vijayakrishnan J, Migliorini G, Dobbins SE, Holroyd A, Hose D, Walker BA, Davies FE, Gregory WA, Jackson GH, Irving JA, Pratt G, Fegan C, Fenton JA, Neben K, Hoffmann P, Nöthen MM, Mühleisen TW, Eisele L, Ross FM, Straka C, Einsele H, Langer C, Dörner E, Allan JM, Jauch A, Morgan GJ, Hemminki K, Houlston RS, Goldschmidt H. (2013) Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*, 45(10): 1221-1225.
101. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. (2005) *Nature*, 437(7063):1299-1320.
102. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3):651-665.
103. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. (1985) Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 260(4):2345-2354.
104. Liu ZG. (2005) Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res*, 15(1):24-27.

105. van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. (2006) TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, (4):397-408.
106. Hajeer AH, Hutchinson IV. (2001) Influence of TNF- alpha gene polymorphisms on TNF-alpha production and disease. *Hum Immunol*, 62(11):1191–1199.
107. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: An NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med*, 173(1):209-219.
108. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charol C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. (1998) Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood*, 91(10):3574-3581.
109. Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen FT, Witt CS, Abraham LJ, Dawkins RL. (1992) Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Hum Immunol*, 34(4):242-252.
110. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. (1992) Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*, 1(5):353.
111. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. (1998) Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*, 113(3):401–406.
112. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(7):3195–3199.
113. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. (1997) The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*, 34(5):391-399.
114. Baseggio L, Bartholin L, Chantome A, Charlot C, Rimokh R, Salles G. (2004) Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. *Eur J Immunogenet*, 31(1):15-19.

115. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. (1994) Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, 371(6497):508-510.
116. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. (1999) Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*, 282(6):561-568.
117. Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. (1995) Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers*, 12(2):127–133.
118. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*, 177(2):557-560.
119. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Peria AS. (1997) TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*, 72(2):149–153.
120. Parker JE, Mufti GJ (1998) Ineffective erythropoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 101(2):220–230.
121. Sharma B, Altman JK, Goussetis DJ, Verma AK, Plataniias LC. (2011) Protein kinase R as mediator of the effects of interferon (IFN) gamma and tumor necrosis factor (TNF) alpha on normal and dysplastic hematopoiesis. *J Biol Chem*, 286(31):27506-27514.
122. Raza A, Mundle S, Shetty V, Alvi S, Chopra H, Span L, Parcharidou A, Dar S, Venugopal P, Borok R, Gezer S, Showel J, Loew J, Robin E, Rifkin S, Alston D, Hernandez B, Shah R, Kaizer H, Gregory S (1996) Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: Excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol*, 63(4):265–278.

123. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Kamiyama R, Hirokawa K. (1997) Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 11(12):2049-2054.
124. Verhoef GE, De Schouwer P, Ceuppens JL, Van Damme J, Goossens W, Boogaerts MA (1992) Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 6(12):1268–1272.
125. Musto P, Matera R, Minervini MM, Checchia de Ambrosio C, Bodenizza C, Falcone A, Carotenuto M. (1994) Low serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-1 beta in myelodysplastic syndromes responsive to recombinant erythropoietin. *Haematologica*, 79(3):265–268.
126. Stasi R, Brunetti M, Bussa S, Conforti M, Martin LS, La Presa M, Bianchi M, Parma A, Pagano A. (1997) Serum levels of tumour necrosis factor-alpha predict response to recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol*, 19(3):197-201.
127. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, Troutt AB, Ledbetter JA, Deeg HJ. (1998) A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 103(1):176–188.
128. Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, Brochier J, Rossi JF, Klein B. (1999) Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. *Eur Cytokine Netw*, 10(1):65–70.
129. Jöhrer K, Janke K, Krugmann J, Fiegl M, Greil R. (2004) Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF)-alpha via TNF receptor 2 and autocrine up-regulation of MCP-1. *Clin Cancer Res*, 10(6):1901–1910.
130. Borset M, Waage A, Brekke OL, Helseth E. (1994) TNF and IL-6 are potent growth factors for OH-2, a novel human myeloma cell line. *Eur J Haematol*, 53(1):31–37.
131. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. (2001) The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*, 20(33):4519–4527.

132. Jurisic V, Colovic M. (2002) Correlation of sera TNF-alpha with percentage of bone marrow plasma cells, LDH, beta2-microglobulin, and clinical stage in multiple myeloma. *Med Oncol*, 19(3):133–139.
133. Davies FE, Rollinson SJ, Rawstron AC, Roman E, Richards S, Drayson M, Child JA, Morgan GJ. (2000) High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment. *J Clin Oncol*, 18(15):2843–2851.
134. Candore G, Modica MA, Lio D, Colonna-Romano G, Listi F, Grimaldi MP, Russo M, Triolo G, Accardo-Palumbo A, Cuccia MC, Caruso C. (2003) Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. *Biomed Pharmacother*, 57(7):274-277.
135. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3):1215.
136. Day CP, Grove J, Daly AK, Stewart MW, Avery PJ, Walker M. (1998) Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia*, 41(4):430–434.
137. Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. (2002) Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis*, 61(1):48-51.
138. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. (2001) Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*, 50(6):1505-1511.
139. Seidemann K, Zimmermann M, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, Reiter A, Stanulla M. (2005) Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non- Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol*, 23(33):8414-8421.

140. Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Jacobs KB, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB, Gallinger S, Gross M, Helzlsouer K, Holly EA, Jacobs EJ, Klein AP, LaCroix A, Li D, Mandelson MT, Olson SH, Risch HA, Zheng W, Albanes D, Bamlet WR, Berg CD, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Bracci PM, Canzian F, Clipp S, Cotterchio M, de Andrade M, Duell EJ, Gaziano JM, Giovannucci EL, Goggins M, Hallmans G, Hankinson SE, Hassan M, Howard B, Hunter DJ, Hutchinson A, Jenab M, Kaaks R, Kooperberg C, Krogh V, Kurtz RC, Lynch SM, McWilliams RR, Mendelsohn JB, Michaud DS, Parikh H, Patel AV, Peeters PH, Rajkovic A, Riboli E, Rodriguez L, Seminara D, Shu XO, Thomas G, Tjønneland A, Tobias GS, Trichopoulos D, Van Den Eeden SK, Virtamo J, Wactawski-Wende J, Wang Z, Wolpin BM, Yu H, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Hartge P, Chanock SJ. (2010) A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet*, 42(3):224-228.
141. Várkonyi J, Bajzik E, Fazakas A, Sipka S, Karádi I. (2009) Short or long survival in multiple myeloma. A simple method for determining the prognosis. *Pathol Oncol Res*, 15(3):383-387.
142. Demeter J, Messer G, Rajczy K, Patscht K, Péntes M, Kenéz A, Karádi I. (2000) Polymorphism of the TNF-alpha, the IL-6 promoter and the IL-1 receptor antagonist at the DNA level in a Hungarian population and relation to infectious, autoimmune and malignant diseases. *Magy Belorv Arch*, 53:185-193.
143. Gyulai Z, Balog A, Borbényi Z, Mándi Y. (2005) Genetic polymorphisms in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 52(3-4):463-475.
144. Lv L, Kerzic P, Lin G, Schnatter AR, Bao L, Yang Y, Zou H, Fu H, Ye X, Gross SA, Armstrong TW, Irons RD. (2007) The TNF-alpha 238A polymorphism is associated with susceptibility to persistent bone marrow dysplasia following chronic exposure to benzene. *Leuk Res*, 31(11):1479-1485.
145. Powers MP, Nishino H, Luo Y, Raza A, Vanguri A, Rice L, Zu Y, Chang CC. (2007) Polymorphisms in TGFbeta and TNFalpha are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. *Arch Pathol Lab Med*, 131(12):1789-1793.

146. Belli CB, Bestach Y, Sieza Y, Gelemur M, Giunta M, Flores MG, Watman N, Bengi  R, Larripa I. (2011) The presence of -308A TNF α is associated with anemia and thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*, 47(4):255-258.
147. Xu JQ, Wang JY, Qin TJ, Xu ZF, Fang LW, Pan LJ, Hu NB, Zhang HL, Qu SQ, Zhang Y, Xiao ZJ. (2013) Relationship between polymorphisms of tumor necrosis factor alpha gene and primary myelodysplastic syndromes. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 34(10):873-876.
148. Parnes A, Nikiforow S, Berliner N, Vanasse GJ. (2010) Single nucleotide polymorphisms in the human TNF gene are associated with anaemia and neutropenia in a cohort of patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 150(6):700-701.
149. Newell LF, Gooley T, Hansen JA, Stirewalt DL, Petersdorf EW, Deeg HJ. (2010) Tumor necrosis factor polymorphism affects transplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome but not in those with chronic myelogenous leukemia, independent of the presence of HLA-DR15. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(12):1700-1706.
150. Neben K, Mytilineos J, Moehler TM, Preiss A, Kraemer A, Ho AD, Opelz G, Goldschmidt H. (2002) Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 100(6):2263-2265.
151. Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S, Sundblad A, Osterborg A, Bjorkholm M, Holm G, Yi Q. (2000) Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 109(1):39-45.
152. Iakupova EV, Grinchuk OV, Kalimullina D, Bakirov BA, Galimova RR, Makarova OV, Khusnutdinova EK, Viktorova TV. (2003) Molecular genetic analysis of the interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in multiple myeloma. *Mol Biol (Mosk)*, 37(3):420-424.
153. Morgan GJ, Adamson PJ, Mensah FK, Spink CF, Law GR, Keen LJ, Roman E, Davies FE, Rollinson S, Child JA, Bidwell JL. (2005) Haplotypes in the tumour necrosis factor region and myeloma. *Br J Haematol*, 129(3):358-365.

154. Du J, Yuan Z, Zhang C, Fu W, Jiang H, Chen B, Hou J. (2010) Role of the TNF- α promoter polymorphisms for development of multiple myeloma and clinical outcome in thalidomide plus dexamethasone. *Leuk Res*, 34(11):1453–1458.
155. Li B, Wang XD, Sun X, Ma J, Yang, Ma X. (2013) Lack of association between TNF- α promoter polymorphisms and multiple myeloma: a meta-analysis. *Leuk Res*, 37(1):50-57.
156. Vangsted A, Klausen TW, Vogel U. (2011) Genetic variations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 88(1):8-30.
157. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, Ng SB, Gonzalez-Paz N, Troska-Price T, Mulligan G, Chesi M, Bergsagel PL, Fonseca R. (2011) Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*, 25(6):1026–1035.
158. El Gazzar M, Yoza BK, Chen X, Hu J, Hawkins GA, McCall CE. (2008) G9a and HP1 couple histone and DNA methylation to TNF α transcription silencing during endotoxin tolerance. *J Biol Chem*, 283(47):32198-32208.
159. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knegt Y, Peeters J, Jauch A, Bertsch U, Buijs A, Stevens-Kroef M, Beverloo HB, Vellenga E, Zweegman S, Kersten MJ, van der Holt B, el Jarari L, Mulligan G, Goldschmidt H, van Duin M, Sonneveld P. (2010) Blood. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*, 116(14):2543-2553.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló saját publikációk

Kádár K, Wolf K, Tábori J, Karádi I, Várkonyi J. (2012) The albumin and monoclonal protein ratio as prognostic marker for multiple myeloma in the era of novel agents. *Pathol Oncol Res*, 18(3):557-561.

Martino A, Campa D, Jamroziak K, Reis RM, Sainz J, Buda G, García-Sanz R, Lesueur F, Marques H, Moreno V, Jurado M, Ríos R, Szemraj-Rogucka Z, Szemraj J, Tjønneland A, Overvad K, Vangsted AJ, Vogel U, Mikala G, Kádár K, Szombath G, Varkonyi J, Orciuolo E, Dumontet C, Gemignani F, Rossi AM, Landi S, Petrini M, Houlston RS, Hemminki K, Canzian F. (2012) Impact of polymorphic variation at 7p15.3, 3p22.1 and 2p23.3 loci on risk of multiple myeloma. *Br J Haematol*, 158(6):805-809.

Kádár K, Kovács M, Karádi I, Melegh B, Pocsai Z, Mikala G, Tordai A, Szilágyi A, Adány R, Füst G, Várkonyi J. (2008) Polymorphisms of TNF-alpha and LT-alpha genes in multiple myeloma. *Leuk Res*, 32(10):1499-1504.

Kádár K, Demeter J, Andrikovics H, Tordai A, Kovács M, Füst G, Karádi I, Várkonyi J. (2005) TNF-alpha promoter gene polymorphism in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*, 113(4):262-264.

A tézisekhez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk

Okuyama N, Sperr WR, Kádár K, Bakker S, Szombath G, Handa H, Tamura H, Kondo A, Valent P, Várkonyi J, van de Loosdrecht A, Ogata K. Prognosis of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndromes: a multicenter retrospective study. (2013) *Leuk Res*, 37(8):862-867.

Rókus L, Liptay L, Kádár K. (2001) Successful treatment of chronic disseminated candidiasis with fluconazole and a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor combination. *Scand J Infect Dis*, 33(10):784-786.

Liptay L, Fűrész J, Kádár K, Pállinger É, Kolozsvári F. (1999) A citokinek szerepe a kemoterápiás kezeléseket követően fellépő neutropéniás fertőzések kezelésében. *Kórház*, 7:6-8.

Rókus L, Liptay L, Kádár K. (1999) Chronicus disseminált candidiasis sikeres kezelése fluconazol, GM-CSF kombinációval. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia*, 6:46-48.

Horváth M, Jovanovich N, Kádár K, Györffy G. (1984) Distribution of T-lymphocyte subsets in patients with vascular diseases. *Cor Vasa*, 26(6):429-437.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom:

A Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika tanszékvezetőjének, Prof. Dr. Karádi Istvánnak támogatásáért, a lehetőségért, hogy a klinika tudományos munkájába bekapcsolódhattam.

Dr. Várkonyi Judit egyetemi docensnek a témaválasztásban, a beteganyag összegyűjtésében, a vizsgálati eredmények értékelésében nyújtott segítségével, tanácsaiért és a kitartó biztatásáért, amely nélkül ez a dolgozat nem született volna meg. Köszönöm, hogy bevont az IMMEnS nemzetközi myeloma konzorcium munkájába is.

A molekuláris genetikai vizsgálatok a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek, ezért külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Füst Györgynek, aki már sajnos nincs köztünk, de kutatómunkám kezdetén nagyon értékes segítséget nyújtott tanácsaival, és a statisztikai vizsgálatok elvégzésével. A későbbiekben Prof. Dr. Prohászka Zoltán volt segítségemre a statisztikai számítások elvégzésében, akinek útmutatásait, gyakorlati javaslatait ezúton is köszönöm. Az általa vezetett munkacsoport tagjai mindig készségesen segítettek, támogattak. Külön köszönöm Dr. Szilágyi Ágnesnek és Dr. Csuka Dorottyának a lehetőséget, hogy genetikai kérdésekben együtt gondolkodhattam velük. Kovács Margitnak a laboratóriumi munkák technikai kivitelezésében nyújtott szerepét köszönöm.

Prof. Dr. Melegh Bélának, a Pécsi Tudományegyetem Kliniaki Központ Orvosi Genetikai Intézet igazgatójának a LT-alpha polimorfizmus vizsgálatok elvégzéséért mondhatok köszönetet.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem III. sz. és I. sz. Belgyógyászati Klinika, valamint a Szent László Kórház Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztálya hematológus kollégáinak, akik a vizsgálatokban résztvevő betegeket kezelték.

Dr. Varga Gergelynek a házivédéssel kapcsolatos alapos és értékes munkáját köszönöm.

Köszönettel tartozom közvetlen kollégáimnak, hogy biztosították számomra a disszertáció megírásához szükséges feltételeket.

Végül hálásan köszönöm a háttérrel biztosító családomnak a sok türelmet, megértést és biztatást, amivel támogattak és segítettek az elmúlt időszakban.